

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 166**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2007 E 07874280 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2094279**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar la gripe**

30 Prioridad:

15.11.2006 US 858920 P

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

04.02.2015

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**LI, LIMIN;
KINCH, MICHAEL y
GOLDBLATT, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 528 166 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

Métodos y composiciones para tratar la gripe

- 5 La presente invención se refiere en general al tratamiento de enfermedades virales, y en particular a enfermedades causadas por el virus de la gripe. La invención también se refiere a genes de resistencia a la gripe, polinucleótidos transcritos a partir de estos genes y polipéptidos codificados por estos genes.

Antecedentes de la invención

- 10 La influenza, también conocida como gripe, es una enfermedad contagiosa causada por el virus de la gripe. Ataca al tracto respiratorio en seres humanos (nariz, garganta y pulmones). Hay tres tipos de virus de la gripe, gripe A, B y C. La gripe A puede infectar a seres humanos y otros animales, mientras que la gripe B y C solo infecta a los seres humanos.

- 15 La mayoría de las personas que contraen la gripe se recuperará en una o dos semanas, pero algunas personas desarrollarán complicaciones potencialmente mortales (tales como neumonía) como consecuencia de la gripe. En Estados Unidos, millones de personas – de aproximadamente un 5 % a un 20 % de los residentes de Estados Unidos - contraerán la gripe cada año. Un promedio de aproximadamente 36.000 personas al año en Estados Unidos mueren a causa de la gripe, y 114.000 al año tiene que ingresar en el hospital como consecuencia de la gripe. Las personas de 65 y más años de edad, las personas de cualquier edad con afecciones médicas crónicas, y los niños muy pequeños tienen más probabilidades de sufrir complicaciones por la gripe. Neumonía, bronquitis, e infecciones de los senos nasales y los oídos son tres ejemplos de complicaciones de la gripe. La gripe también puede empeorar los problemas de salud crónicos. Por ejemplo, las personas con asma pueden sufrir ataques de asma cuando tienen la gripe, y las personas con insuficiencia cardíaca congestiva crónica pueden padecer un agravamiento de esta afección que se desencadena por la gripe.

- 25 La vacunación es el método principal para prevenir la gripe y sus complicaciones graves. Los estudios revelaron que la vacunación se asocia con reducciones en enfermedades respiratorias relacionadas con la gripe y con visitas médicas entre los grupos de cualquier edad, hospitalización y muerte entre personas de alto riesgo, otitis media en niños, y absentismo laboral entre los adultos (18). El problema principal de la vacunación es que la nueva vacuna se tiene que preparar para cada temporada de gripe y la producción de vacunas es un proceso tedioso y caro.

- 30 Aunque la vacunación de la gripe sigue siendo la piedra angular para el control y tratamiento de la gripe, se han aprobado tres fármacos antivirales (amantadina, rimantadina y oseltamivir) para la prevención y el tratamiento de la gripe. Cuando se usan para prevención, son eficaces en de aproximadamente un 70 % a un 90 % para prevenir enfermedades en adultos sanos. Cuando se usan para el tratamiento de la gripe, estos fármacos pueden reducir los síntomas de la gripe y acortar la duración de la enfermedad en 1 o 2 días. También pueden hacer a uno menos contagioso para los demás. Sin embargo, el tratamiento debe comenzar dentro de los 2 días de la aparición de los síntomas para que sea eficaz. Existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados para el tratamiento de la gripe.

- 35 Shao J *et al.*, 2006, *Pancreas*, vol. 33, nº 1 se refieren a la expresión anómala de PTCH (gen patched) y Smo (gen smoothened) en tejidos cancerosos pancreáticos humanos y su asociación con la hiperglucemia.

45 Sumario de la invención

- 50 Un aspecto de la presente invención se refiere a genes de resistencia a la gripe (IRG) y a los productos genéticos (productos de IRG), que incluyen los polinucleótidos transcritos a partir de los IRG (IRGPN) y los polipéptidos codificados por los IRG (IRGPP). De forma más específica, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17 (PTCH) para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe o un método para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe en un mamífero.

- 55 En una realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la gripe. La invención proporciona una composición farmacéutica para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero al virus de la gripe, donde dicha composición comprende un anticuerpo suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo anticuerpo se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17 (PTCH).

- 60 El paciente a tratar puede padecer gripe, en cuyo caso los métodos proporcionan tratamiento para la enfermedad. También se puede considerar que el paciente está en riesgo de gripe, en cuyo caso los métodos proporcionan prevención para el desarrollo de la enfermedad.

65

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa el proceso para identificar sistemáticamente clones de resistencia a la gripe.

La Figura 2A es la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon 26-8-7 de resistencia a la gripe; la Figura 2B representa el sitio genómico de la integración de RHKO; y la Figura 2C es un mapa esquemático de integración.

La Figura 3A es la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de dos subclones del clon R18-6 de resistencia a la gripe; la Figura 3B representa el sitio genómico de la integración de RHKO; y la Figura 3C es un mapa esquemático de integración.

La Figura 4A es la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon 26-8-11 de resistencia a la gripe; la Figura 4B representa el sitio genómico de la integración de RHKO; y la Figura 4C es un mapa esquemático de integración.

La Figura 5A es la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon R15-6 de resistencia a la gripe; la Figura 5B representa el sitio genómico de la integración de RHKO; y la Figura 5C es un mapa esquemático de integración.

La Figura 6A es la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon R21-1 de resistencia a la gripe; la Figura 6B representa el sitio genómico de la integración de RHKO; y la Figura 6C es un mapa esquemático de integración.

La Figura 7 representa el sitio genómico de la integración de RHKO en el clon R27-32 de resistencia a la gripe.

La Figura 8A es la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de dos subclones del clon R27-3-33 de resistencia a la gripe; la Figura 8B representa el sitio genómico de la integración de RHKO; y la Figura 8C es un mapa esquemático de integración.

La Figura 9A representa el sitio genómico de la integración de RHKO en el clon R27-3-35 de resistencia a la gripe y la Figura 9B es un mapa esquemático de integración.

Descripción detallada de la invención

Las realizaciones preferentes de la invención se describen a continuación. A menos que se indique específicamente, se pretende que los expertos habituales en la materia o materias aplicables proporcionen a los términos y expresiones en la memoria descriptiva y reivindicaciones el significado habitual y acostumbrado. Si se pretende cualquier otro significado, la memoria descriptiva indicará específicamente que se va a aplicar un significado especial a un término o expresión.

Además se pretende que las invenciones no se limiten solamente a la estructura, material o acciones específicos que se describen en las organizaciones preferentes, sino que además, incluyan todas y cada una de las estructuras, materiales o acciones que realicen la función reivindicada, junto con todos y cada uno de las estructuras, materiales o acciones conocidos o desarrollados posteriormente para realizar la función reivindicada.

A través de la divulgación existen ejemplos adicionales, y no es la intención del solicitante excluir del alcance de su invención el uso de estructuras, materiales, métodos, o acciones que no se identifican de forma expresa en la memoria descriptiva, pero que sin embargo son capaces de realizar una función reivindicada.

La presente invención se dirige por lo general a composiciones y métodos para el tratamiento y prevención de la gripe; y a la identificación de nuevos agentes terapéuticos para la gripe. La presente invención se basa en el hallazgo de que la modulación de determinada expresión genética conduce a resistencia hacia la infección por el virus de la gripe.

Definiciones y Expresiones

Para facilitar una comprensión de la presente invención, a continuación se define una serie de términos y expresiones.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "gen de resistencia a la gripe (IRG)" se refiere a un gen cuya inhibición o sobreexpresión conduce a resistencia a la infección por el virus de la gripe. Por lo general, los IRG se refieren a los genes que se enumeran en la Tabla 3.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "polinucleótido relacionado con IRG", "IRG-polinucleótido" e "IRGPN" se usan indistintamente. Las expresiones incluyen un polinucleótido transcrito (por ejemplo, ADN, ADNc o ARNm) que comprenden una de las secuencias de IRG o una porción de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "polipéptido relacionado con IRG (IRGPP)", "proteína de IRG" e "IRGPP" se usan indistintamente. Las expresiones incluyen polipéptidos codificados por un IRG, un IRGPN, o una población de un IRG o IRGPN.

Tal como se usa en el presente documento, un "producto de IRG" incluye una secuencia de ácidos nucleicos y una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido) generadas cuando se transcribe y/o se

traduce un IRG. De forma específica, los productos de IRG incluyen los IRGPN y los IRGPP.

Tal como se usa en el presente documento, una "variante de un polinucleótido" incluye un polinucleótido que difiere del polinucleótido original en una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de modo que la actividad del polipéptido codificado no cambia básicamente (por ejemplo, la actividad de disminuir o aumentar, en menos de un 50 %, y preferentemente menos de un 20 %) con respecto al polipéptido codificado por el polinucleótido original.

Una variante de un polinucleótido también incluye polinucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones de rigurosidad reducida, más preferentemente condiciones rigurosas, y lo más preferentemente condiciones de rigurosidad elevada al polinucleótido original (o una secuencia complementaria). Ejemplos de condiciones de diferente rigurosidad se enumeran en la Tabla 2,

Los expertos habituales en la materia observarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido tal como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos llevan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan de forma específica en la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, una "variante de un polipéptido" es un polipéptido que difiere de un polipéptido nativo en una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones, de modo que la bioactividad o inmunogenicidad del polipéptido nativo no disminuye básicamente. En otras palabras, la bioactividad de una variante de polipéptido o la capacidad de una variante de polipéptido para reaccionar con antisueros específicos de antígenos puede aumentar o disminuir en menos de un 50 %, y preferentemente menos de un 20 %, con respecto al polipéptido nativo. Las variantes de polipéptido se incluyen aquéllas en que se han retirado una o más porciones, tal como una secuencia directora N-terminal o dominio transmembrana. Otras variantes preferentes incluyen variantes en que se ha retirado una pequeña porción (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferentemente 5-15 aminoácidos) del extremo N y/o C de la proteína madura.

Se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de un polipéptido de la presente invención y además obtener una molécula que tiene actividad biológica y/o propiedades inmunogénicas. Dado que lo que define esa actividad biológica del polipéptido es la capacidad de interacción y la naturaleza de un polipéptido, se pueden hacer determinadas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos (o, por supuesto, su secuencia de codificación de ADN subyacente) y aún así obtener un polipéptido con propiedades similares.

En la preparación de tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. Por lo general se conoce en la técnica la importancia del índice hidropático del aminoácido a transmitir una función biológica interactiva en un polipéptido. Se cree que el carácter hidropático relativo del resto de aminoácido determina la estructura secundaria y terciaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos, y similares. En la técnica se conoce que un aminoácido se puede sustituir con otro aminoácido que tiene un similar índice hidropático y además obtener un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, es preferente la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , son particularmente preferentes las que están dentro de ± 1 , y son incluso más particularmente deferentes aquéllas dentro de $\pm 0,5$.

También se puede hacer sustitución de aminoácidos similares en base a la hidrofilia, particularmente cuando se pretende que el polipéptido o fragmento de polipéptido equivalente funcional biológico, tenga uso en realizaciones inmunológicas. La patente de Estados Unidos N° 4.554.101, expone que la hidrofilia media local más elevada de un polipéptido, que se rige por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir con una propiedad biológica del polipéptido.

Tal como se detalla en la patente de Estados Unidos N° 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia arrestos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5 \pm 1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y además obtener un equivalente biológico, y en particular, un polipéptido inmunológicamente equivalente. En tales cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de ± 2 es preferente, aquéllas que están dentro de ± 1 son particularmente preferentes, y las que están dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferentes.

Tal como se ha descrito anteriormente, por lo general, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones a modo de ejemplo que adquieren diversas de las características mencionadas anteriormente que sé tener en consideración son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e

isoleucina (Véase la Tabla 1, a continuación). Por lo tanto, la presente invención contempla equivalentes funcionales o biológicos de un IRGPP tal como se ha expuesto anteriormente.

TABLA 1. Sustituciones de Aminoácidos

Resto Original	Sustitución del Resto a Modo de Ejemplo
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
He	Leu; Val
Leu	He; Val
Lys	Arg
Met	Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

- 5 Una variante también puede, o como alternativa, contiene cambios no conservadores. En una realización preferente, la variante de polipéptido difiere de una secuencia nativa por sustitución, supresión o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también se pueden (o como alternativa) modificar con, por ejemplo, la supresión o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la inmunogenicidad, estructura secundaria, estructura terciaria, y naturaleza hidropática del polipéptido.
- 10 Las variantes de polipéptidos presentan preferentemente una homología de al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % con el polipéptido original.
- 15 Una variante de polipéptido también incluye un polipéptido que se modifica a partir de polipéptido original mediante procesos naturales, tales como procesamiento después de la traducción, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Las modificaciones se pueden producir en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo la estructura principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se observará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos grados o
- 20 variables en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados, y ramificados cíclicos pueden resultar de procesos naturales después de la traducción o se pueden preparar con métodos de síntesis. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un
- 25 fluoróforo o un cromóforo, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación,
- 30 prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinación.

5 Tal como se usa en el presente documento, una "porción biológicamente activa" de un IRGPP incluye un fragmento de un IRGPP que comprende secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas con o derivadas de la secuencia de aminoácidos del IRGPP, que incluye menos aminoácidos que el IRGPP de longitud completa, y presenta al menos una actividad del IRGPP. Por lo general, una porción biológicamente activa de un IRGPP comprende un dominio o motivo con al menos una actividad del IRGPP. Una porción biológicamente activa de un IRGPP puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 200 o más aminoácidos de longitud. Las porciones biológicamente activas de un IRGPP se pueden usar como dianas para desarrollar agentes que modulan una actividad mediada por IRGPP.

10 Tal como se usa en el presente documento, una "porción inmunogénica", un "antígeno", un "inmunógeno", o un "epítipo" de un IRGPP incluye un fragmento de un IRGPP que comprende una secuencia de aminoácidos suficientemente homóloga con, o derivada de, la secuencia de aminoácidos del IRGPP, que incluye menos aminoácidos que el de longitud IRGPP completa y se pueden usar para inducir un anti-IRGPP humoral y/o respuesta inmune celular.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "modulación" incluye, en sus diversas formas gramaticales (por ejemplo, "modulado", "modulación", "que modula", etc.), aumento de la regulación, inducción, estimulación, potenciación, y/o alivio de la inhibición, así como inhibición y/o disminución de la regulación o supresión.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias de control" o "secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de forma operativa en un organismo huésped en particular. La expresión "secuencia de control/reguladora" pretende incluir promotores, potencia errores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias de control/reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido).

30 Una secuencia de ácidos nucleicos se "une de forma operativa" otra secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera se coloca en una relación funcional con la última. Por ejemplo, un ADN para un péptido director de secuencia previa o secretora se une de forma operativa al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une de forma operativa a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas se une de forma operativa a una secuencia de codificación si se coloca con el fin de facilitar la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, en el caso de un 35 una directora secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciales no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue por ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

40 Tal como se usa en el presente documento, la "rigurosidad" de una reacción de hibridación se refiere a la dificultad con la que cualquiera de dos moléculas de ácido nucleico se hibridarán entre sí. La presente divulgación también incluye polinucleótidos capaces de hibridarse en condiciones de rigurosidad reducida, más preferentemente condiciones rigurosas, y lo más preferentemente condiciones muy rigurosas, a polinucleótidos que se describen en el presente documento. Ejemplos de ejemplos de rigurosidad se muestran en la Tabla 2 que si a continuación: las condiciones muy rigurosas son aquellas que son al menos tan rigurosas como las condiciones A-F; las condiciones 45 rigurosas son al menos tan rigurosas como las condiciones G-L; y las condiciones de rigurosidad reducida son al menos tan rigurosas como las condiciones M-R.

Tabla 2. Condición de Rigurosidad

Condición de Rigurosidad	Híbrido de Polinucleótido	Longitud del Híbrido (bp) ¹	Temperatura de Hibridación y Tampón ¹¹	Temp. de Lavado y Tampón ¹¹
A	ADN:ADN	> 50	65 °C; 1 x SSC - o - 42 °C; 1 x SSC, formamida al 50 %	65 °C; 0,3 x SSC
B	ADN:ADN	< 50	T _B *; 1 x SSC	T _B *; 1 x SSC
C	ADN:ARN	> 50	67 °C; 1 x SSC - o - 45 °C; 1 x SSC, formamida al 50 %	67 °C; 0,3 x SSC
D	ADN:ARN	< 50	T _D *; 1 x SSC	T _D *; 1 x SSC
E	RNA:RNA	> 50	70 °C; 1 x SSC - o - 50 °C; 1 x SSC, formamida al 50 %	70 °C; 0,3 x SSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F *; 1 x SSC	T _F *; 1 x SSC

Condición de Rigurosidad	Híbrido de Polinucleótido	Longitud del Híbrido (bp) ¹	Temperatura de Hibridación y Tampón ^H	Temp. de Lavado y Tampón ¹¹
G	ADN:ADN	> 50	65 °C; 4 x SSC - o -42 °C; 4 x SSC, formamida al 50 %	65 °C; 1 x SSC
H	ADN:ADN	< 50	T _H *; 4 x SSC	T _H *; 4 x SSC
I	ADN:ARN	> 50	67 °C; 4 x SSC - o - 45 °C; 4 x SSC, formamida al 50 %	67 °C; 1 x SSC
J	ADN:ARN	< 50	T _J *; 4 x SSC	T _J *; 4 x SSC
K	RNA:RNA	> 50	70 °C; 4 x SSC - o - 50 °C; 4 x SSC, formamida al 50 %	67 °C; 1 x SSC
L	RNA:RNA	< 50	T _L *; 2 x SSC	T _L *; 2 x SSC
M	ADN:ADN	> 50	50 °C; 4 x SSC - o - 40 °C; 6 x SSC, formamida al 50 %	50 °C; 2 x SSC
N	ADN:ADN	< 50	T _N *; 6 x SSC	T _N *; 6 x SSC
O	ADN:ARN	> 50	55 °C; 4 x SSC - o - 42 °C; 6 x SSC, formamida al 50 %	55 °C; 2 x SSC
P	ADN:ARN	< 50	T _P *; 6 x SSC	T _P *; 6 x SSC
Q	RNA:RNA	> 50	60 °C; 4 x SSC - o - 45 °C; 6 x SSC, formamida al 50 %	60 °C; 2 x SSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R *; 4 x SSC	T _R *; 4 x SSC

¹: La longitud del híbrido es la que se prevé para la región o regiones hibridadas de los polinucleótidos de hibridación. Cuando un polinucleótido se hibrida a un polinucleótido diana de secuencia desconocida, se supone que la longitud del híbrido es la del polinucleótido de hibridación. Cuando se hibridan polinucleótidos de secuencia conocida, la longitud del híbrido se puede determinar por alineación de las secuencias de los polinucleótidos e identificación de la región o regiones de complementariedad de secuencias óptima.

^H: SSPE (1 x SSPE es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM, y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se puede sustituir por SSC (1 x SSC es NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM) en la hibridación y tampones de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de la hibridación sea completa. T_B* - T_R*: La temperatura de hibridación para los híbridos que se calcula que son inferiores a 50 pares de bases de longitud debería ser 5-10 °C menor que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos con menos de 18 pares de bases de longitud, T_m (°C) = 2(Nº de A + T bases) + 4(Nº de G + C bases). Para híbridos entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T_m (°C) = 81,5 + 16,6 (log₁₀ Na⁺) + 0,41(% de G+C) - (600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y Na⁺ es la concentración de iones sodio en el tampón de hibridación (Na⁺ para 1 x SSC = 0,165 M).

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "unión inmuno-específica" y "que se vulnere forma específica a" se refieren a anticuerpos que se unen a un antígeno con una afinidad de unión de 10⁵ M⁻¹.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", y "terapia" se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica, y terapia preventiva.

En las siguientes subsecciones se describen con detalle diversos aspectos de la invención. Las subsecciones que siguen a continuación describen con más detalle la presente invención. El uso de subsecciones no pretende limitar la invención; las subsecciones se pueden aplicar a cualquier aspecto de la invención.

10

Genes de resistencia a la gripe (IRG)

15

Un aspecto de la presente invención se refiere a genes de resistencia a la gripe (IRG). En resumen, se infectaron células de Riñón Canino Madin Darby (MDCK) con un vector genosuprimido homocigoto con base retro-viral (RHKO). Se seleccionaron células que contenían el vector integrado de forma estable y se sometieron a infección por gripe usando la MOI que daría como resultado la eliminación de un 100 % de las células precursoras entre 48 y 72 horas. Las células de resistencia a la gripe se expandieron y se sometieron a rondas adicionales de infección con gripe con mayor multiplicidad de infección (MOI). Se recuperaron los clones resistentes que sobrevivieron a múltiples rondas de infección con gripe. El fenotipo de resistencia a la gripe se validó sometiendo a ensayo la resistencia de los clones a múltiples cepas del virus de la gripe y por correlación del fenotipo con integración de RHKO. Los sitios de integración de RHKO en las células de resistencia se clonaron a continuación y se identificaron. Los genes

20

afectados se identifican por alineación de las secuencias de flaqueo en el sitio de integración con la base de datos de Genbank. Se debería indicar que los genes afectados, que en lo sucesivo en el presente documento se denominan genes de resistencia a la gripe, se subexpresan (es decir, se inhiben mediante la integración de RHKO) o se sobreexpresan (es decir, aumentan mediante la integración de RHKO) en las células de resistencia a la gripe.

5 La Tabla 3 proporciona una lista de los genes que, cuando se sobreexpresan o se subexpresan en una célula, conducen la resistencia a la infección por el virus de la gripe. Por consiguiente, los genes que se enumeran en la Tabla 3 se denominan genes de resistencia a la gripe (IRG).

Gen	ID del Sitio	Sec de flaqueo en la posición 5' en el sitio de inserción	Secuencia de ADNc	Secuencia de aminoácidos	Efecto de integración predicho
PTCH	5727	SEC ID N°: 1	SEC ID N°: 9	SEC ID N°: 17	antisentido
PSMD2	5708	SEC ID N°: 2	SEC ID N°: 10	SEC ID N°: 18	sobreexpresión
NMT1	4836	SEC ID N°: 3	SEC ID N°: 11	SEC ID N°: 19	sobreexpresión
MARCO	8685	SEC ID N°: 4	SEC ID N°: 12	SEC ID N°: 20	alteración del promotor
CDK6	1021	SEC ID N°: 5	SEC ID N°: 13	SEC ID N°: 21	alteración del promotor
FLJ16046	389208	SEC ID N°: 6	SEC ID N°: 14	SEC ID N°: 22	sobreexpresión
PCSK6	5046	SEC ID N°: 7	SEC ID N°: 15	SEC ID N°: 23	antisentido
PTGDR	5729	SEC ID N°: 8	SEC ID N°: 16	SEC ID N°: 24	antisentido

10 En resumen, el PTCH (homólogo patched de *Drosophila*) codifica un miembro de la familia de genes patched. La proteína codificada es el receptor de sonic hedgehog, una molécula secretada implicada en la formación de estructuras embrionarias y en la tumorigénesis. Este gen funciona como un supresor tumoral. Las mutaciones de este gen se han asociado con el síndrome de carcinoma nevoide de células basales, carcinoma esofágico de células escamosas, tricoepiteliomas, carcinomas de células transicionales de la vejiga, así como holoprosencefalia. Se han descrito variantes empalmadas alternativas, pero no se han determinado sus secuencias de longitud completa.

15 La subunidad 26S de PSMD2 (proteasoma (prosome, macropaina), no ATPasa 2) codifica un complejo de multicatalítico de proteinasa con una estructura altamente ordenada formada por 2 complejos, un núcleo 20S y un regulador 19S. El núcleo 20S está formado por 4 anillos de 28 subunidades no idénticas; 2 anillos están formados por 7 subunidades alfa y 2 anillos están formados por 7 subunidades beta. El regulador 19S está formado por una base, que contiene 6 subunidades de ATPasa y 2 subunidades de no ATPasa, y una tapa, que contiene hasta 10 subunidades de no ATPasa. Los proteasomas se distribuyen a través de células eucariotas a una concentración elevada y escinden péptidos en un proceso dependiente de ATP/ubiquitina en una ruta no lisosómica. Una función esencial de un proteasoma modificado, el inmunoproteasoma, es el procesamiento de péptidos MHC de clase I. Este gen codifica una de las subunidades de no ATPasa de la tapa reguladora 19S. Además de la participación en la función del proteasoma, esta subunidad también puede participar en la ruta de señalización de TNF ya que interactúa con el receptor de tipo 1 del factor de necrosis tumoral. En el cromosoma 1 se ha identificado un pseudogén.

20 La NMT1 (N-miristoiltransferasa 1) codifica la N-Miristoiltransferasa que es una enzima eucariota esencial que cataliza la transferencia cotranslacional y/o posttranslacional del miristato al resto de glicina amino terminal de un número de proteínas importantes especialmente las tirosina quinasas no receptoras cuya actividad es importante para la tumorigénesis. Se encontró que la NMT humana estaba fosforilada por miembros de la familia de tirosina quinasas no receptoras de Lyn, Fyn y Lck y desfosforilada por la proteína fosfatasa dependiente de Ca(2+)/calmodulina, calcineurina. La NMT se ha asociado con la formación y gemación de partículas del VIH. La línea CEM/LAV-1 de linfocitos T infectados con el VIH-1 de forma crónica presenta bajos niveles de expresión de NMT (Takamune *et al.*, FEBS Lett. 506: 81-84, 2001).

30 El MARCO (receptor de macrófagos con estructura de colágeno) codifica un miembro de la familia del receptor neutralizante de clase A que es parte del sistema inmune antimicrobiano innato. La proteína puede unir bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas a través de un dominio rico en cisteína neutralizante (SRCR) extracelular, C-terminal. Además de los dominios citoplasmático corto y de transmembrana, existe un dominio espaciador extracelular y un dominio de colágeno extracelular, largo. La proteína puede formar una molécula trimérica mediante la asociación de los dominios de colágeno que tres cadenas de polipéptidos idénticas.

40 La CDK6 (quinasa dependiente de ciclina) codifica un miembro de la familia de proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK). Los miembros de la familia CDK son muy similares a los productos genéticos *cdc28* de *Saccharomyces cerevisiae*, y *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe*, y se sabe que son reguladores importantes de

la progresión del ciclo celular. Esta quinasa es una subunidad catalítica del complejo de proteína quinasa que es importante para la progresión de la fase G1 del ciclo celular y la transición de G1/S. La actividad de esta quinasa aparece primero en la fase media de G1, que se controla con las subunidades reguladoras que incluyen ciclinas de tipo D y miembros de la familia INK4 de inhibidores de CDK. Se ha mostrado que esta quinasa, así como CDK4 se fosforilan, y por lo tanto regulan la actividad de la proteína Rb supresora tumoral.

FLJ16046 codifica el último exón de una proteína nueva. La proteína comparte cierta homología con un dominio encontrado en proteína de esperma de erizo de mar, la enteroquinasa, y el dominio trans membrana de la serina proteasa similar a la tirosina.

La PCSK6 (proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 6) codifica una proteína de la familia de proproteína convertasa similar a la subtilisina. Los miembros de esta familia son proproteínas convertasas que procesan proteínas precursoras latentes en sus productos biológicamente activos. Esta proteína codificada es una serina endoproteasa dependiente de calcio que puede escindir proteínas precursoras en sus sitios de procesamiento de aminoácidos básicos emparejados. Algunos de sus sustratos son – proteínas relacionadas con el factor de crecimiento transformante beta, proalbúmina, y factor de von Willebrand. Se cree que este gen desempeña un papel en la progresión tumoral. Existen ocho variantes de transcripto empalmadas alternativamente que codifican diferentes isoformas descritas para este gen.

El PTGDR (receptor D2 de prostaglandina (DP)) codifica un receptor acoplado a la proteína G que se ha mostrado que funciona como un receptor del prostanoide DP. La actividad de este receptor está mediada principalmente por las proteínas G-S que estimulan la adenilato ciclasa dando como resultado una elevación de cAMP y Ca²⁺ intracelulares. Los estudios de genosupresión en ratones sugieren que el ligando de este receptor, la prostaglandina D2 (PGD2), funciona como un mediador derivados de mastocitos para desencadenar respuestas asmáticas.

IRG y productos de IRG como dianas terapéuticas para la gripe

En general, la Tabla 3 proporciona genes que se relacionan con una susceptibilidad de la célula hacia la infección por el virus de la gripe. Los IRG de la Tabla 3, así como los productos de IRG correspondientes (IRGPN e IRGPP) se pueden convertir en nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento y la prevención de la gripe. Los IRG se pueden usar para producir anticuerpos específicos para productos de IRG, y para construir vectores de terapia genética que inhiban el desarrollo de la gripe. Además, los productos de IRG en sí mismos se pueden usar como agente terapéutico para la gripe.

Los IRG enumerados en la Tabla 3 se pueden administrar con fines de terapia genética, incluyendo la administración de ácidos nucleicos antisentido y ARNi. Los productos de IRG (incluyendo los IRGPP y los IRGPN) y modulador de productos de IRG (tal como anticuerpos anti-TRGPP) también se creen administrar como fármacos terapéuticos.

Por ejemplo, la inhibición de la expresión de PTCH de IRG conduce a resistencia hacia la infección por el virus de la gripe. Por consiguiente, la gripe se puede prevenir o tratar por disminución de la regulación de la expresión de PTCH. De forma análoga, la sobreexpresión de NMT1 de IRG conduce resistencia hacia la infección por el virus de la gripe. Por consiguiente, la gripe se puede prevenir o tratar aumentando la expresión de NMT1.

Fuentes de productos de IRG

Los productos de IRG (los IRGPN y los IRGPP) que se describen en el presente documento se pueden aislar a partir de cualquier tejido o célula de un sujeto. Para un experto en la materia será evidente que los fluidos corporales, tales como sangre, también pueden servir como fuentes a partir de las que se puede evaluar el producto de IRG que se describe en el presente documento. Una muestra biológica puede comprender componentes biológicos tales como plasma sanguínea, suelo, eritrocitos, leucocitos, plaquetas sanguíneas, linfocitos, macrófagos, células de fibroblastos, mastocitos, células grasas, células neuronales o células epiteliales. Las muestras de tejido que contienen uno o más de los productos de IRG por sí mismas pueden ser útiles en los métodos que se describen en el presente documento y un experto en la materia reconocerá los métodos con los que se pueden obtener, almacenar y/o conservar tales muestras.

Polinucleótidos aislados

En el presente documento se describen polinucleótidos aislados. También se describen fragmentos de polinucleótidos aislados suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar un IRGPN en una muestra, así como fragmentos de nucleótidos para uso como sondas/cebadores de PCR de la amplificación o mutación de las moléculas de ácido nucleico que codifican los IRGPP que se describen en el presente documento.

Se describe una molécula de IRGPN donde, por ejemplo, se puede aislar una molécula de polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de uno de los IRG que se enumeran en la Tabla 3, o homólogos de los mismos, o una porción de los mismos, usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de la secuencia que se proporciona en el presente documento, así como la información de la secuencia conocida en la técnica. Usando

toda o una parte de la secuencia de polinucleótidos de uno de los IRG que se enumeran en la Tabla 3 (o un homólogo de la misma) como una sonda de hibridación, se puede aislar un IRG de la invención o un IRGPN de la invención usando técnicas convencionales de hibridación y de clonación.

5 Un IRGPN que se describe en el presente documento se puede amplificar usando ADNc, ARNm o como alternativa, ADN genómico, como un molde y cebadores de polinucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación de PCR convencionales. El polinucleótido ampliado de este modo se puede clonar en un vector apropiado y caracterizar mediante análisis de secuencias de ADN. Además, se pueden preparar oligonucleótidos que corresponden a secuencias de nucleótidos de IRG que se describen en el presente documento mediante técnicas de
10 síntesis convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

Como alternativa, existen numerosas técnicas de amplificación para obtener una secuencia de codificación de longitud completa de una secuencia de ADNc parcial. Dentro de tales técnicas, la amplificación se lleva a cabo generalmente a través de PCR. Se puede usar cualquier de una diversidad de kits disponibles en el mercado para llevar a cabo la etapa de amplificación. Los cebadores se pueden diseñar usando, por ejemplo, software bien conocido en la técnica. Una de estas técnicas de amplificación es la PCR inversa, que usa enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. Una variación de este procedimiento, que usa dos cebadores que inician la extensión en direcciones opuestas desde la secuencia conocida, se describe en el documento de patente WO 96/38591.
15

Otra de estas técnicas se conoce como "amplificación rápida de extremos de ADNc" o RACE. Esta técnica implica el uso de un cebador interno y un cebador externo, que hibrida con una región poliA o secuencia vector, para identificar secuencias que están en las posiciones 5' y 3' de una secuencia conocida. Las técnicas adicionales incluyen PCR de captura (Lagerstrom *et al.*, PCR Methods Applic. 1: 11-19, 1991) y PCR en avance (Parker *et al.*, Nucl. Acids. Res. 19: 3055-60, 1991). Otros métodos que usan amplificación también se pueden usar para obtener una secuencia de ADNc de longitud completa.
20

En ciertos casos, es posible obtener una secuencia de ADNc de longitud completa por análisis de secuencias proporcionadas en una base de datos de marca de secuencia expresada (EST), tal como la disponible en GenBank. Las búsquedas de EST de solapamiento generalmente se pueden llevar a cabo usando programas bien conocidos (por ejemplo, búsquedas BLAST del NCBI), y tales EST se pueden usar para generar una secuencia de longitud completa contigua. También se pueden obtener secuencias de ADN de longitud completa mediante el análisis de fragmentos genómicos.
25

En otra realización preferente, una molécula de polinucleótido aislado que se describe en el presente documento puede comprender una molécula de polinucleótido que es un complemento de la secuencia de nucleótidos de un IRG enumerado en la Tabla 3, u homólogo del mismo, un IRGPN que se describe en el presente documento, o una porción de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos. Una molécula de polinucleótido que es complementaria a tal secuencia de nucleótidos es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos de tal manera que se puede hibridar con la secuencia de nucleótidos, formando de este modo un dúplex estable.
30

La molécula de polinucleótido que se describe en el presente documento, por otra parte, puede comprender solo una porción de la secuencia de polinucleótidos de un IRG, por ejemplo, un fragmento que se puede usar como una sonda o cebador. La sonda/cebador comprende por lo general un oligonucleótido básicamente purificado. El oligonucleótido comprende por lo general una región secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 7 o 15, preferentemente aproximadamente 25, más preferentemente de aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400 o más nucleótidos consecutivos de un IRG o un IRGPN que se describen en el presente documento.
35

Las sondas basadas en la secuencia de nucleótidos de un IRG o un IRGPN que se describen en el presente documento se pueden usar para detectar transcritos o secuencias genómicas correspondientes al IRG o IRGPN que se describen en el presente documento. En realizaciones preferentes, la sonda comprende un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Tales sondas se pueden usar como parte de un kit de diagnóstico para identificar células o tejido que expresan de forma errónea (por ejemplo, sobre- o subexpresan) un IRG, o que tienen un número mayor o menor de copias de un IRG. Por ejemplo, se puede determinar un nivel de un producto de IRG en una muestra de células de un sujeto, o se puede evaluar la presencia de mutaciones o supresiones de un IRG que se describe en el presente documento.
40

También se describen moléculas de polinucleótidos que difieren de las secuencias de polinucleótidos de los IRG enumerados en la Tabla 3, pero que codifican las mismas proteínas que las codificadas por los genes que se muestran en la Tabla 3 debido a la degeneración del código genético.
45

También se describen homólogos de los IRG que se enumeran en la Tabla 3 de otras especies. Los genes homólogos se entienden bien en la técnica y están disponibles usando bases de datos o herramientas de búsqueda tales como la base de datos Pubmed-Entrez.
50

También se describen moléculas de polinucleótidos que son estructuralmente diferentes de las moléculas que se han descrito anteriormente (es decir, que tienen una secuencia alterada leve), pero que tienen básicamente las mismas propiedades que las moléculas anteriores (por ejemplo, secuencias de aminoácidos codificadas, o que cambian solamente en restos de aminoácidos no esenciales). Tales moléculas incluyen variantes alélicas, y se describen con mayor detalle en subsecciones en el presente documento.

Además de las secuencias de nucleótidos de los IRG enumerados en la Tabla 3, los expertos en la materia observarán que pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los IRG enumerados en la Tabla 3 dentro de una población (por ejemplo, la población humana). Tal polimorfismo genético en los IRG enumerados en la Tabla 3 puede existir entre individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Un alelo es uno de un grupo de genes que se producen alternativamente en un locus genético dado. Además, se observará que también pueden existir polimorfismos de ADN que afectan a los niveles de expresión del ARN que pueden afectar al nivel de expresión general de ese gen (por ejemplo, al afectar a la regulación o la degradación). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "variante alélica" incluye una secuencia de nucleótidos que se produce en un locus dado o en un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos.

Se pueden aislar moléculas de polinucleótidos correspondientes a las variantes alélicas naturales y homólogos de los IRG en base a su homología con los IRG enumerados en la Tabla 3, usando los ADNc que se desvelan en el presente documento, o una porción del mismo, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas convencionales de hibridación en condiciones de hibridación rigurosas. Las moléculas de polinucleótidos correspondientes a las variantes alélicas naturales y homólogos de los IRG que se describen en el presente documento se pueden aislar aún más mediante la asignación al mismo cromosoma o locus que los IRG que se describen en el presente documento.

En otra realización, una molécula de polinucleótido aislado que se describen el presente documento puede tener una longitud de al menos 15, 20, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 o más nucleótidos y se hibridar en condiciones rigurosas con una molécula de polinucleótido que corresponde a una secuencia de nucleótidos de un IRG que se describe en el presente documento. Preferentemente, la molécula de polinucleótido aislado que se describe en el presente documento se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de uno de los IRG que se establecen en la Tabla 3, o corresponde a una molécula de polinucleótido de origen natural.

Además de variantes alélicas de origen natural del IRG que se describe en el presente documento que pueden existir en la población, el experto en la materia observará además que se pueden introducir cambios por mutación en las secuencias de nucleótidos de los IRG que se describen en el presente documento, conduciendo de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas, sin alterar la actividad funcional de estas proteínas. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos "no esenciales". Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que se puede alterar desde la secuencia de tipo silvestre de una proteína sin alterar la actividad biológica, mientras que un resto de aminoácido "esencial" es necesario para la actividad biológica. Por ejemplo, se predice que los restos de aminoácidos que se conservan entre variantes alélicas u homólogos de un gen (por ejemplo, entre los homólogos de un gen de diferentes especies) son particularmente susceptibles de alteración.

Los polinucleótidos de un IRG pueden comprender una o más mutaciones. Se puede crear una molécula aislada de polinucleótido que codifica una proteína con una mutación en un IRGPP que se describe en el presente documento introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica el IRGPP, de modo que se introducen una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la proteína codificada. Tales técnicas se conocen bien en la técnica. Se pueden introducir mutaciones en el IRG que se describe en el presente documento mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se hacen sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más restos de aminoácidos no esenciales predichos. Como alternativa, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia de codificación de un IRG que se describe en el presente documento, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden identificar sistemáticamente por la actividad biológica para identificar mutantes que mantienen actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de forma recombinante y se puede determinar la actividad de la proteína.

Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente para aumentar la estabilidad *in vivo*. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias de flanqueo en los extremos 5' y/o 3'; el uso de fosforotioato o 2 O-metilo en lugar de enlaces fosfodiéstera en la cadena principal; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wibutosina, así como acetil- metil-, tio- y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

También se describen moléculas aisladas de polinucleótido, que son antisentido a los IRG que se describen en el presente documento. Un polinucleótido "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es

complementaria a un polinucleótido "sentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la hebra de codificación de una molécula de ADN bicatenario o complementaria a una secuencia de ARNm. Por consiguiente, un polinucleótido antisentido puede presentar enlace de hidrógeno con un polinucleótido sentido. El polinucleótido antisentido puede ser complementario a una hebra de codificación completa de un gen que se describe en el presente documento o solamente a una porción del mismo. En una realización, una molécula de polinucleótido antisentido es antisentido a una "región de codificación" de la hebra de codificación de una secuencia de nucleótidos que se describe en el presente documento. La expresión "región de codificación" incluye la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en aminoácidos. En otra realización, la molécula de polinucleótido antisentido es antisentido a una "región no codificante" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que se describe en el presente documento.

Los polinucleótidos antisentido que se describen en el presente documento se pueden diseñar de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de polinucleótido antisentido puede ser complementaria a toda la región de codificación de un ARNm que corresponde a un gen que se describe en el presente documento pero más preferentemente es un oligonucleótido que es antisentido solamente a una porción de la región de codificación o no codificante. Un oligonucleótido antisentido puede tener una longitud, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos. Un polinucleótido antisentido que se describe en el presente documento se puede construir usando síntesis química y reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polinucleótido antisentido se puede sintetizar químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de formas diversas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los polinucleótidos antisentido y sentido, por ejemplo, se pueden usar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar el polinucleótido antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladeninpara, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster de metilo del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el polinucleótido antisentido se puede producir biológicamente usando un vector de expresión en que se ha subclonado un polinucleótido en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito desde el polinucleótido insertado tendrá una orientación antisentido con respecto a un polinucleótido diana de interés, que se describe adicionalmente en la siguiente subsección).

Las moléculas de polinucleótido antisentido que se describen en el presente documento por lo general se administran a un sujeto o se generan *in situ* de tal manera que las mismas se hibridan con o se unen a ARNm celular y/o ADN genómico que codifica un IRGPP que se describe en el presente documento para inhibir de ese modo la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación se puede producir por complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en los casos de una molécula de polinucleótido antisentido que se une a un dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de polinucleótidos antisentido que se describen en el presente documento incluye inyección directa en un sitio de tejido. Como alternativa, las moléculas de polinucleótido antisentido se pueden modificar para que se dirijan a células seleccionadas y a continuación se pueden administrar de forma sistémica. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido se pueden modificar de tal manera que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, mediante la unión de las moléculas de polinucleótido antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores de superficie celular o antígenos. Las moléculas de polinucleótido antisentido también se pueden administrar a las células usando los vectores que se describen en el presente documento. Para conseguir concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se colocan constructos de vectores que comprenden las moléculas de polinucleótido antisentido preferentemente bajo el control de un promotor fuerte.

En otra realización más, la molécula de polinucleótido antisentido que se describe en el presente documento puede ser una molécula de polinucleótido anomérica. Una molécula de polinucleótido anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en que, al contrario de las habituales, unidades, las hebras van paralelas entre sí. La molécula de polinucleótido antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido o a un análogo de ARN-ADN quimérico.

Además, en otra realización, un polinucleótido antisentido que se describe en el presente documento es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un polinucleótido monocatenario, tal como un ARNm, con los que tienen una región complementaria. Por lo tanto, se pueden usar ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo) para escindir de forma catalítica de ARNm de los IRG que se describen en el presente documento para inhibir de ese modo la traducción del ARNm. Se puede diseñar una ribozima que tenga especificidad por un IRGPN en base a la secuencia de nucleótidos del IRGPN.

Como alternativa, se puede usar ARNm transcrito a partir de un IRG para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Como alternativa, se puede inhibir la expresión de un IRG que se describe en el presente documento dirigiendo secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del IRG (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen en las células diana.

La expresión de los IRG que se describen en el presente documento también se puede inhibir usando ARN de interferencia ("RNA_i"). Esta es una técnica para el silenciamiento genético después de la traducción ("PTGS"), en que la actividad del gen diana se suprime específicamente con ARN bicatenario similar ("ARNds"). El ARNi implica un proceso en que el ARNds se escinde en ARN de interferencia corto de ~23 bp (los ARNsi) mediante una enzima denominada Dicer (Hamilton y Baulcombe, *Science* 286: 950,1999), produciendo de este modo múltiples moléculas de "activación" a partir del ARNds individual original. El complejo ARNsi-Dicer recluta componentes adicionales para formar un Complejo de Silenciamiento inducido por ARN (RISC) en que los pares de bases de ARNsi sin unir con ARNm complementario, guiando de este modo la maquinaria del ARNi al ARNm diana dando como resultado la escisión eficaz y la posterior degradación del ARNm (Hammond *et al.*, *Nature* 404: 293-296, 2000; Zamore *et al.*, *Cell* 101: 25-33; 2000; Pham *et al.*, *Cell* 117: 83-94, 2004). De esta manera, el RISC activado se podría dirigir potencialmente a múltiples ARNm, y por lo tanto funcionar de forma catalítica.

La tecnología de ARNi se desvela, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.919.619 y en la Publicación de PCT N° WO99/14346 y N° WO01/29058. Por lo general, se introduce ARNds de aproximadamente 21 nucleótidos, como loco al gen diana, en la célula y se observa una reducción específica de secuencia en la actividad genética.

En otra realización más, las moléculas de polinucleótido que se describen en el presente documento se puede modificar en el resto de base, resto de azúcar o cadena principal de fosfato para mejorar la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la cadena principal de fosfato de desoxirribosa de las moléculas de polinucleótido se puede modificar para generar polinucleótidos de péptidos. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "polinucleótidos de péptidos" o "PNA" se refieren a miméticos de polinucleótidos, por ejemplo, miméticos de ADN, en que la cadena principal de fosfato de desoxirribosa se sustituye por una cadena principal pseudopeptídica y solamente se mantienen las cuatro nucleobases naturales. Se ha demostrado que la estructura principal neutra de los PNA permite la hibridación específica al ADN y ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA se puede realizar usando protocolos convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida.

Los PNA se pueden usar en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, los PNA se pueden usar como agentes antisentido para la modulación específica de secuencias de la expresión de IRG, por ejemplo, por inducción de la transcripción o la detención de la traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA de las moléculas de polinucleótido que se describen en el presente documento se pueden usar en el análisis de mutaciones de un solo par de bases en un gen, (por ejemplo, mediante sujeción de PCR dirigida por PNA). También pueden servir como enzimas de restricción artificiales cuando se usan en combinación con otras enzimas (por ejemplo, nucleasas S1) o como sondas o cebadores para la secuenciación o hibridación de ADN.

En otra realización, los PNA se pueden modificar, (por ejemplo, para mejorar su estabilidad o absorción celular), uniendo grupos lipófilos u otros grupos auxiliares a PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de administración de fármacos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden generar quimeras de PNA-ADN de las moléculas de polinucleótido que se describen en el presente documento que pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y de ADN. Tales quimeras permiten que enzimas de reconocimiento de ADN, (por ejemplo, ADN polimerasas), interactúen con la porción de ADN mientras que la porción de PNA proporcionaría una afinidad y especificidad de unión elevadas. Las quimeras de PNA-ADN se pueden unir usando conectores de longitudes apropiadas seleccionados en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases, y orientación. Se puede realizar la síntesis de quimeras de PNA-ADN. Por ejemplo, una cadena de ADN se puede sintetizar sobre un soporte sólido usando química convencional de acoplamiento de fosforamidita. Se pueden usar análogos de nucleósidos modificados, tales como fosforamidita de 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxitimidina, como un espaciador entre el PNA y el extremo 5' del ADN. A continuación, los monómeros de PNA se acoplan de una forma escalonada para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA en la posición 5' y un segmento de ADN en la posición 3'. Como alternativa, se pueden sintetizar moléculas quiméricas con un segmento de ADN en la posición 5' y un segmento de PNA en la posición 3'.

En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir receptores de células huésped *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular o de la barrera hemato-renal (véase, por ejemplo, la Publicación de PCT N° WO 89/10134). Además, los oligonucleótidos se pueden modificar con agentes de escisión accionados por hibridación o agentes de intercalado. Para este fin, el oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula (por ejemplo, un péptido, agente de reticulación accionado por hibridación, agente de transporte, o agente de escisión accionado por hibridación). Por último, el oligonucleótido se puede marcar de forma detectable, ya sea de modo que la marca se detecta mediante la adición de otro reactivo (por ejemplo, un sustrato para una marca enzimática), o se detecta inmediatamente después de la

hibridación de los nucleótidos (por ejemplo, una marca radiactivo o una marca fluorescente).

Polipéptidos Aislados

5 En el presente documento se describen IRGPP aislados, y porciones biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos de polipéptidos adecuados para uso como inmunógenos para generar anticuerpos anti-IRGPP. En una realización, los IRGPP nativos se pueden aislar a partir de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas convencionales de purificación de proteínas. Los métodos convencionales de purificación incluyen técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas y cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, hidrofóbica, afinidad y cromatografía de HPLC en fase inversa, y cromatografía de HPLC en fase inversa, y cromatografía de HPLC en fase inversa. Por ejemplo, un IRGPP se puede purificar usando una columna convencional de anticuerpo anti-IRGPP. También son útiles las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, en conjunto con concentración de proteínas. El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso del IRGPP. En algunos casos no será necesaria purificación.

15 En otra realización, los IRGPP o los IRGPP mutados se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, un IRGPP o un IRGPP mutado se puede sintetizar de forma química usando técnicas convencionales de síntesis de péptidos.

20 También se describen variantes de los IRGPP. La variante de un IRGPP es básicamente homóloga a la del IRGPP nativo codificado por un IRG enumerado en la Tabla 3, y mantienen la actividad funcional del IRGPP nativo, pero sin embargo difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o mutagénesis, tal como se ha descrito anteriormente con detalle. Por consiguiente, en otra realización, la variante de un IRGPP es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos aproximadamente un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98% o superior con la secuencia de aminoácidos del IRGPP original.

30 En un ejemplo no limitante, tal como se usa en el presente documento, las proteínas se conocen como "homólogos" y "homólogos" en que una primera región de la proteína y una segunda región de la proteína se comparan en términos de identidad. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de polinucleótidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o polinucleótidos para la alineación óptima y se pueden ignorar las secuencias no homólogas con fines de comparación). En una realización preferente, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 %, más preferentemente al menos un 50 %, incluso más preferentemente al menos un 60 %, e incluso más preferentemente al menos un 70 %, un 80 %, o un 90 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan dos restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en el presente documento, "identidad" del aminoácido o nucleótido es equivalente a "homología" del aminoácido o nucleótido). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias.

45 La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. En una realización preferente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En aún otra realización preferente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

55 Las secuencias de polinucleótidos y proteínas que se describen en el presente documento se pueden usar adicionalmente como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar a otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLAST disponibles en el sitio web BLAST mantenido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Biblioteca Nacional de Medicina, Washington DC. USA.

60 También se describen IRGPP quimérico sobre fusión. Dentro de un IRGPP de fusión, el polipéptido puede corresponder a toda o una porción de un IRGPP. En una realización preferente, un IRGPP de fusión comprende al menos una porción biológicamente activa de un IRGPP. Dentro de la proteína de fusión, la expresión "unido de forma operativa" pretende indicar que el polipéptido relacionado con IRGPP y el polipéptido no relacionado con IRGPP se fusionan en fase entre sí. El polipéptido no relacionado con IRGPP se puede fusionar con el extremo N o con el extremo C del polipéptido relacionado con IRGPP.

Una secuencia conectora de péptidos se puede usar para separar los componentes del polipéptido relacionado con IRGPP con los del polipéptido no relacionado con IRGPP mediante una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Tal secuencia conectora de péptidos se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. Las secuencias conectoras de péptidos adecuadas se pueden elegir en base a los siguientes factores:

(1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en el polipéptido relacionado con IRGPP y el polipéptido no relacionado con IRGPP; y (3) la falta de restos hidrofóbicos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales polipeptídicos. Las secuencias conectoras de péptidos preferentes contienen restos de gly, asn y ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como thr y ala también se pretende usar en la secuencia conectora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden usar como conectores son bien conocidas en la técnica. La secuencia conectora por lo general puede tener una longitud de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. Las secuencias conectoras no se necesitan cuando el polipéptido relacionado con IRGPP y el polipéptido no relacionado con IRGPP tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que se pueden usar para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión de glutatión S-transferasa (GST)-IRGPP en que las secuencias de IRGPP se fusionan con el extremo C de las secuencias de GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de los IRGPP recombinantes.

Las proteínas de fusión de IRGPP que se describen en el presente documento se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas y administrar a un sujeto *in vivo*, tal como se describe en el presente documento. Las proteínas de fusión de IRGPP se pueden usar para que influyan en la disponibilidad de un sustrato de IRGPP. Las proteínas de fusión de IRGPP pueden ser útiles terapéutica mente para el tratamiento de, o la prevención de, daños causados por, por ejemplo, (i) modificación anómala o mutación de un IRG; (ii) regulación errónea de un IRG; y (iii) modificación anómala después la traducción de un IRGPP.

Además, las proteínas de fusión de IRGPP que se describen en el presente documento se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos anti-IRGPP en un sujeto, para purificar ligandos de IRGPP, y para identificar moléculas que inhiben la interacción de un IRGPP con un sustrato de IRGPP en ensayos de identificación sistemática.

Preferentemente, una proteína quimérica de IRGPP o de fusión que se describe en el presente documento se produce con técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntas en fase de acuerdo con técnicas convencionales. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, se puede realizar mediante amplificación de PCR de fragmentos de genes usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia genética quimérica. Además, en el mercado están disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un polinucleótido que codifica IRGPP se puede clonar en tal vector de expresión de modo que el resto de fusión se une en fase al IRGPP.

Una secuencia de señal se puede usar para facilitar la secreción y el aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias de señal por lo general se caracterizan por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente se escinde de la proteína madura durante la secreción en uno o más sucesos de escisión. Tales péptidos de señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia de señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la divulgación se refiere a los polipéptidos descritos tienen una secuencia de señal, así como a los polipéptidos a partir de los que se ha escindido proteolíticamente la secuencia de señal (es decir, los productos de escisión).

En una realización, una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de señal se puede unir de forma operativa en un vector de expresión para una proteína de interés, tal como una proteína que normalmente no se secreta o que de otro modo es difícil de aislar. La secuencia de señal dirige la secreción de la proteína, tal como a partir de un huésped eucariota en que se transforma el vector de expresión, y la secuencia de señal posterior o simultáneamente se escinde. La proteína se puede purificar fácilmente a continuación a partir del medio extracelular mediante métodos reconocidos en la técnica. Como alternativa, la secuencia de señal se puede unir a la proteína de interés usando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

La presente descripción también se refiere a variantes de los IRGPP que se describen en el presente documento que funcionan como agonistas o como antagonistas de los IRGPP. En una realización, los antagonistas o agonistas de los IRGPP se usan como agentes terapéuticos. Por ejemplo, los antagonistas de un IRG regulado por aumento que pueden disminuir la actividad o expresión de un gen de este tipo y por lo tanto mejorar la gripe en un sujeto donde el nivel o la actividad del IRG aumentan de forma anómala. En esta realización, el tratamiento de un sujeto puede comprender la administración de un antagonista donde el antagonista proporciona disminución de la actividad

o expresión del IRG diana.

En determinadas realizaciones, un agonista de los IRGPP puede retener básicamente la misma, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma de origen natural de un IRGPP o puede aumentar una actividad de un IRGPP. En determinadas realizaciones, un antagonista de un IRGPP puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del IRGPP mediante, por ejemplo, modulación competitiva de una actividad de un IRGPP. Por lo tanto, se pueden provocar efectos biológicos específicos por tratamiento con una variante de función limitada. En una realización, el tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma de origen natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma de origen natural del IRGPP.

Se pueden identificar mutantes de un IRGPP que funcionan como agonistas de IRGPP o como antagonistas de IRGPP por identificación sistemática de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, de un IRGPP para agonista o antagonista de la actividad de IRGPP. En determinadas realizaciones, tales mutantes se pueden usar, por ejemplo, como una proteína terapéutica tal como se describe en el presente documento. Una biblioteca diversa de mutantes de IRGPP se puede producir, por ejemplo, ligando de forma enzimática una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas de modo que un conjunto degenerado de secuencias de IRGPP potenciales se puede expresar como polipéptidos individuales, o como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para presentación de fagos) que contiene el conjunto de secuencias de IRGPP en el mismo. Existe una diversidad de métodos que se pueden usar para producir bibliotecas de variantes potenciales de IRGPP a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótidos. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede realizar en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético se une a continuación en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias potenciales de IRGPP. En la técnica se conocen métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados.

Además, las bibliotecas de fragmentos de una secuencia de codificación de proteína que corresponde a un IRGPP tal como se describe en el presente documento se puede usar para generar una población diversa o heterogénea de fragmentos de IRGPP para la detección y posterior selección de variantes de un IRGPP. En una realización, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencia de codificación por tratamiento de un fragmento de PCR bicatenario de una secuencia de codificación de IRGPP con una nucleasa en condiciones donde se produce mellado solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalización del ADN bicatenario, renaturalización del DNA para formar ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminación de porciones monocatenarias de dúplex reformados por tratamiento con nucleasa S1, y unión de la biblioteca del fragmento resultante en un vector de expresión. Con este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de diversos tamaños del IRGPP.

En la técnica se conocen varias técnicas para la identificación sistemáticamente de productos genéticos de bibliotecas combinatorias realizadas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para la identificación sistemática de bibliotecas de ADNc para productos genéticos que tengan una propiedad seleccionada. Las técnicas usadas más ampliamente, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para la identificación sistemática de grandes bibliotecas de genes por lo general incluyen clonación de la biblioteca genética en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y expresión de los genes combinatorios en condiciones en que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Se puede usar mutagénesis recursiva de conjunto (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de identificación sistemática para identificar variantes de IRGPP (Delgrave *et al.* Protein Engineering 6: 327-331, 1993).

Las porciones de un IRGPP o variantes de un IRGPP que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, también se pueden generar por medios de síntesis, usando técnicas bien conocidas por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, tales polipéptidos se pueden sintetizar usando cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles en el mercado, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, donde los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento. El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible en el mercado en proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), y se puede manipular de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En la técnica se conocen métodos y composiciones para identificar sistemáticamente niveles o activadores de proteínas (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.980.281, N° 5.266.464, N° 5.688.635, y N° 5.877.007).

En la presente invención se contempla que los IRGPP se escinden en fragmentos para su uso en un análisis estructural o funcional más detallado, o en la generación de reactivos tales como IRGPP y anticuerpos específicos de IRGPP. Esto se puede lograr mediante el tratamiento de polipéptido purificado o no purificado con una enzima proteolítica (es decir, una proteinasa) e incluye, pero no se limita a, serina proteinasas (por ejemplo, quimotripsina, tripsina, plasmina, elastasa, trombina, substilina) proteinasas metálicas (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, leucina aminopeptidasa, termolisina, colagenasa), tiolproteinasas (por ejemplo, papaína,

bromelina, proteinasa estreptocócica, clostripaína) y/o proteinasas ácidas (por ejemplo, pepsina, gastricsina, tripsinógeno). También se generan fragmentos de polipéptido usando medios químicos tales como tratamiento del polipéptido con bromuro de cianógeno (CNBr), ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico, ácido isobenzoico, BNPA-escatol, hidroxilamina o una solución de ácido diluido. También se usan técnicas recombinantes para producir fragmentos
5 específicos de un IRGPP.

Además, la invención también contempla que se pueden formular compuestos estéricamente similares a un IRGPP en particular para imitar las partes fundamentales de la estructura del péptido, denominados peptidomiméticos o miméticos de péptidos. Los miméticos son moléculas que contienen péptidos que imitan elementos de estructura
10 secundaria del polipéptido. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.817.879. La lógica subyacente detrás del uso de miméticos de péptidos es que la cadena principal peptídica de los polipéptidos existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácidos de una manera tal como para facilitar las interacciones moleculares, tales como las de receptor y ligando. Recientemente, se han descrito antígenos miméticos de péptidos y glicoproteínas que provocan anticuerpos protectores hacia el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, demostrando de este modo la utilidad de las aplicaciones miméticas (Moe *et al.*, *Int. Rev. Immunol.* 20: 201-20, 2001; Berezin *et al.*, *J Mol Neurosci.* 22: 33-39, 2004). Por lo tanto, las aplicaciones satisfactorias del concepto de mimético de péptido hasta ahora se han centrado en miméticos de b-vueltas dentro de polipéptidos. Se pueden predecir estructuras de b-vueltas similares dentro de un IRGPP mediante algoritmos basados en ordenadores. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.933.819 describe un método basado en red neural y sistema para identificar motivos relativos de unión de péptidos a partir de datos experimentales limitados. En particular, una red neural artificial (ANN) se entrena con péptidos con secuencia conocida y la función (es decir, la fuerza de unión) se identifica a partir de una biblioteca de presentación de fagos. A continuación, la ANN se estimula con péptidos desconocidos, y predice motivos de unión relativos. El análisis de los péptidos desconocidos valida la capacidad predictiva de la ANN. Una vez que se determinan los aminoácidos componentes de la vuelta, se pueden
20 construir miméticos para lograr una orientación espacial similar de los elementos esenciales de las cadenas laterales de los aminoácidos, tal como se analiza en la Patente de Estados Unidos N° 6.420119 y en la Patente de Estados Unidos N° 5.817.879, y en Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132, 1982; Moe y Granoff, *Int. Rev. Immunol.*, 20: 201-20, 2001; y Granoff *et al.*, *J. Immunol.*, 167: 6487-96, 2001.

30 Anticuerpos

En otro aspecto, la invención incluye un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe o un método para tratar la infección por el virus de la gripe en un mamífero.
35 También se describen anticuerpos que son específicos para los IRGPP que se describen en el presente documento o sus variantes. Preferentemente, los anticuerpos son monoclonales, y lo más preferentemente, los anticuerpos son humanizados, de acuerdo con la descripción de anticuerpos que se describe a continuación.

Un IRGPP aislado, o una porción o fragmento del mismo, se puede usar como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen al IRGPP usando técnicas convencionales para preparación de anticuerpo policlonal y monoclonal. Se puede usar un IRGPP de longitud completa o, como alternativa, la divulgación proporciona fragmentos de péptidos antigénicos del IRGPP para uso como inmunógenos. El péptido antigénico de un IRGPP comprende al menos 8 restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos codificada por un IRG expuesto en la Tabla 3 o un homólogo del mismo, e incluye un epítipo de un IRGPP de tal forma que un anticuerpo generado frente al péptido forma un complejo inmune específico con el IRGPP. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos 8 restos de aminoácidos, más preferentemente al menos 12 restos de aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 16 restos de aminoácidos, y lo más preferentemente al menos 20 restos de aminoácidos.

Por lo general, se pueden identificar porciones inmunogénicas (epítipos) usando técnicas bien conocidas. Tales técnicas incluyen identificación sistemática de polipéptidos para la capacidad para reaccionar con anticuerpos específicos de antígenos, antisueros y/o líneas de linfocitos T o clones. Tal como se usa en el presente documento, antisueros y anticuerpos son "específicos de antígenos" si se unen a un antígeno con una afinidad de unión igual a, o superior a 10^5 M^{-1} . Tales antisueros y anticuerpos se pueden preparar tal como se describe en el presente documento, y usando técnicas bien conocidas. Un epítipo de un IRGPP es una porción que reacciona con tales antisueros y/o linfocitos T a un nivel que no es básicamente inferior a la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo de reactividad de ELISA y/o linfocitos T). Tales epítipos pueden reaccionar dentro de tales ensayos a un nivel que es similar a o superior a la reactividad del polipéptido de longitud completa. Tales identificaciones sistemáticas se pueden realizar generalmente usando métodos bien conocidos por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, un polipéptido se puede inmovilizar en un soporte sólido y poner en contacto con sueros del paciente para permitir la unión de anticuerpos dentro de los sueros al polipéptido inmovilizado. A continuación, los sueros sin unir se pueden retirar y detectar los anticuerpos unidos usando, por ejemplo, Proteína A marcada con ¹²⁵I.

Los epítipos preferentes incluidos por los péptidos antigénicos son regiones del IRGPP que se localizan en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas, así como regiones con antigenicidad elevada.

Por lo general, se usaba un inmunógeno de IRGPP para preparar anticuerpos por inmunización de un sujeto no humano adecuado, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, IRGPP expresado de forma recombinante o un IRGPP sintetizado químicamente. La preparación puede incluir adicionalmente un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulante similar. La inmunización de un sujeto no humano adecuado con una preparación inmunogénica de IRGPP induce una respuesta de anticuerpo anti-IRGPP policlonal. En la técnica son bien conocidas técnicas para preparar, aislar y usar anticuerpos.

Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos anti-IRGPP monoclonales o policlonales y porciones inmunológicamente activas de las moléculas de anticuerpo, incluyendo fragmentos de F(ab) y F(ab')₂ que se pueden generar por tratamiento del anticuerpo con una enzima tal como pepsina.

Los anticuerpos anti-IRGPP policlonales se pueden preparar tal como se ha descrito anteriormente por inmunización de un sujeto no humano adecuado con un IRGPP. El título de anticuerpos anti-IRGPP en el sujeto inmunizado se puede controlar a través del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando IRGPP inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas frente a los IRGPP se pueden aislar a partir del sujeto no humano (por ejemplo, de la sangre) y se purificar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A, para obtener la fracción de IgG. En un tiempo apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos anti-IRGPP son los más elevados, se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir del sujeto no humano y se pueden usar para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma, técnica de hibridoma de linfocitos B humanos, la técnica de hibridoma de EBV, o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien. En resumen, una línea celular inmortal (por lo general un mieloma) se fusiona con linfocitos (por lo general esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno de IRGPP tal como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se identifican sistemáticamente para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un IRGPP tal como se describe en el presente documento. Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para la fusión de linfocitos y líneas celulares inmortalizadas se puede aplicar con el fin de generar un anticuerpo monoclonal anti-IRGPP. Además, el experto habitual en la materia observará que hay muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal anti-IRGPP se puede identificar y aislar por identificación sistemática de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fase de anticuerpo) con IRGPP para aislar de esta manera los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen a un IRGPP. Los kits para generar e identificar sistemáticamente bibliotecas de presentación de fagos están disponibles en el mercado.

Los anticuerpos anti-IRGPP también incluyen "Fv de cadena sencilla" o fragmentos de anticuerpos "scFv". Los fragmentos de scFv comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno.

Además, los anticuerpos recombinantes anti-IRGPP, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que se pueden preparar usando técnicas convencionales de ADN recombinante, se describen en el presente documento y tales anticuerpos que se unen a un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 17 (PTCH) están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden reducir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.677.436 y N° 6.808.901).

Los anticuerpos humanizados son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos), que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los restos que forman una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco conservado de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen con los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas de CDR o marco conservado. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todo de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en que todas o básicamente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas las regiones constantes son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá preferentemente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana.

Tales anticuerpos humanizados se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de la cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido que corresponde a un IRGPP tal como se describe en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno se pueden obtener usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan intercambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando tal técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles.

Se pueden generar anticuerpos humanizados que reconocen un epítipo seleccionado mediante una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo murino para guiar la selección de un anticuerpo humanizado que reconoce el mismo epítipo.

En una realización preferente, los anticuerpos para TRGPP son capaces de reducir o eliminar la función biológica de IRGPP, tal como se describe a continuación. Es decir, la adición de anticuerpos anti-IRGPP (policlonales o preferentemente monoclonales) para IRGPP (o células que contienen IRGPP) puede reducir o eliminar la actividad de IRGPP. Generalmente, se prefiere una disminución en la actividad de al menos un 25 %, con al menos aproximadamente un 50 %, siendo particularmente precedente y siendo especialmente preferente una disminución de aproximadamente un 95-100 %.

Un anticuerpo anti-IRGPP se puede usar para aislar un IRGPP tal como se describe en el presente documento mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-IRGPP puede facilitar la purificación de los IRGPP naturales de las células y de los IRGPP producidos de forma recombinante expresados en células huésped. Además, un anticuerpo anti-IRGPP se puede usar para detectar un IRGPP (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular en la superficie celular) para evaluar la abundancia y patrón de expresión del IRGPP. Los anticuerpos anti-IRGPP se pueden usar de forma diagnóstica para controlar los niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar por acoplamiento (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Los anticuerpos anti-IRGPP tal como se describen en el presente documento, tal como el anticuerpo de la invención, que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17 (PTCH), también son útiles para dirigir un agente terapéutico a una célula o tejido que comprende el antígeno del anticuerpo anti-IRGPP. Un agente terapéutico se puede acoplar (por ejemplo, unir covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un grupo conector). Es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Como se conoce bien en la técnica, un polipéptido o polinucleótido dados pueden variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, a menudo es necesario acoplar el inmunógeno (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido) tal como se describe en el presente documento con un vehículo. Los vehículos a modo de ejemplo y preferentes son CRM197, toxina de *E. coli* (LT), toxina de *V. cholera* (CT), hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Como vehículos también se pueden usar otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo.

Cuando se conjugan un IRGPP (o un fragmento del mismo) y una proteína vehículo (es decir, se asocian covalentemente), la conjugación puede ser cualquier método químico, proceso o técnica genética usados habitualmente en la técnica. Por ejemplo, un IRGPP (o un fragmento del mismo) y una proteína vehículo, se pueden conjugan mediante técnicas, que incluyen, pero no se limitan a: (1) acoplamiento directo a través de grupos funcionales de proteínas (por ejemplo, enlace tiol-tiol, enlace amina-carboxilo, enlace amina-aldehído; acoplamiento directo de enzimas); (2) acoplamiento homobifuncional de aminas (por ejemplo, usando bis-aldehídos); (3) acoplamiento homobifuncional de tioles (por ejemplo, usando bismaleimidias); (4) acoplamiento homobifuncional a través de reactivos fotoactivados (5) acoplamiento heterobifuncional de aminas a tioles (por ejemplo, usando maleimidias); (6) acoplamiento heterobifuncional a través de reactivos fotoactivados (por ejemplo, la familia carbonildiazo); (7) introducción de grupos amino-reativos en un poli- u oligosacárido a través de activación con bromuro de cianógeno o carboximetilación; (8) introducción de grupos tiol-reativos en un poli- u oligosacárido a

través de un compuesto heterobifuncional tal como maleimido-hidrazida; (9) conjugación de proteína-lípido a través de introducción de un grupo hidrófobo en la proteína y (10) conjugación de proteína-lípido a través de incorporación de un grupo reactivo en el lípido. Además, se contemplan técnicas de "acoplamiento no covalente" heterobifuncional tales como la interacción de Biotina-Avidina. Para una revisión completa de técnicas de conjugación, véase Aslam y Dent (Aslam y Dent, "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", Macmillan Reference Ltd., Londres, Inglaterra, 1998).

En una realización específica, los anticuerpos para un IRGPP se pueden usar para eliminar el IRGPP *in vivo* activando el sistema del complemento o mediando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), o para causar la absorción de las células revestidas con anticuerpo por el sistema de endocitosis mediada por receptor (RE).

Vectores

En el presente documento también se describen vectores que contienen un polinucleótido que codifica un IRGPP, una variante de un IRGPP, o una porción del mismo. Un tipo de vector es un "plásmido", que incluye un bucle de ADN bicatenario circular en que se pueden unir segmentos de ADN adicionales. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector usada más habitualmente. Los vectores también incluyen vectores de expresión y vectores de administración de genes.

Los vectores de expresión que se describen en el presente documento comprenden un polinucleótido que codifica un IRGPP o una porción del mismo en una forma adecuada para la expresión del polinucleótido en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped a usar para la expresión, y se unen de forma operativa a la secuencia de polinucleótidos a expresar. Los expertos en la materia observarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar y el nivel de expresión de proteína deseado. Los vectores de expresión que se describen en el presente documento se pueden introducir en células huésped para producir de ese modo proteínas o péptidos, tales como los IRGPP, formas mutantes de los IRGPP y proteínas de fusión de IRGPP.

Los vectores de expresión que se describen en el presente documento se pueden diseñar para la expresión de los IRGPP en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, los IRGPP se pueden expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Como alternativa, el vector de expresión se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y T7 polimerasa.

La expresión de proteínas en procariontas se lleva a cabo más a menudo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, normalmente en el extremo amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión por lo general sirven para tres fines: 1) para aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento similares, incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Se pueden usar proteínas de fusión purificadas en ensayos de actividad de IRGPP (por ejemplo, ensayos directos o ensayos competitivos que se describen a continuación con detalle), o para generar anticuerpos específicos para los IRGPP.

Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Otra estrategia es alterar la secuencia de polinucleótidos del polinucleótido a insertar en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los que se usan preferentemente en *E. coli*. Tal alteración de las secuencias de polinucleótidos que se describen en el presente documento se puede realizar mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra realización, el vector de expresión de IRGPP es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en *S. cerevisiae* de levadura incluyen pYepSec1, pMfa, pJRY88, pYES2 y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

Como alternativa, los IRGPP que se describen en el presente documento se pueden expresar en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) incluyen la serie pAc y la serie pVL.

En otra realización, un polinucleótido que se describe en el presente documento se expresa en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Cuando se usa en células de mamífero, las funciones de control del

vector de expresión a menudo se proporcionan por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores usados normalmente se derivan de polioma, adenovirus 2 y 5, citomegalovirus y Virus 40 de Simio.

En otra realización, el vector de expresión de mamífero es capaz de dirigir la expresión del polinucleótido preferentemente en un tipo de célula en particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el polinucleótido). Los elementos reguladores específicos de tejido se conocen en la técnica y pueden incluir promotores específicos de células epiteliales. Otros ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor específico de hígado (por ejemplo, promotor de albúmina), promotores específicos linfoides, promotores de receptores de linfocitos T e inmunoglobulinas, promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos), promotores específicos de páncreas (por ejemplo, promotor de insulina), y promotores específicos de glándulas mamarias (por ejemplo, promotor de suero de leche). También se incluyen promotores regulados en su desarrollo (por ejemplo, el promotor de fetoproteína).

En el presente documento también se describe un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un IRGPP clonado en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN según él de forma operativa a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido al ARNm que corresponde a un IRG que se describe en el presente documento. Se pueden elegir secuencias reguladoras unidas de forma operativa a un polinucleótido clonado en la orientación antisentido que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una diversidad de tipos de células, por ejemplo, promotores y/o potenciadores virales, o se pueden elegir secuencias reguladoras que dirigen la expresión específica de tejido, constitutiva con la expresión específica de tipo celular de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en que se producen polinucleótidos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad se puede determinar por el tipo de célula en que se introduce el vector.

En el presente documento también se describen vehículos de administración de genes para la administración de polinucleótidos a células, tejidos o un mamífero para la expresión. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que se describe en el presente documento se puede administrar por vía local o por vía sistémica en un vehículo de administración de genes. Estos constructos pueden usar enfoques de vector viral o no viral en modalidad *in vivo* o *ex vivo*. La expresión de la secuencia de codificación se puede inducir usando promotores de mamífero o heterólogos endógenos. La expresión de la secuencia de codificación *in vivo* se puede constituir o regular. También se describen vehículos de administración de genes capaces de expresar los polinucleótidos contemplados. El vehículo de administración de genes es preferentemente un vector viral y, más preferentemente, un vector retroviral, lentiviral, adenoviral, viral adeno-asociado (AAV), herpes viral, o alfavirus. El vector viral también puede ser un vector viral de astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, togavirus.

La administración de los constructos de terapia genética que se describen en el presente documento en las células no se limita a los vectores virales mencionados anteriormente. Se pueden usar otros métodos y medios de administración tales como, por ejemplo, vectores de expresión de ácidos nucleicos, ADN fusionado policatiónico unido o no unido a adenovirus muerto solo, ADN unido a ligando, liposomas, células de vehículos de administración de células eucariotas, deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados, pistola de partículas para la transferencia de genes portátil, radiación ionizante, neutralización de la carga nucleica o fusión con membranas celulares. Se puede usar transferencia de genes mediada por partículas. En resumen, la secuencia de ADN se puede insertar en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para alto nivel de expresión, y a continuación se puede incubar con moléculas de transferencia de genes sintéticos tales como cationes de unión a ADN poliméricos tales como polilisina, protamina, y albúmina, unidas a ligandos de dirección a células tales como asialoorosomucoide, insulina, galactosa, lactosa o transferrina. También se puede usar ADN desnudo.

También se describe la expresión de los IRGPP usando un sistema de expresión regulable. Los ejemplos de sistemas regulables incluyen el sistema de Tct-on/off de BD Biosciences (San Jose, CA), el sistema de ecdisona de Invitrogen (Carlsbad, CA), el sistema de mifepristona/progesterona de Valentis (Burlingame, CA), y el sistema de rapamicina de Ariad (Cambridge, MA).

Inmunógenos y Composiciones Inmunogénicas

En determinados aspectos, se pueden usar IRGPP, IRGPN, linfocitos T específicos de IRGPP, APC que presenta IRGPP, vectores que contienen IRG, que incluyen pero no se limitan a vectores de expresión y vectores de administración de genes, como vacunas para la gripe. Las vacunas pueden comprender uno o más de tales compuestos/células y un inmunoestimulante. Un inmunoestimulante puede ser cualquier sustancia que aumenta o potencia una respuesta inmune (mediada por anticuerpos y/o células) a un antígeno exógeno. Los ejemplos de inmunoestimulantes incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) y liposomas (en los que se incorpora el compuesto). Las vacunas que se describen en el presente documento también pueden contener otros compuestos, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, pueden estar presentes una o más porciones inmunogénicas de otros antígenos, incorporadas en un polipéptido de fusión o como

un compuesto separado, dentro de la composición de vacuna.

Una vacuna puede contener ADN que codifica uno o más IRGPP o porción de IRGPP, de tal manera que el polipéptido se genera *in situ*. Tal como se ha indicado anteriormente, el ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una diversidad de sistemas de administración conocidos por los expertos habituales en la materia, incluyendo vectores de expresión de ácidos nucleicos, vectores de administración de genes, y sistemas de expresión de bacterias. En la técnica se conocen bien numerosas técnicas de administración de genes. Los sistemas de expresión de ácidos nucleicos apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tal como un promotor adecuado y señal de terminación). Los sistemas de administración de bacterias implican la administración de una bacteria (tal como Bacilo de Calmette-Guerrin) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido sobre su superficie celular o secreta un epítipo tal. El ADN se puede introducir usando un sistema de expresión viral (por ejemplo, vaccinia u otro virus pox, retrovirus, o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus competente para replicación, no patógeno (defectuoso). Las técnicas para incorporar ADN en tales sistemas de expresión son bien conocidas por los expertos en la materia. El ADN también puede ser "desnudo", tal como se describe, por ejemplo, en Ulmer *et al.*, Science 259: 1745-1749, 1993 y revisado por Cohen, Science 259: 1691-1692, 1993.

Será evidente que una vacuna puede contener sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos y polipéptidos proporcionados en el presente documento. Tales sales se pueden preparar a partir de bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas, incluyendo bases orgánicas (por ejemplo, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminoácidos básicos) y bases inorgánicas (por ejemplo sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio).

Cualquiera de una diversidad de inmunoestimulantes se puede usar en las vacunas que se describen en el presente documento.

Por ejemplo, se puede incluir un adyuvante. Tal como se ha definido anteriormente, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes se proporcionan a menudo para reforzar la respuesta inmune y son bien conocidos por el experto en la materia. Los ejemplos de adyuvantes contemplados incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (alumbre), tales como fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, lipopolisacáridos bacterianos, compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en la Patente de Estados Unidos Número 6.113.918; uno de tales AGP es 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido de 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil, que también se conoce como 529 (conocido anteriormente como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado) (Corixa) que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.912.094, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo de CpG (Patente de Estados Unidos N° 6.207.646), polipéptidos, saponinas tales como Quil A o STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Massachusetts), que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540, una toxina pertussis (PT), o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente Internacional N° WO 93/13302 y N° WO 92/19265, toxina del cólera (en una forma de tipo silvestre o mutante, por ejemplo, donde el ácido glutámico en la posición 29 del aminoácido se sustituye por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 00/18434). Diversas citoquinas y linfoquinas son adecuadas para su uso como adyuvantes. Uno de tales adyuvantes es el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que tiene una secuencia de nucleótidos tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.078.996. Un plásmido que contiene ADNc de GM-CSF se ha transformado en *E. coli* y se ha depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 1081 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el Número de Registro 39900. La citoquina IL-12 es otro adyuvante que se describe en la Patente de Estados Unidos Número 5.723.127. Se ha demostrado que otras citoquinas o linfoquinas tienen actividad de inmuno modulación, incluyendo, pero no limitado a, las interleuquinas 1-alfa, 1-beta, 2, 4, 5,6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, los interferones alfa, beta y gamma, factor de estimulación de colonias de granulocitos, y dos factores de necrosis tumoral alfa y beta, y son adecuados para su uso como adyuvantes.

Cualquier vacuna proporcionada en el presente documento se puede preparar usando métodos bien conocidos que dan como resultado una combinación de antígeno, potenciador de la respuesta inmune y un vehículo o excipiente adecuado. Las composiciones que se describen en el presente documento se pueden administrar como parte de una formulación de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula, esponja o gel (compuesta de polisacáridos, por ejemplo) que efectúa una liberación lenta del compuesto después de la administración). Tales formulaciones se pueden preparar por lo general usando tecnología bien conocida y se pueden administrar, por ejemplo, por implantación oral, rectal o subcutánea, o por implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener un polipéptido, polinucleótido o anticuerpo disperso en una matriz vehículo y/o contenido dentro de un depósito rodeado por una membrana controladora de la velocidad.

Los vehículos para uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. Tales vehículos incluyen micropartículas de poli(lactida-co-glicólido), así como poliacrilato, látex, almidón, celulosa y dextrano. Otros vehículos de liberación retardada incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un

5 núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.151.254 y las solicitudes de PCT WO 94/20078, WO 94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, la

10 tasa y la duración esperada de la liberación y la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

Cualquiera de una diversidad de vehículos de administración se puede usar dentro de las vacunas para facilitar la producción de una respuesta inmune específica de antígeno que se dirige a las células cancerosas. Los vehículos de administración incluyen células de presentación de antígenos (APC), tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, monocitos y otras células que se pueden modificar por ingeniería para que sean APC eficaces. Tales

15 células se pueden modificar, pero no es necesario, genéticamente para aumentar la capacidad de presentación del antígeno, para mejorar la activación y/o mantenimiento de la respuesta de los linfocitos T, para que tengan efectos antigripales *per se* y/o para que sean inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, haplotipo HLA emparejado). Por lo general, las APC se pueden aislar de cualquiera de una diversidad de fluidos biológicos y órganos, y pueden ser autólogas, alogénicas, singénicas o células xenogénicas.

20

Las vacunas se pueden presentar en recipientes de dosis individual o dosis múltiples, tales como ampollas o viales cerrados herméticamente. Tales recipientes preferentemente se dimensionan herméticamente para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones se pueden almacenar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. Como alternativa, una vacuna se puede

25 almacenar en una condición liofilizada que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

Identificación sistemática: Métodos

También se describen métodos (también denominados en el presente documento "ensayos de identificación sistemática") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo que comprenden restos terapéuticos (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, polinucleótidos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que (a) se unen a un IRGPP, o (b) tienen un efecto modulador (por ejemplo, estimulante o inhibidor) en la actividad de un IRGPP o, más específicamente, (c) tienen un efecto modulador sobre las interacciones del

30 IRGPP con uno o más de sus sustratos naturales (por ejemplo, péptido, proteína, hormona, cofactor, o polinucleótido), o (d) tienen un efecto modulador sobre la expresión de los IRGPP. Tales ensayos comprenden por lo general una reacción entre el IRGPP y uno o más componentes del ensayo. Los otros componentes pueden ser el compuesto de ensayo en sí mismo, o una combinación del compuesto de ensayo y un compañero de unión del IRGPP.

35

Para la identificación sistemática de compuestos que interfieren con la unión de dos proteínas, por ejemplo, un IRGPP y su compañero de unión, se puede usar un Ensayo de Proximidad por Centelleo. En este ensayo, el IRGPP se marca con un isótopo tal como ¹²⁵I. El compañero de unión se marca con un centelleador, que emite luz cuando está próximo a la desintegración radiactiva (es decir, cuando el IRGPP está unido a su compañero de unión). Una

40 reducción en la emisión de luz indicará que un compuesto ha interferido en la unión de las dos proteínas.

Como alternativa se podría usar un ensayo de Transferencia de Energía de Fluorescencia (FRET). En un ensayo de FRET tal como se describe en el presente documento, un donante de energía de fluorescencia está formado por una proteína (por ejemplo, un IRGPP) y un aceptor de energía de fluorescencia está formado por una segunda proteína (por ejemplo, un compañero de unión del IRGPP). Si el espectro de absorción de la molécula aceptora se superpone con el espectro de emisión del fluoróforo donante, la luz fluorescente emitida por el donante es absorbida por el

45 aceptor. La molécula donante puede ser un resto fluorescente en la proteína (por ejemplo, fluorescencia intrínseca, tal como un resto de tirosina o triptófano), o un fluoróforo que se conjuga de forma covalente con la proteína (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, FITC). A continuación se selecciona una molécula donante adecuada con los requisitos espectrales receptores/donantes anteriores en mente.

50

Por lo tanto, en este ejemplo, un IRGPP se marca con una molécula fluorescente (es decir, un fluoróforo donante) y su compañero de unión se marca con una molécula de inactivación (es decir, un aceptor). Cuando el IRGPP y su compañero de unión se unen, la emisión de fluorescencia se inactivará o se reducirá con respecto al IRGPP solo. De

55 forma análoga, un compuesto que puede disociar la interacción del complejo IRGPP-compañero, dará como resultado un aumento de la emisión de fluorescencia, que indica que el compuesto ha interferido en la unión del IRGPP con su compañero de unión.

60

Otro ensayo para detectar la unión o la disociación de dos proteínas es la polarización de fluorescencia o anisotropía. En este ensayo, la proteína investigada (por ejemplo, un IRGPP) se marca con un fluoróforo con una vida útil de fluorescencia adecuada. La muestra de proteína se explica a continuación con luz polarizada

65

verticalmente. A continuación se calcula el valor de la anisotropía mediante la determinación de la intensidad de la luz de emisión polarizada horizontal y verticalmente. A continuación, la proteína marcada (IRGPP) se mezcla con un compañero de unión a IRGPP y la anisotropía se mide de nuevo. Dado que la intensidad de la anisotropía de fluorescencia se relaciona con la libertad de rotación de la proteína marcada, cuanto más rápidamente gira una proteína en solución, menor es el valor de la anisotropía. Por lo tanto, si el IRGPP marcado forma parte de un complejo (por ejemplo, IRGPP-compañero), el IRGPP gira más lentamente en solución (con respecto al IRGPP no unido, libre) y la intensidad de la anisotropía aumenta. Posteriormente, un compuesto que puede disociar la interacción del complejo IRGPP-compañero, se traducirá en una disminución de la anisotropía (es decir, el IRGPP marcado gira más rápidamente), lo que indica el compuesto ha interferido en la unión de IRGPP con su compañero de unión.

Un ensayo más tradicional implicaría el marcado del compañero de unión a IRGPP con un isótopo tal como ¹²⁵I, incubando con el IRGPP, y a continuación la inmunoprecipitación del IRGPP. Los compuestos que aumentan el IRGPP libre disminuirán los recuentos de precipitados. Para evitar el uso de radiactividad, el compañero de unión de IRGPP se podría marcar en su lugar con un anticuerpo conjugado con enzima.

Como alternativa, el compañero de unión a IRGPP se podría inmovilizar sobre la superficie de una placa de ensayo y el IRGPP se podría marcar con una marca radiactiva. Un aumento en el número de recuentos identificaría los compuestos que hubieran interferido con la unión del IRGPP y su compañero de unión.

La evaluación de las interacciones de unión se pueden realizar adicionalmente usando tecnología Biacore, donde el IRGPP o su compañero de unión se une a un micro chip, ya sea directamente por modificación química o conexión a través de asociación de anticuerpo-epítipo (por ejemplo, anticuerpo al IRGPP), anticuerpo dirigido a una marca de epítipo (por ejemplo, His) o proteína de fusión (por ejemplo, GST). A continuación, se aplica una segunda proteína o proteínas a través de flujo sobre el "chip" y se detecta el cambio en la señal. Por último, los compuestos de ensayo se aplican a través de flujo sobre el "chip" y se detecta el cambio en la señal.

Una vez que se ha identificado una serie de compuestos potenciales para una combinación de IRGPP y compañero de unión a IRGPP, se puede usar un bioensayo para seleccionar los candidatos más prometedores. Por ejemplo, anteriormente se describió un ensayo celular que mide la proliferación celular en presencia del IRGPP y el compañero de unión a IRGPP. Este ensayo se podría modificar para comprobar la eficacia de moléculas pequeñas que interfieren con la unión de un IRGPP y su compañero de unión en el aumento de la proliferación celular. Un aumento de la proliferación celular se correlacionaría con la potencia de un compuesto.

Los compuestos de ensayo que se describen en el presente documento por lo general son moléculas pequeñas o biomoléculas. Las moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas pequeñas. Las biomoléculas incluyen, pero no se limitan a, compuestos de origen natural y sintéticos que tienen una bioactividad en mamíferos, tales como lípidos, esteroides, polipéptidos, polisacáridos, y polinucleótidos. En una realización preferente, el compuesto de ensayo es una molécula pequeña. En otra realización preferente, el compuesto de ensayo es una biomolécula. Un experto en la materia observará que la naturaleza del compuesto de ensayo puede variar dependiendo de la naturaleza del IRGPP. Por ejemplo, si el IRGPP es un receptor huérfano que tiene un ligando desconocido, el compuesto de ensayo puede ser cualquiera de un número de biomoléculas que puede actuar como ligando similar, incluyendo, pero no limitado a, citoquinas, mediadores derivados de lípidos, aminos biogénicas pequeñas, hormonas, neuropéptidos, o proteasas.

Los compuestos de ensayo que se describen en el presente documento se pueden obtener a partir de cualquier fuente disponible, incluyendo bibliotecas sistemáticas de compuestos naturales y/o sintéticos. Los compuestos de ensayo también se pueden obtener mediante cualquiera de los numerosos enfoques en procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen los grupos funcionales de los péptidos, pero con una estructura principal no peptídica, nueva que son resistentes a la degradación enzimática pero que sin embargo siguen siendo bioactivas); bibliotecas en fase sólida buen fase de solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca de 'una perla un compuesto'; y métodos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. Los enfoques de biblioteca biológica y de biblioteca de peptoides se limitan a bibliotecas de péptidos, aunque los otros cuatro enfoques se pueden aplicar a bibliotecas de compuestos peptídicos, oligoméricos no peptídicos o de moléculas pequeñas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "compañero de unión" se refiere a una molécula que sirve como un sustrato para un IRGPP, o como alternativa, como un ligando que tiene afinidad de unión al IRGPP.

60 Ensayos de Identificación Sistemática de Alto Rendimiento

Se describen métodos para llevar a cabo la identificación sistemática de alto rendimiento para compuestos de ensayo capaces de inhibir la actividad o expresión de un IRGPP que se describe en el presente documento. En una realización, el método de identificación sistemática de alto rendimiento implica la combinación de compuestos de ensayo y el IRGPP y la detección del efecto del compuesto de ensayo en el IRGPP.

Se puede usar una diversidad de ensayos funcionales de alto rendimiento bien conocidos en la técnica en combinación para identifica sistemáticamente y/o estudiar la reactividad de diferentes tipos de activación de compuestos de ensayo. Dado que el sistema de acoplamiento a menudo es difícil de predecir, puede ser necesario configurar número de ensayos para detectar una amplia gama de mecanismos de acoplamiento. En la técnica se conocen bien una diversidad de técnicas basadas en fluorescencia y son capaces de identificación sistemática de alto rendimiento y de rendimiento ultra elevado para la actividad, que incluyen, pero no se limitan a BRET[®] o FRET[®] (ambas de Packard Instrument Co., Meriden, CT). La capacidad para detectar un gran volumen y una diversidad de compuestos de ensayo con gran sensibilidad permite el análisis de los objetivos terapéuticos que se describen en el presente documento para proporcionar adicionalmente inhibidores potenciales de la gripe. Por ejemplo, cuando el IRG codifica un receptor huérfano con un ligando sin identificar, se pueden usar ensayos de alto rendimiento para identificar el ligando, y para identificar adicionalmente compuestos de ensayo que evitan la unión del receptor al ligando. El sistema BIACORE[®] también se puede manipular para detectar la unión de compuestos de ensayo con componentes individuales de la diana terapéutica, para detectar la unión a la proteína codificada o al ligando.

Mediante la combinación de los compuestos de ensayo con los IRGPP que se describen en el presente documento y la determinación de la actividad de unión entre ellos, se puede realizar análisis de diagnóstico para elucidar los sistemas de acoplamiento. También se pueden usar ensayos genéricos que usan microfisiómetro citosensor para medir la activación metabólica, aunque se pueden detectar cambios en la movilización del calcio mediante el uso de las técnicas basadas en fluorescencia tales como FLIPR[®] (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA). Además, la presencia de células apoptóticas se puede determinar mediante el ensayo de TUNEL, que usa citometría de flujo para detectar extremos 3-OH libres que resultan de la escisión del ADN genómico durante la apoptosis. Tal como se ha mencionado anteriormente, se puede usar una diversidad de ensayos funcionales bien conocidos en la técnica en combinación para identifica sistemáticamente y/o estudiar la reactividad de diferentes tipos de activación de compuestos de ensayo. Preferentemente, el ensayo de identificación sistemática de alto rendimiento que se describe en el presente documento usa tecnología de resonancia de plasmones libres de marca tal como la proporcionan los sistemas BIACORE[®] (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). La resonancia libre plasmones se produce cuando las ondas de plasmones superficiales se excitan en una superficie de contacto metálica/líquida. Al reflejar la luz dirigida desde la superficie como resultado del contacto con una muestra, la resonancia de plasmones de superficie provoca un cambio en el índice de refracción en la capa superficial. El cambio del índice de refracción para un cambio dado de la concentración de masa en la capa superficial es similar para muchos agentes bioactivos (incluyendo proteínas, péptidos, lípidos y polinucleótidos), y dado que la superficie del sensor BIACORE[®] se puede funcionalizar para unir una diversidad de estos agentes bioactivos, la detección de una amplia selección de compuestos de ensayo se puede conseguir de este modo.

Por lo tanto, la divulgación proporciona la identificación sistemática de alto rendimiento de compuestos de ensayo para la capacidad de inhibir la actividad de una proteína codificada por los IRG enumerados en la Tabla 3, mediante la combinación de los compuestos de ensayo y la proteína en ensayos de alto rendimiento tales como BIACORE[®], o en ensayos basados en fluorescencia tales como BRET[®]. Además, se pueden usar ensayos de alto rendimiento para identificar los factores específicos que se unen a las proteínas codificadas, o como alternativa, para identificar compuestos de ensayo que evitan la unión del receptor al compañero de unión. En el caso de receptores huérfanos, el compañero de unión puede ser el ligando natural para el receptor. Además, los ensayos de identificación sistemática de alto rendimiento se pueden modificar para determinar si los compuestos de ensayo se pueden unir a la proteína codificada o al compañero de unión (por ejemplo, sustrato o ligando) que se une a la proteína.

45 Métodos de Detección

La detección y medida de la cantidad relativa de un producto de IRG (polinucleótido o polipéptido) que se describe en el presente documento se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Las metodologías habituales para la detección de un polinucleótido transcrito incluyen extracción de ARN a partir de una muestra de célula o tejido, seguido por la hibridación de una sonda marcada (es decir, una molécula de polinucleótido complementaria) específica para el ARN diana para el ARN extraído y la detección de la sonda (es decir, transferencia de Northern).

Las metodologías habituales para la detección de péptidos incluyen extracción de proteínas a partir de una muestra de célula o tejido, seguido por la unión de un anticuerpo específico para la proteína diana a la muestra de proteína, y la detección del anticuerpo. Por ejemplo, la detección de desmina se puede conseguir usando anticuerpo policlonal anti-desmina. Los anticuerpos se detectan generalmente mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado. La marca puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, un cofactor enzimático, o ligando. Tales métodos se comprenden bien en la técnica.

La detección de moléculas de polinucleótido específicas también se puede evaluar por electroforesis en gel, cromatografía en columna, o secuenciación directa, PCR cuantitativa (en el caso de moléculas de polinucleótido), RT-PCR, o PCR anidada entre otras muchas técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

La detección de la presencia o número de copias de todo o una parte de un IRG que se describe en el presente documento se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Por lo general, es conveniente

evaluar la presencia y/o cantidad de un ADN o ADNc por análisis de Southern, en que se extrae el ADN total de una muestra de célula o tejido y se hibrida con una sonda marcada (es decir, moléculas de ADN complementarias). A continuación, la sonda se detecta y se cuantifica. El grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Otros métodos útiles para la detección y/o cuantificación de ADN incluyen secuenciación directa, electroforesis en gel, cromatografía en columna, y PCR cuantitativa, tal como lo conoce un experto en la materia.

La detección de moléculas de polipéptido específicas se puede evaluar por electroforesis en gel, transferencia Western, cromatografía en columna, o secuenciación directa, entre otras muchas técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

Un método a modo de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de un IRGPP o IRGPN en una muestra biológica implica poner en contacto una muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el IRGPP o IRGPN (por ejemplo, ARNm, ADN genómico). Un agente preferente, para detectar ARNm o ADN genómico correspondiente a un IRG o IRGPP que se describe en el presente documento es una sonda de polinucleótido marcada capaz de hibridarse a un ARNm o ADN genómico de la invención. En una realización más preferente, los polinucleótidos a identificar sistemáticamente se colocan en un GeneChip[®]. Las sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico que se describen en el presente documento se describen en el presente documento.

Un agente preferente para detectar un IRGPP es un anticuerpo capaz de unirse al IRGPP, preferentemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, más preferentemente, monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende incluir el marcado directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión físicamente) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y marcado terminal de una sonda de ADN con biotina de modo que se puede detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia. La expresión "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Es decir, el método de detección que se describe en el presente documento se puede usar para detectar ARNm, proteína o ADN genómico de IRG en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para detección de ARNm de IRG incluyen hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de IRGPP incluyen ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico de IRG incluyen hibridaciones de Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de IRGPP incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-IRGPP marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar por técnicas convencionales de formación de imágenes.

En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteína del sujeto de ensayo. Como alternativa, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de ensayo o moléculas de ADN genómico del sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferente es una muestra de tejido o suero aislada por medios convencionales de un sujeto, por ejemplo, una biopsia o extracción de sangre.

45 Detección de alteraciones genéticas

Los métodos que se describen en el presente documento también se pueden usar para detectar alteraciones genéticas en un IRG, determinando de ese modo si un sujeto con el gen alterado está en riesgo de daños caracterizados por la regulación anómala de la expresión o actividad IRG. En realizaciones preferentes, los métodos incluyen detectar, en una muestra de células del sujeto, la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos una alteración que afecta a la integridad de un IRG, o la expresión anómala del IRG. Por ejemplo, tales alteraciones genéticas se pueden detectar averiguando la existencia de al menos uno de los siguientes: 1) supresión de uno o más nucleótidos de un IRG; 2) adición de uno o más nucleótidos a un IRG; 3) sustitución de uno o más nucleótidos de un IRG, 4) un reordenamiento cromosómico de un IRG; 5) alteración en el nivel de un transcrito de ARN mensajero de un IRG, 6) modificación anómala de un IRG, tal como del patrón de metilación del ADN genómico, 7) la presencia de un patrón de empalme de tipo no silvestre de un transcrito de ARN mensajero de un IRG, 8) nivel de tipo no silvestre de un IRGPP, 9) pérdida alélica de un IRG, y 10) modificación posterior a la traducción no apropiada de un IRGPP. Tal como se describe en el presente documento, existe un gran número de ensayos conocidos en la técnica, que se pueden usar para detectar alteraciones en un IRG o un producto de IRG. Una muestra biológica preferente es una muestra de sangre aislada por medios convencionales de un sujeto.

En determinadas realizaciones, la detección de la alteración implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR de anclaje o PCR de RACE, o, como alternativa, en una reacción en cadena de la ligasa (LCR), la última de los cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el IRG. Este método puede incluir las etapas de recoger una muestra de células de un sujeto, aislar una muestra

de polinucleótido (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de polinucleótido con uno o más cebadores que se hibridan específicamente a un IRG en condiciones tales que se produce la hibridación y amplificación del IRG (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control. Se entiende que se pueden desear el uso de PCR y/o LCR como una etapa de amplificación preliminar en conjunto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar mutaciones que se describen en el presente documento.

Los métodos de amplificación alternativos incluyen: replicación de secuencia autosostenida, sistema de amplificación transcripcional, Q-Beta Replicasa, o cualquier otro método de amplificación de polinucleótidos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de polinucleótido si tales moléculas están presentes en números muy bajos.

En una realización alternativa, las mutaciones en un IRG a partir de una célula de muestra se pueden identificar por alteraciones en los patrones de restricción de la enzima de escisión. Por ejemplo, se aísla ADN de muestra y control, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de longitud de fragmentos por electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de longitud de fragmentos entre el ADN de muestra y de control indican mutaciones en el ADN de la muestra. Además, se pueden usar ribozimas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.498.531) para puntuar la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o pérdida de un sitio de escisión de ribozima.

En otras realizaciones, se pueden identificar mutaciones genéticas en un IRG por hibridación de polinucleótidos de muestra y de control, por ejemplo, ADN o ARN, a matrices de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas de oligonucleótidos. Por ejemplo, se pueden identificar mutaciones genéticas en un IRG en matrices bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas con luz. En resumen, se puede usar una primera matriz de hibridación de sondas para explorar a través de largos tramos de ADN en una muestra y controlar para identificar cambios de bases entre las secuencias haciendo matrices lineales de sondas superpuestas secuenciales. Este paso permite la identificación de mutaciones puntuales. Este paso va seguido por una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas usando matrices de sondas más pequeñas, especializadas complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutación se compone de conjuntos de sondas paralelas, una complementaria al gen de tipo silvestre y la otra complementaria al gen mutante.

En otra realización más, se puede usar cualquiera de una diversidad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el IRG y detectar mutaciones por comparación de la secuencia del IRG de muestra con la secuencia (control) de tipo silvestre correspondiente. También se contempla que se puede usar cualquiera de una diversidad de procedimientos de secuenciación automatizados cuando se realizan los ensayos de diagnóstico, incluyendo secuenciación por espectrometría de masas.

Otros métodos para detectar mutaciones en un IRG incluyen métodos en que se usa protección de agentes de escisión para detectar bases con falta de coincidencia en heterodúplex de ARN/ARN o de ARN/ADN. En general, la técnica habitual de "escisión por falta de coincidencia" comienza proporcionando heterodúplex por hibridación (marcado) de ARN o de ADN que contiene la secuencia de IRG de tipo silvestre con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido de una muestra de tejido. Los dúplex de doble cadena se tratan con un agente que escinde regiones del dúplex de hebra sencilla, que existirán debido a las faltas de coincidencia de los pares de bases entre las hebras control y muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN se pueden tratar con ARNasa y los híbridos de ADN/ADN se pueden tratar con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones con falta de coincidencia. En otras realizaciones, los dúplex de ADN/ADN o ARN/ADN se pueden tratar con hidroxilamina o tetraóxido de osmio y con piperidina para digerir las regiones con falta de coincidencia. Después de la digestión de las regiones con falta de coincidencia, el material resultante se separa a continuación por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturizantes para determinar el sitio de la mutación. En una realización preferente, el ADN o ARN de control se puede marcar para la detección.

Además, en otra realización, la reacción de escisión de falta de coincidencia usa una o más proteínas que reconocen pares de bases con falta de coincidencia en el ADN bicatenario (denominadas enzimas de "reparación de falta de coincidencia en el ADN") en sistemas definidos para detectar y mapear mutaciones puntuales en los ADNc de IRG obtenidos a partir de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en faltas de coincidencias de G/A y la timidina ADN glicosilasa de células HeLa escinde T en faltas de coincidencia de G/T. De acuerdo con una realización a modo de ejemplo, una sonda basada en una secuencia de IRG, por ejemplo, una secuencia de IRG de tipo silvestre, se hibrida al ADNc u otro producto de ADN de una célula o células de ensayo. El dúplex se trata con una enzima de reparación de falta de coincidencia de ADN, y los productos de escisión, si los hay, se pueden detectar a partir de, por ejemplo, protocolos de electroforesis. Véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.459.039.

65

En otras realizaciones, las alteraciones en la movilidad electroforética se usarán para identificar mutaciones en los IRG. Por ejemplo, se puede usar polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre los polinucleótidos mutantes y de tipo silvestre. Se desnaturalizarán fragmentos de ADN monocatenario de polinucleótidos de IRG de muestra y control y se permitirá que se renaturalicen. La estructura secundaria de los polinucleótidos de monocatenarios varía de acuerdo con la secuencia. La alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un solo cambio de base. Los fragmentos de ADN se pueden marcar detectar con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede aumentar usando ARN (en lugar de ADN) en que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferente, el método objeto usa análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias en base a cambios en la movilidad electroforética (Keen *et al.* Trends Genet. 7: 5, 1991).

En otra realización, el movimiento de los fragmentos mutantes o de tipo silvestre en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalizante se somete a ensayo usando electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Cuando se usa DGGE como el método de análisis, el ADN se modificará para asegurar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo, mediante la adición de una sujeción de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alta fusión por PCR. En una realización adicional se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturalizante para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y muestra (Rosenbaum y Reissner Biophys Chem 265: 12753, 1987).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero no se limitan a, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva, y extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en que la mutación conocida se coloca centralmente y a continuación se hibridan con el ADN diana en condiciones que permiten la hibridación solo si se encuentra una coincidencia perfecta (Saiki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 6230, 1989). Tales oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con diana amplificada por PCR o un número de mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana de hibridación y se hibridan con el ADN diana marcado.

Como alternativa, se puede usar tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación por PCR selectiva en conjunto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) o en el extremo en la posición 3' de un cebador donde, en condiciones apropiadas, la falta de coincidencia puede prevenir o reducir la extensión de la polimerasa. Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en la escisión. Se prevé que, en determinadas realizaciones, la amplificación también se pueda realizar usando Taq ligasa para amplificación. En tales casos, la ligación solo tendrá lugar si hay una coincidencia perfecta en el extremo 3' de la secuencia 5', haciendo posible que de este modo la detección de la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.

Efectos de Control Durante los Ensayos Clínicos

El control de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos, moléculas pequeñas, proteínas, nucleótidos) en la expresión de un IRG o actividad de un IRGPP se puede aplicar no solo en la identificación sistemática de fármacos básicos, sino también en los ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente determinado mediante un ensayo de identificación sistemática, tal como se describe en el presente documento para disminuir una actividad IRGPP, se puede controlar en los ensayos clínicos de sujetos que muestran una mayor actividad de IRGPP. En tales ensayos clínicos, la actividad del IRGPP se puede usar como una "lectura de salida" del fenotipo de un tejido en particular.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, se pueden identificar los IRG que se modulan en los tejidos mediante el tratamiento con un agente. Por lo tanto, para estudiar el efecto de los agentes sobre el IRGPP en un ensayo clínico, las células se pueden aislar y preparar ARN y analizar para los niveles de expresión de un IRG. Los niveles de expresión genética o un patrón de expresión genética se pueden cuantificar mediante análisis de transferencia de Northern, RT-PCR o GeneChip® tal como describe en el presente documento, o como alternativa midiendo la cantidad de proteína producida, por uno de los métodos tal como se describe en el presente documento, o midiendo los niveles de actividad de IRGPP. De esta manera, el patrón de expresión genética puede servir como una lectura de salida, indicativa de la respuesta fisiológica de las células al agente. Por consiguiente, este estado de respuesta se puede determinar antes del tratamiento y en diversos puntos durante el tratamiento del individuo con el agente.

En una realización preferente, la presente divulgación proporciona un método para controlar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, polinucleótido, molécula pequeña, u otro fármaco candidato identificado con los ensayos de identificación sistemática que se describen en el presente documento) que incluye las etapas de (i) obtener una muestra previa a la administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de una proteína de IRG o ARNm en la muestra previa a la administración; (iii) obtener una o más muestras del sujeto después de la administración; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad de la proteína de IRG o ARNm en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína de IRG o ARNm en la

muestra previa a la administración con la proteína de IRG o ARNm de la muestra o muestras después de la administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia. De acuerdo con tal realización, la expresión o actividad de IRG se puede usar como un indicador de la eficacia de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

5

Métodos de Tratamiento

La presente invención proporciona un anticuerpo para su uso en métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar un sujeto en riesgo de, susceptible a o diagnosticado con gripe.

10 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe o un método para tratar la infección por el virus de la gripe en un mamífero. También se proporciona una composición para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero al virus de la gripe, donde dicha composición comprende un anticuerpo suspendido en un vehículo farmacéuticamente
15 aceptable, cuya anticuerpo se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH). En el presente documento también se describe un método para prevenir la gripe en un sujeto mediante la administración al sujeto de un producto de IRG o una gente que modula la expresión o actividad de la proteína de IRG.

20 La administración de un agente profiláctico se puede producir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la expresión diferencial de la proteína de IRG, de modo que la gripe se evita o, como alternativa, se retrasa su progreso. Dependiendo del tipo de anomalía del IRG (por ejemplo, por lo general una modulación fuera de la desviación estándar normal), por ejemplo, se puede usar un producto de IRG, agonista de IRG o agente antagonista para tratar al sujeto. El agente apropiado se puede determinar en base a ensayos de
25 identificación sistemática que se describen en el presente documento.

En el presente documento se describen métodos para modular la expresión o actividad de la proteína de IRG con fines terapéuticos. Por consiguiente, en una realización a modo de ejemplo, el método de modulación que se describe en el presente documento implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de
30 las actividades de una actividad del producto de IRG asociado con la célula. Un agente que modula la actividad del producto de IRG puede ser un agente tal como se describe en el presente documento, tal como un polinucleótido (por ejemplo, una molécula antisentido) o un polipéptido (por ejemplo, un mutante dominante negativo de un IRGPP), una molécula diana de origen natural de un IRGPP (por ejemplo, un sustrato de IRGPP), un anticuerpo anti-TRGPP, un modulador de IRG (por ejemplo, agonista o antagonista), un peptidomimético de una proteína de IRG
35 agonista o antagonista, u otras moléculas pequeñas.

También se describen métodos de modulación de un nivel de expresión de un IRG que se describe en el presente, que comprende la administración a un sujeto que tiene la gripe, de una diversidad de composiciones que corresponden a los IRG de la Tabla 3, incluyendo proteínas u oligonucleótidos antisentido. La proteína se puede
40 proporcionar proporcionando adicionalmente un vector que comprende un polinucleótido que codifica la proteína a las células. Como alternativa, los niveles de expresión de los IRG que se describen en el presente documento se pueden modular proporcionando un anticuerpo, una pluralidad de anticuerpos o un anticuerpo conjugado a un resto terapéutico.

Determinación de la Eficacia de un Compuesto o Terapia de Ensayo

También se describen métodos para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo o terapia para la inhibición de la gripe en un sujeto. Estos métodos implican el aislamiento de muestras de un sujeto que padece gripe, que está sometido a tratamiento o terapia, y detectar la presencia, cantidad y/o actividad de uno o más IRG que se describen
50 en el presente documento en la primera muestra con respecto a una segunda muestra. Cuando se determina la eficacia de un compuesto de ensayo, la primera y segunda muestras son preferentemente sub-porciones de una sola muestra tomada del sujeto, donde la primera parte está expuesta al compuesto de ensayo y la segunda parte no lo está. En un aspecto de esta realización, el IRG se expresa a un nivel básicamente disminuido en la primera muestra, con respecto a la segunda. Más preferentemente, el nivel de expresión en la primera muestra se aproxima (es decir, es menor que la desviación estándar para las muestras normales) al nivel de expresión en una tercera muestra de control, tomado de una muestra de control de tejido normal. Este resultado sugiere que el compuesto de ensayo inhibe la expresión del IRG en la muestra. En otro aspecto de esta realización, el IRG se expresa a un nivel básicamente aumentado en la primera muestra, con respecto a la segunda. Más preferentemente, el nivel de
55 expresión en la primera muestra se aproxima (es decir, es menor que la desviación estándar para las muestras normales) al nivel de expresión en una tercera muestra de control, tomado de una muestra de control de tejido normal. Este resultado sugiere que el compuesto de ensayo aumenta la expresión del IRG en la muestra.

60 Cuando se está evaluando la eficacia de una terapia, la primera muestra obtenida del sujeto se obtiene preferentemente antes de la provisión de al menos una parte de la terapia, mientras que la segunda muestra se obtiene después de la provisión de la parte de la terapia. Los niveles de producto de IRG en las muestras se comparan, preferentemente frente a una tercera muestra de control también, y se correlaciona con la presencia, o el

riesgo de presencia, de la gripe. Más preferentemente, el nivel de producto de IRG en la segunda muestra se aproxima al nivel de expresión de una tercera muestra control. Un nivel de expresión básicamente disminuido de un IRG indica que la terapia es eficaz para el tratamiento de la gripe.

5 Composiciones Farmacéuticas

La invención se dirige adicionalmente a composiciones farmacéuticas para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero al virus de la gripe, donde dicha composición comprende un anticuerpo suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo anticuerpo se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH). También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de ensayo, o el agente bioactivo, o un modulador de IRG (es decir, agonista o antagonista), que puede incluir adicionalmente un producto de IRG, y se pueden formular tal como se describe en el presente documento. Como alternativa, estas composiciones pueden incluir un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de IRG que se describe en el presente documento y/o una molécula de polinucleótido antisentido que es complementaria a un IRGPN que se describe en el presente documento y se puede formular tal como se describe en el presente documento.

Uno o más de los IRG que se describen en el presente documento, fragmentos de los IRG, productos de IRG, fragmentos de productos de IRG, moduladores de IRG, o anticuerpos anti-IRGPP se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. En particular, el anticuerpo anti-IRGPP de la invención es un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH).

Tal como se usa en el presente documento la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, solubilizantes, cargas, estabilizantes, aglutinantes, absorbentes, bases, agentes de tamponamiento, lubricantes, vehículos de liberación controlada, diluyentes, agentes emulsionantes, humectantes, lubricantes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. En las composiciones también se pueden incorporar agentes suplementarios.

También se describen métodos para preparar composiciones farmacéuticas para modular la expresión o actividad de un polipéptido o polinucleótido que corresponde a un IRG que se describe en el presente documento. Tales métodos comprenden la formulación de un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o actividad de un IRG. Tales composiciones pueden incluir además agentes activos adicionales. Por lo tanto, también se describen métodos para preparar una composición farmacéutica mediante la formulación de un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o actividad de un IRG y uno o más agentes bioactivos adicionales.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), intraperitoneal, transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina; propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición inyectable debería ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista una inyectabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede se mantener, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La

absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un fragmento de un IRGPP o un anticuerpo anti-IRGPP) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

15 Las composiciones orales por lo general incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o se pueden formar comprimidos por compresión. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se traga. Se pueden incluir agentes alucinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Stertes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

25 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de una pulverización en aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

30 La administración sistémica danés se puede realizar con medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes por lo general se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede realizar a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos bioactivos se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica.

40 Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con gases convencionales para supositorio tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

45 En una realización, los restos terapéuticos, que pueden contener un compuesto bioactivo, se preparan con vehículos que protegerán el compuesto frente a la rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de nivelación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener en el mercado por ejemplo en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) como farmacéuticamente aceptables. Éstas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia.

50 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, tal como se usa en el presente documento, incluye unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones individuales para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La memoria descriptiva para las formas unitarias de dosificación de la invención se dicta y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico en particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

60 La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar con procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéutica mente eficaz en un 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL_{50}/DE_{50} . Son preferentes los compuestos que presentan índices terapéuticos elevados. Aunque se pueden usar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las

células sin infectar y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos permanece preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación usada y la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en el método que se describe en el presente documento,

la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Los IRG que se describen en el presente documento se pueden insertar en vectores de administración de genes y usar como vectores para terapia genética. Los vectores para terapia genética se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, mediante administración intravenosa, administración intraportal, administración intrabiliar, administración intraarterial, inyección directa en el parénquima hepático, mediante inyección intramuscular, por inhalación, mediante perfusión, o por inyección estereotáctica. La preparación farmacéutica del vector para terapia genética puede incluir el vector para terapia genética en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en que está embebido el vehículo para administración de genes. Como alternativa, cuando el vector de administración de genes completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración de genes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Kits

También se describen kits para detectar la presencia de un producto de IRG en una muestra biológica, comprendiendo el kit reactivos para evaluar la expresión de los IRG que se describen en el presente documento.

Preferentemente, los reactivos pueden ser un anticuerpo o fragmento del mismo, donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente con una proteína que corresponde a un IRG de la Tabla 3. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos de interés con métodos conocidos en la técnica. Opcionalmente, los kits pueden comprender una sonda de polinucleótido donde la sonda se une específicamente con un polinucleótido transcrito que corresponde con un IRG seleccionado entre el grupo que consiste en los IRG enumerados en la Tabla 3. Los kits también pueden incluir una matriz que los IRG colocada en un biochip, tal como, por ejemplo, un GeneChip[®]. El kit puede contener medios para determinar la cantidad de la proteína de IRG o ARNm en la muestra; y medios para comparar la cantidad de la proteína de IRG o ARNm en la muestra con un control o patrón. El compuesto o agente se pueden basar en un envase adecuado. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para uso del kit para detectar proteína de IRG o polinucleótido.

También se describen kits para evaluar la idoneidad de cada uno de una pluralidad de compuestos para inhibir la gripe en un sujeto. Tales kits incluyen una pluralidad de compuestos a someter a ensayo, y un reactivo (es decir, anticuerpo específico para las proteínas correspondientes, o una sonda o cebador específicos para los polinucleótidos correspondientes) para evaluar la expresión de un IRG enumerado en la Tabla 3.

Matrices y Biochips

También se describe una matriz que comprende un panel de los IRG que se describen en el presente documento.

La matriz se puede usar para someter a ensayo la expresión de uno o más genes en la matriz.

Un experto en la materia observará que los paneles de los IRG que se describen en el presente documento se pueden proporcionar de forma conveniente en soportes sólidos, tales como un biochip. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden acoplar a una matriz (por ejemplo, un biochip usando GeneChip[®] para análisis de hibridación), a una resina (por ejemplo, una resina que se puede empaquetar en una columna para cromatografía en columna), o una matriz (por ejemplo, una matriz de nitrocelulosa para análisis de transferencia de Northern). La inmovilización de las moléculas complementarias al o los IRG, covalente o no coherentemente, permite un análisis discreto de la presencia o la actividad de cada IRG en una muestra. En una matriz, por ejemplo, los polinucleótidos complementarios a cada miembro de un panel de los IRG se pueden unir individualmente a diferentes posiciones conocidas en la matriz. La matriz se puede hibridar con, por ejemplo, polinucleótidos extraídos de una muestra de

5 sangre o colon de un sujeto. La hibridación de polinucleótidos de una muestra con la matriz con en cualquier posición de la matriz se puede detectar, y por lo tanto se puede determinar la presencia la cantidad del IRG y transcritos de IRG en la muestra. En una realización preferente, se usa una matriz basada en un biochip. De forma análoga, se pueden realizar análisis de Western en anticuerpos inmovilizados específicos para los IRGPP hibridados a una muestra de proteína de un sujeto.

10 También será evidente para un experto en la materia que no es necesario que todo el producto de molécula de IRG (proteína o polinucleótido) que se conjugue con el soporte de biochip; una porción del producto de IRG o longitud suficiente para fines de detección (es decir, para hibridación), por ejemplo una porción del producto de IRG que tiene 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100 o más nucleótidos o aminoácidos de longitud puede ser suficiente para fines de detección.

15 Además de tal determinación cualitativa, la divulgación permite la cuantificación de la expresión génica en el biochip. Por lo tanto, se puede comprobar no solo la especificidad del tejido, sino también el nivel de expresión de una batería de IRG en el tejido. Por lo tanto, los IRG se pueden agrupar en base a su expresión tisular *per se* y el nivel de expresión en ese tejido. Tal como se usa en el presente documento, un "nivel normal de expresión" se refiere al nivel de expresión de un gen proporcionado en una muestra de control, por lo general el control se toma ya sea de un animal sano o de un sujeto que no ha padecido la gripe. La determinación de los niveles normales de expresión es útil, por ejemplo, en la determinación de la relación de la expresión genética entre dos o más tejidos. Por lo tanto, se puede alterar un tejido o tipo celular y se puede determinar el efecto sobre la expresión genética en un segundo tejido o tipo de célula. En este contexto, se puede determinar el efecto de un tipo de célula en otro tipo de célula como respuesta a un estímulo biológico. Tal determinación es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de la interacción célula-célula en el nivel de la expresión genética. Si un agente se administra terapéuticamente para tratar un tipo de célula pero tiene un efecto indeseable sobre otro tipo de célula, la divulgación proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto indeseable y por lo tanto proporciona la oportunidad de coadministrar un agente de contrarresto o de otra manera para tratar el efecto no deseado. De forma análoga, incluso dentro de un solo tipo de células, los efectos biológicos indeseables se pueden determinar a nivel molecular. Por lo tanto, se pueden determinar y contrarrestar los efectos de un agente sobre la expresión de otro distinto del gen diana.

30 En otra realización, las matrices se pueden usar para controlar el transcurso del tiempo de la expresión de uno o más genes en la matriz. Esto se puede producir en diversos contextos biológicos, tal como se desvela en el presente documento, por ejemplo, desarrollo y diferenciación, avance de la enfermedad, procesos *in vitro*, tales como transformación y activación celular.

35 La matriz también es útil para determinar el efecto de la expresión de un gen en la expresión de otros genes en la misma célula o en diferentes células. Esto proporciona, por ejemplo, una selección de dianas moleculares alternativas para la intervención terapéutica si no se puede regular el objetivo final o secuencia abajo.

40 De forma importante, se describen matrices útiles para determinar los patrones de expresión diferencial de uno o más genes identificados en tejido enfermo frente a tejido sano. Esto proporciona una batería de genes que sirven como una diana molecular para el diagnóstico o la intervención terapéutica. En particular, se pueden hacer biochips que comprenden matrices no solamente de los IRG específicos para sujetos que padecen de manifestaciones específicas o estadios de la enfermedad.

45 En general, las sondas se unen al biochip en una gran diversidad de formas, tal como lo observarán los expertos en la materia. Tal como se describe en el presente documento, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar primero, con la unión posterior al biochip, o se pueden sintetizar directamente en el biochip.

50 El biochip comprende un sustrato sólido adecuado. Por "sustrato" o "soporte sólido" u otros equivalentes gramaticales en el presente documento se hace referencia a cualquier material que se pueda modificar para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de las sondas de ácido nucleico y es susceptible a al menos un método de detección. Tal como observarán los expertos en la materia, el número de posibles sustratos es muy grande, e incluye, pero no se limita a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo, por ejemplo, acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos y Teflón J), polisacáridos, nylon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos y plásticos.

60 Generalmente el sustrato es plano, aunque como tal como observarán los expertos en la materia, también se pueden usar otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, las sondas se pueden colocar en la superficie interior de un tubo, para el análisis de la muestra de flujo continuo para minimizar el volumen de la muestra. De forma análoga, el sustrato puede ser flexible, como una espuma flexible, que incluye espumas de celdas cerradas hechas de plásticos particulares.

65 En una realización preferente, la superficie del biochip y la sonda se pueden derivatizar con grupos funcionales químicos para la unión posterior de los dos. Por lo tanto, por ejemplo, el biochip se derivatiza con un grupo químico funcional, que incluye, pero no se limita a, grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo y grupos tiol, con grupos amino

siendo particularmente preferentes. Usando estos grupos funcionales, las sondas se pueden unir usando grupos funcionales en las sondas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que contienen grupos amino se pueden unir a superficies que comprenden grupos amino. También se pueden usar conectores, tales como enlazadores homo- o hetero-bifuncionales.

5 En una realización, los oligonucleótidos se sintetizan tal como se conoce en la técnica, y a continuación se unen a la superficie del soporte sólido. Tal como observarán los expertos en la materia, el extremo 5' o 3' se puede unir al soporte sólido, o la unión se puede realizar a través de un nucleósido interno.

10 En una realización adicional, la inmovilización al soporte sólido puede ser muy fuerte, aunque no covalente. Por ejemplo, se pueden preparar oligonucleótidos biotinilados, que se unen a las superficies covalentemente revestidas con estreptavidina, dando como resultado la unión.

15 Como alternativa, los oligonucleótidos se pueden sintetizar en la superficie, tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, se usan técnicas de fotoactivación que usan compuestos y técnicas de fotopolimerización. En una realización preferente, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar *in situ*, usando técnicas fotolitográficas bien conocidas.

20 Las modificaciones de las composiciones y métodos descritos anteriormente de acuerdo con técnicas convencionales, serán rápidamente evidentes para un experto en la materia.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deberían interpretar como limitantes.

25 Células huésped

También se describen células huésped en que se describe una molécula de polinucleótido en el presente documento, por ejemplo, un IRG de la Tabla 3 u homólogo del mismo, se introduce dentro de un vector de expresión, un vector de administración de genes, o una molécula de polinucleótido que se describe en el presente documento que contiene secuencias que la permiten recombinarse de forma homóloga en un sitio específico del genoma de la célula huésped. Las expresiones "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no solo a la célula objetivo en particular sino también a la progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que se pueden producir determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula precursora, pero aún así se incluye dentro del alcance de la expresión tal como se usa en el presente documento.

40 Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un IRG se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células de rata Fischer 344, células de rata HLA-B27, células HeLa, células A549 o células 293. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

45 El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas a través de técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden hacer referencia a una diversidad de técnicas reconocidas en la técnica para la introducción de polinucleótido foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo co-precipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DAKD-dextrano, lipofección, o electroporación.

50 Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo de la técnica de vector de expresión y transfección usada, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica una señal seleccionable (*por ejemplo*, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped junto con el gen de interés. Las señales seleccionables preferentes incluyen aquéllas que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Se puede introducir polinucleótido que codifica una señal seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica STK3P23 o se puede introducir en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el polinucleótido introducido se pueden identificar por selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen de señal seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

60 Una célula huésped que se describe en el presente documento, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, se puede usar para producir (es decir, expresar) un producto de IRG. Por consiguiente, también se describen métodos para producir un producto de IRG usando las células huésped que se describen en el presente documento. En una realización, el método comprende cultivar la célula huésped que se describe en el presente documento (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un IRG) en un medio adecuado de modo que se produce un producto de IRG. En otra realización, el método comprende adicionalmente aislar el producto de IRG del medio o de la célula huésped.

65

Animales transgénicos y con genosupresión

Las células huésped que se describen en el presente documento también se pueden usar para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en una realización, una célula huésped que se describe en el presente documento es un ovocito fertilizado o una célula madre embrionaria en que se ha introducido una secuencia de IRG. Tales células huésped pueden se usar a continuación para crear animales transgénicos no humanos en que se ha introducido en su genoma una secuencia exógena que codifica un IRG o animales recombinantes homólogos en que se ha alterado una secuencia endógena que codifica un IRG. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o actividad del IRG y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de IRG. Tal como se usa en el presente documento, un "animal transgénico" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un roedor tal como una rata o ratón, en que una o más de las células del animal incluye un transgén. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos y anfibios. Un transgén es ADN exógeno que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo de ese modo la expresión de un producto genético codificado en uno o más tipos de células o tejidos del animal transgénico. Tal como se usa en el presente documento, un "animal recombinante homólogo" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en que un IRG endógeno se ha alterado mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

Un animal transgénico que se describe en el presente documento se pueden crear mediante la introducción de un polinucleótido que codifica IRG en los pronúcleos compañeros de un ovocito fertilizado, por ejemplo, mediante microinyección o infección retroviral, y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal adoptivo hembra pseudopreñada. En el transgén también se pueden incluir secuencias intrónicas y señales de poliadenilación para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Una secuencia reguladora específica de tejido se puede unir de forma operativa a un transgén para dirigir la expresión de un IRG a células en particular. Los métodos para generar animales transgénicos a través de manipulación y microinyección de embriones, particularmente animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica. Se usan métodos similares para la producción de otros animales transgénicos. Un animal fundador transgénico se puede identificar en base a la presencia de un transgén que se describe en el presente documento en su genoma y/o expresión de ARNm correspondiente a un gen que se describe en el presente documento en tejidos o células de los animales. Un animal fundador transgénico se puede usa la continuación para criar animales adicionales que llevan el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan un IRG se pueden criar adicionalmente para otros animales transgénicos que llevan otros transgenes.

Para crear un animal recombinante homólogo (animal genosuprimido), se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen que se describe en el presente documento en que se ha introducido una supresión, adición o sustitución para alterar de ese modo, por ejemplo, interrumpir funcionalmente, el gen. El gen puede ser un gen humano, pero más preferentemente, es un homólogo no humano de un gen humano de la invención (por ejemplo, un homólogo de un IRG). Por ejemplo, se puede usar un gen de ratón para construir una molécula de polinucleótido de recombinación homóloga, por ejemplo, un vector, adecuada para alterar un gen endógeno que se describen en el presente documento en el genoma del ratón. En una realización preferente, la molécula de polinucleótido de recombinación homóloga se diseña de tal manera que, después de recombinación homóloga, el gen endógeno que se describe en el presente documento se altera funcionalmente (es decir, ya no codifica una proteína funcional; también se denomina un vector de "genosupresión"). Como alternativa, la molécula de polinucleótido de recombinación homóloga se puede diseñar de tal manera que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno se muta o de otro modo se altera pero aún codifica la proteína funcional (por ejemplo, la región reguladora secuencia arriba se puede alterar para alterar de ese modo la expresión endógena del IRG). En la molécula de polinucleótido de recombinación homóloga, la porción alterada del gen que se describe en el presente documento está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por la secuencia de polinucleótidos adicional del gen que se describe en el presente documento para permitir que se produzca recombinación homóloga entre el gen exógeno portado por la molécula de polinucleótido de recombinación homóloga y un gen endógeno en una célula, por ejemplo, una célula madre embrionaria. La secuencia de polinucleótidos de flanqueo adicional tiene una longitud suficiente para recombinación homóloga satisfactoria con el gen endógeno.

Por lo general, en la molécula de polinucleótido de recombinación homóloga se incluyen varias kilobases de ADN de flanqueo (ambas en los extremos 5' y 3') (véase, por ejemplo, Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987) Cell 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). La molécula de polinucleótido de recombinación homóloga se introduce en una célula, por ejemplo, una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan células en que el gen introducido se ha recombinado de forma homóloga con el gen endógeno. Las células seleccionadas se pueden inyectar a continuación en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación (véase, por ejemplo, Bradley, S.A. en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) páginas 113-152). Un embrión quimérico se puede implantar a continuación en un animal adoptivo hembra pseudopreñada adecuado y el embrión se lleva a término. La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede usar para criar animales en que todas las células del animal contienen el ADN recombinado reforma

homóloga por transmisión de la línea germinal del transgén. Los métodos para construir moléculas de polinucleótidos de recombinación homóloga, por ejemplo, vectores o animales recombinantes homólogos se describen adicionalmente en Bradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2: 823-829 y en las Publicaciones Internacionales de PCT N°: WO 90/11354 de Le Mouellee *et al.*; N° WO 91/01140 de Smities *et al.*; N° WO 92/0968 de Zijlstra *et al.*; y N° WO 93/04169 de Berns *et al.*

En otra realización, se pueden producir animales no humanos transgénicos que contengan sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de tal sistema es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa cre/loxP, véase, por ejemplo, Laksa *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 6.232-6.236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O' Gorman *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355. Si se usa un sistema de recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgen, se necesitan animales que contengan transgenes que codifican tanto la recombinasa Cre como una proteína seleccionada. Tales animales se pueden proporcionar a través de la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, apareando dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica una proteína seleccionada y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa.

También se pueden producir clones de los animales transgénicos no humanos que se describen en el presente documento de acuerdo con los métodos que se describen en Wilmot, I. *et al.* (1997) *Nature* 385: 810-813 y en las Publicaciones Internacionales de PCT N° WO 97/07668 y N° WO 97/07669. En resumen, una célula, por ejemplo, una célula somática, del animal transgénico se puede aislar e inducir para que salga del ciclo de crecimiento y entrar en la fase Go. La célula quiescente se puede fusionar a continuación, por ejemplo, a través del uso de pulsos eléctricos, a un ovocito enucleado de un animal de la misma especie a partir del que se aísla la célula quiescente. El ovocito reconstruido se cultiva a continuación de tal manera que se desarrolla a mórula o blastocito y a continuación se transfiere a un animal adoptivo hembra pseudoprefada. La descendencia nacida de este animal adoptivo hembra será un clon del animal a partir del que se aísla la célula, por ejemplo, la célula somática.

Las modificaciones de las composiciones y métodos y se han descrito anteriormente, de acuerdo con técnicas estándar, serán rápidamente evidentes para un experto en la materia.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de vectores de RHKO e identificación sistemática de clones resistentes a la gripe

Los vectores RHKO se construyeron tal como se describe en Li *et al.* (Li *et al.* *Cell*, 85: 319-329, 1996). El procedimiento para la identificación sistemática de clones resistentes a la gripe se representa en la Figura 1. En resumen, células de Riñón Canino Madin Darby (MDCK) se infectaron con un vector genosuprimido homocigoto con base retro-viral (RHKO). Se seleccionaron células que contenían el vector integrado de forma estable y se sometieron a infección por gripe usando la MOI que daría como resultado la eliminación de un 100 % de las células precursoras entre 48 y 72 horas. Las células de resistencia a la gripe se expandieron y se sometieron a rondas adicionales de infección con gripe con mayor multiplicidad de infección (MOI). Se recuperaron los clones resistentes que sobrevivieron a múltiples rondas de infección con gripe. El fenotipo de resistencia a la gripe se validó sometiendo a ensayo la resistencia de los clones a múltiples cepas del virus de la gripe y por correlación del fenotipo con integración de RHKO. Los sitios de integración de RHKO en las células de resistencia se clonaron a continuación y se identificaron tal como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2: Identificación de genes de resistencia a la gripe

Los sitios de integración de RHKO en las células resistentes se clonaron y se determinaron las secuencias que flanqueaban el sitio de integración de RHKO. Los genes afectados se identificaron por alineación de las secuencias de flanqueo en el sitio de integración con la base de datos de Genbank.

La Figura 2A muestra la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon 26-8-7 de resistencia a la gripe. La secuencia consenso derivada de la alineación (SEC ID N°: 1) se usó para identificar el gen PTCH afectado (SEC ID N°s: 9 y 17). La Figura 2B representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 2C, la posición de la integración de RHKO indica que el gen PTCH probablemente se va a inactivar con la expresión antisentido a partir del constructo de RHKO.

La Figura 3A muestra la alineación de las secuencias de flanqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de dos subclones del clon R18-6 de resistencia a la gripe. La secuencia consenso derivada de la alineación (SEC ID N°: 2) se usó para identificar el gen PSMD2 afectado (SEC ID N°s: 10 y 18). La Figura 3B representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 3C, la posición de la integración de RHKO indica que el gen PSMD2 probablemente se va a sobreexpresar debido a la activación por el constructo de RHKO.

- 5 La Figura 4A muestra la alineación de las secuencias de flaqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon R26-8-11 de resistencia a la gripe. La secuencia consenso derivada de la alineación (SEC ID N°: 3) se usó para identificar el gen NMT1 afectado (SEC ID N°s: 11 y 19). La Figura 4B representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 4C, la posición de la integración de RHKO indica que el gen NMT1 probablemente se va a inactivar por la alteración del promotor por el constructo de RHKO.
- 10 La Figura 5A muestra la alineación de las secuencias de flaqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon 26-8-11 de resistencia a la gripe. La secuencia consenso derivada de la alineación (SEC ID N°: 4) se usó para identificar el gen MACRO afectado (SEC ID N°s: 12 y 20). La Figura 5B representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 5C, la posición de la integración de RHKO indica que el gen MACRO probablemente se va a sobreexpresar debido a la integración del constructo de RHKO.
- 15 La Figura 6A muestra la alineación de las secuencias de flaqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de tres subclones del clon R21-1 de resistencia a la gripe. La secuencia consenso derivada de la alineación (SEC ID N°: 5) se usó para identificar el gen CDK6 afectado (SEC ID N°s: 13 y 21). La Figura 6B representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 6C, la posición de la integración de RHKO indica que el gen CDK6 probablemente se va a inactivar por la integración del constructo de RHKO debido a la alteración del promotor.
- 20 La secuencia de flaqueo del extremo en la posición 5' (SEC ID N°: 6) obtenida a partir del clon R27-32 de resistencia a la gripe se usó para identificar el gen FLJ16046 afectado (SEC ID N°s: 14 y 22). La Figura 7 representa el sitio genómico de la integración de RHKO. La posición de la integración de RHKO indica que el gen FLJ1604 probablemente se va a sobreexpresar debido a la integración del constructo de RHKO.
- 25 La Figura 8A muestra la alineación de las secuencias de flaqueo del extremo en la posición 5' obtenidas a partir de dos subclones del clon R27-3-33 de resistencia a la gripe. La secuencia consenso derivada de la alineación (SEC ID N°: 7) se usó para identificar el gen PCSK6 afectado (SEC ID N°s: 15 y 23). La Figura 8B representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 8C, la posición de la integración de RHKO indica que el gen PCSK6 probablemente se va a inactivar por la transcripción antisentido a partir del constructo de RHKO.
- 30
- 35 La secuencia de flaqueo del extremo en la posición 5' (SEC ID N°: 8) obtenida a partir del clon R27-3-35 de resistencia a la gripe se usó para identificar el gen PTGDR afectado (SEC ID N°s: 16 y 24). La Figura 9A representa el sitio genómico de la integración de RHKO. Tal como se muestra en la Figura 9B, la posición de la integración de RHKO indica que el gen PTGDR probablemente se va a inactivar por la transcripción antisentido a partir del constructo de RHKO.

SEC ID N°: 1 flanqueo de PTCH

TAAACGTAAAAAGTAGCCAAGCGCACGGGGGAAGGGCCCCGGCCGGCGCAGGC
AGGGGTC
CCGGNTGGGCTGCGGCTGATCCCGGCNGCNGCGTGATCTCGGCGCTGGCCGCATG
CCCCG
GCGGGNCCCCGTCTGGGTGCTCGCCTTCCCCGGATTCCACNCATTGCAGCGAGCC
TCGTA
AACNCAATGAANCCGGCCGCTTGGCAGACCCGCACCGCGGANTTAANGTGGCAA
TTTGTT
TACNNCTTTCCCTCTCCCCCAGGCTCTGGGAAGAGGNGACTCAAAAAGTAAAA
GGAAG
AGGGGAGATGCCCTCTTTNAAGGATAATTTTTAAGGGGGNNGANATTTTCNAGCTC
AGCAA
AAGCAAACCGGATGCCAAAAAAGGAAACCACCTTTATTTTCNGCTNCCTCCCCC
CTTCC

ATCTCTCCGCCTCTCTCCACTCCGCTTTCNCCCTCAAAGATGTTAAAAAATGT
GGCA
GCATTTTCNCGGGNNTTGGGACNGCAAANTAAGGNGCCAAGGGGCTANGNCCATC
TGGGGT

TCTCCNNGGGCNCGGGTNTNCCGGGTCGNTGACCTCGCGGACTGTNTGGCNNTCN
TAGNA
TGGCNCCCGCANAANCGCTNTNCANTNNTCTGTNAAAAGGNATNNCTTTTAANCN
TCCTT
ACNACCCNTCCNACCNCACCCAAATNANNTTTNTTCTTGNATATGCTGATNNATC
NCTTG
CCGATTTCTTAANCNTCTTNCCTACCCNTGNNNCAAGGGNAGGTATANNT

SEC ID N° 9, ADNc de PTCH

GCGCCCGCCGTGTGAGCAGCAGCAGCGGCTGGTCTGTCAACCGGAGCCCGAGCC
CGAGCA
GCCTGCGGCCAGCAGCGTCCTCGCAAGCCGAGCGCCAGGCGCGCCAGGAGCCC
GCAGCA
GCGGCAGCAGCGCGCCGGGCCGCCGGGAAGCCTCCGTCCCCGCGGCGGGCGGGC
GCGGCG
GCGGCAACATGGCCTCGGCTGGTAACGCCGCCGAGCCCCAGGACCGCGGGCGGGC
GCGGCA
GCGGCTGTATCGGTGCCCCGGGACGGCCGGCTGGAGGCGGGAGGCGCAGACGGA
CGGGGG
GGCTGCGCCGTGCTGCCGCGCCGGACCGGGACTATCTGCACCGGCCAGCTACTG
CGACG
CCGCCTTCGCTCTGGAGCAGATTTCCAAGGGGAAGGCTACTGGCCGGAAGCGCC
GCTGT
GGCTGAGAGCGAAGTTTCAGAGACTCTTATTTAAACTGGGTTGTTACATTCAAAA
AAACT
GCGGCAAGTTCTTGGTTGTGGGCCTCCTCATATTTGGGGCCTTCGCGGTGGGATTA
AAAG
CAGCGAACCTCGAGACCAACGTGGAGGAGCTGTGGGTGGAAGTTGGAGGACGAG
TAAGTC

5

GTGAATTAAATTATACTCGCCAGAAGATTGGAGAAGAGGCTATGTTTAATCCTCA
ACTCA
TGATACAGACCCCTAAAGAAGAAGGTGCTAATGTCCTGACCACAGAAGCGCTCCT
ACAAC
ACCTGGACTCGGCACTCCAGGCCAGCCGTGTCCATGTATACATGTACAACAGGCA
GTGGA
AATTGGAACATTTGTGTTACAAATCAGGAGAGCTTATCACAGAAACAGGTTACAT
GGATC
AGATAATAGAATATCTTTACCCTTGTTTGATTATTACACCTTTGGACTGCTTCTGG
GAAG
GGGCGAAATTACAGTCTGGGACAGCATAACCTCCTAGGTAAACCTCCTTTGCGGTG
GACAA
ACTTCGACCCTTTGGAATTCCTGGAAGAGTTAAAGAAAATAAACTATCAAGTGGA
CAGCT
GGGAGGAAATGCTGAATAAGGCTGAGGTTGGTCATGGTTACATGGACCGCCCCT
GCCTCA
ATCCGGCCGATCCAGACTGCCCCGCCACAGCCCCAACAAAAATTCAACCAAACC
TCTTG
ATATGGCCCTTGTTTTGAATGGTGGATGTCATGGCTTATCCAGAAAGTATATGCA
CTGGC
AGGAGGAGTTGATTGTGGGTGGCACAGTCAAGAACAGCACTGGAAAACCTCGTCA
GCGCCC
ATGCCCTGCAGACCATGTTCCAGTTAATGACTCCCAAGCAAATGTACGAGCACTT
CAAGG
GGTACGAGTATGTCTCACACATCAACTGGAACGAGGACAAAGCGGCAGCCATCC
TGGAGG
CCTGGCAGAGGACATATGTGGAGGTGGTTCATCAGAGTGTGCGCACAGAACTCCAC
TCAA

AGGTGCTTTCCTTCACCACCACGACCCTGGACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGAC
GTCA
GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATGCTCGCCTATGCCTGTCTAACC
ATGC
TGCGCTGGGACTGCTCCAAGTCCCAGGGTGCCGTGGGGCTGGCTGGCGTCCTGCT
GGTTG
CACTGTCAGTGGCTGCAGGACTGGGCCTGTGCTCATTGATCGGAATTTCTTTAAC
GCTG
CAACAACCTCAGGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTGTGGTGTGGATGATGTTTTT
CTTC
TGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAAGAATCCCTTTTGAGGACA
GGACCG
GGGAGTGCCTGAAGCGCACAGGAGCCAGCGTGGCCCTCACGTCCATCAGCAATG
TCACAG
CCTTCTTCATGGCCGCGTTAATCCCAATCCCCTCTGCGGGCGTTCTCCCTCCAG
GCAG
CGGTAGTAGTGGTGTTC AATTTTGCCATGGTTCTGCTCATTTTTCTGCAATTCTC
AGCA
TGGATTTATATCGACGCGAGGACAGGAGACTGGATATTTTCTGCTGTTTTACAAG
CCCCT
GCGTCAGCAGAGTGATTCAGGTTGAACCTCAGGCCTACACCGACACACACGACA
ATACCC
GCTACAGCCCCCACCTCCCTACAGCAGCCACAGCTTTGCCCATGAAACGCAGAT
TACCA
TGCAGTCCACTGTCCAGCTCCGCACGGAGTACGACCCCCACACGCACGTGTACTA
CACCA
CCGCTGAGCCGCGCTCCGAGATCTCTGTGCAGCCCGTCACCGTGACACAGGACAC
CCTCA

GCTGCCAGAGCCCAGAGAGCACCAGCTCCACAAGGGACCTGCTCTCCCAGTTCTC
CGACT
CCAGCCTCCACTGCCTCGAGCCCCCTGTACGAAGTGGACACTCTCATCTTTTGCT
GAGA
AGCACTATGCTCCTTTCCTCTTGAAACCAAAAGCCAAGGTAGTGGTGATCTTCCTT
TTTC
TGGGCTTGCTGGGGGTCAGCCTTTATGGCACCCCGAGTGAGAGACGGGCTGGA
CCTTA
CGGACATTGTACCTCGGGAAACCAGAGAATATGACTTTATTGCTGCACAATTCAA
ATACT
TTTCTTTCTACAACATGTATATAGTCACCCAGAAAGCAGACTACCCGAATATCCA
GCACT
TACTTTACGACCTACACAGGAGTTTCAGTAACGTGAAGTATGTCATGTTGGAAGA
AAACA
AACAGCTTCCCAAATGTGGCTGCACTACTTCAGAGACTGGCTTCAGGGACTTCA
GGATG
CATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATG
GATCAG
ACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGCC
CATCG
ACATCAGCCAGTTGACTAAACAGCGTCTGGTGGATGCAGATGGCATCATTAAATCC
CAGCG
CTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGTCAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCC
TCCC
AGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAGAATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACA
TGCCTG
AAACAAGGCTGAGAATCCCGGCAGCAGAGCCCATCGAGTATGCCAGTTCCCTTT
CTACC

TCAACGGCTTGCGGGACACCTCAGACTTTGTGGAGGCAATTGAAAAAGTAAGGA
CCATCT
GCAGCAACTATACGAGCCTGGGGCTGTCCAGTTACCCCAACGGCTACCCCTTCCT
CTTCT
GGGAGCAGTACATCGGCCTCCGCCACTGGCTGCTGCTGTTTCATCAGCGTGGTGTT
GGCCT
GCACATTCCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTCTGAACCCCTGGACGGCCGGGATCATT
GTGA
TGGTCCTGGCGCTGATGACGGTCGAGCTGTTCCGGCATGATGGGCCTCATCGGAAT
CAAGC
TCAGTGCCGTGCCCGTGGTCATCCTGATCGCTTCTGTTGGCATAGGAGTGGAGTTC
ACCG
TTCACGTTGCTTTGGCCTTTCTGACGGCCATCGGCGACAAGAACCGCAGGGCTGT
GCTTG
CCCTGGAGCACATGTTTGCACCCGTCCCTGGATGGCGCCGTGTCCACTCTGCTGGG
AGTGC
TGATGCTGGCGGGATCTGAGTTCGACTTCATTGTCAGGTATTTCTTTGCTGTGCTG
GCGA
TCCTCACCATCCTCGGCGTTCTCAATGGGCTGGTTTTGCTTCCCGTGCTTTTGTCTT
TCT
TTGGACCATATCCTGAGGTGTCTCCAGCCAACGGCTTGAACCGCCTGCCACACC
CTCCC
CTGAGCCACCCCCAGCGTGGTCCGCTTCGCCATGCCGCCCGGCCACACGCACAG
CGGGT
CTGATTCCTCCGACTCGGAGTATAGTTCCAGACGACAGTGTCAGGCCTCAGCGA
GGAGC
TTCGGCACTACGAGGCCAGCAGGGCGCGGGAGGCCCTGCCACCAAGTGATCG
TGGAAG

CCACAGAAAACCCCGTCTTCGCCCACTCCACTGTGGTCCATCCCGAATCCAGGCA
TCACC
CACCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTGCCTCCCGG
ACGGC
AAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCACCCCTCT
ACAGAC
CGCGCAGAGACGCTTTTGAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCTAGCAATAG
GGCCC
GCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCGTCCACTGC
CATGG
GCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCCTGTGACGGCTTCTGCCTC
CGTGA
CTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCCCGAGGGGG
ACTCT
GCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCACGTGCCTTT
CCACG
TCCGGTGTGAGAGGAGGGATTTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAGGACGTGG
AATGCG
AGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACCTGAGGGTGATTAATAATCTGAAGCAA
AGAGGC
CAAAGATTGGAAACCCCCACCCCCACCTCTTCCAGAACTGCTTGAAGAGAACT
GGTTG
GAGTTATGGAAAAGATGCCCTGTGCCAGGACAGCAGTTCATTGTTACTGTAACCG
ATTGT
ATTATTTTGTAAATATTTCTATAAATATTTAAGAGATGTACACATGTGTAATATA
GGAA
GGAAGGATGTAAAGTGGTATGATCTGGGGCTTCTCCACTCCTGCCCCAGAGTGTG
GAGGC

CACAGTGGGGCCTCTCCGTATTTGTGCATTGGGCTCCGTGCCACAACCAAGCTTC
ATTAG
TCTTAAATTTT CAGCATATGTTGCTGCTGCTTAAATATTGTATAATTTACTTGTATA
ATTC
TATGCAAATATTGCTTATGTAATAGGATTATTTTGTAAAGGTTTCTGTTTAAAATA
TTTT
AAATTTGCATATCACAACCCTGTGGTAGTATGAAATGTTACTGTTAACTTTCAAAC
ACGC
TATGCGTGATAATTTTTTTGTTTAAATGAGCAGATATGAAGAAAGCACGTTAATCCT
GGTG
GCTTCTCTAGGTGTCGTTGTGTGCGGTCCTCTTGTTTGGCTGTGCGTGTGAACACG
TGTG
TGAGTTCACCATGTACTGTACTGTGATTTTTTTTTTTGTCTTGTTTTGTTTCTCTACA
CTG
TCTGTAACCTGTAGTAGGCTCTGACCTAGTCAGGCTGGAAGCGTCAGGATATCTT
TTCTT
CGTGCTGGTGAGGGCTGGCCCTAAACATCCACCTAATCCTTTCAAATCAGCCCGG
CAAAA
GCTAGACTCTCCTCGTGTCTACGGCATCTCTTATGATCATTGGCTGCCATCCAGGA
CCCC
AATTTGTGCTTCAGGGGGATAATCTCCTTCTCTCGGATCATTGTGATGGATGCTGG
AACC
TCAGGGTATGGAGCTCACATCAGTTCATCATGGTGGGTGTTAGAGAATTCGGTGA
CATGC
CTAGTGCTGAGCCTTGGCTGGGCCATGAGAGTCTGTATACTCTAAAAAGCATGCA
GCATG
GTGCCCTCTTCTGACCAACACACACACGACCCCTCCCCAACACCCCCAAATTC
AAGAG

TGGATGTGGCCCTGTCACAGGTAGAAAAACCTATTTAGTTAATTCTTTCTTGGCCC
ACAG
TCTCCAGAAATGATGTTTTGAGTCCCTATAGTTTAAACTCCCTCTCTTAAATGGA
GCAG
CTGGTTGAGGCTTTCTAGATCTGTTTGCATCTTCTTTAAAACTAAGTGGTGAGCAT
GCAT
TGTGGTGTAGAGGCAGGCATTATGTAGGATAAGAGCTCCGGGGGGATTCTTCATG
CACCA
GTGTTTAGGGTACGTGCTTCCTAAGTAAATCCAAACATTGTCTCCATCCTCCCCGT
CATT
AGTGCTCTTCAATGTGATGTGGGAAAGCAGGAGGATGGACACACCCCACTGAA
AGATGT
AGGCAGGGGCAGGTCTCTCAACCAGGCATATTTTTAAAAGTTGCTTCTGTACTGG
TTCTC
TTCTTTTGCTCTGAGGTGTGGGCTCCCTCATCTCGTAACCAGAGACCAGCACATGT
CAGG
GAAGCACCCAGTGTCGGCTCCCCATCCAAATCCACACCAGCACCTTGTTACAGAC
AAGAA
GTCAGAGGAAAGGGCGGGGTCCCTGCAGGGCTGAAGCCTAAGCTACTGTGAGGC
GCTCAC
GAGTGGCAGCTCCTGTTACTCCCTTTTAAATTACCTGGGAAATCTTAACAGAAAG
GTAAT
GGGCCCCCAGAAATACCCACAGCATAGTGACCTCAGACCCTGATACTCACCACAA
AACTT
TTAAGATGCTGATTGGGAGCCGCTTGTGGCTGCTGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
CGTGC
GTGCGTGTGTGTGTGTCTCTGCTGGGGACCCTGGCCACCCCCCTGCTGCTGTCTTG
GTGC

CTGTCACCCACATGGTCTGCCATCCTAACACCCAGCTCTGCTCAGAAAACGTCCT
GCGTG
GAGGAGGGATGATGCAGAATTCTGAAGTCGACTTCCCTCTGGCTCCTGGCGTGCC
CTCGC
TCCCTTCTGAGCCCAGCTCGTGTTGCGCCGGAGGCTGCGCGGCCCTGATTTCTG
CATG
GTGTAGAACTTTCTCCAATAGTCACATTGGCAAAGGGAGAACTGGGGTGGGCGG
GGGGTG
GGGCTGGCAGGGAATTAGAATTTCTCTCTCTTTTAATAGTTTTATTTGTCTGTC
CTG
TTTGTTCAATTTGGATGTTTTAATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEC ID N°: 17, proteína de PTCH

MASAGNAAEPQDRGGGGSGCIGAPGRPAGGGRRRRRTGGLRRAAPDRDYL
HRPSYCDAFALEQISKGKATGRKAPLWLRAKFQRLLFKLGCIYQKNCBK
FLVVGLLIFGAFVGLKAANLETNVEELWVEVGGRVSRELYNYTRQKIGEE
AMFNPQLMIQTPKEEGANVLTTEALLQHLDLQASRVHVYMYNRQWKLE
HLCYKSGELITETGYMDQIIEYLYPCLITPLDCFWEAKLQSGTAYLLG
KPPLRWTFNDFLEELKINQVDSWEEMLNKAEVGHGYMDRPLNPA
DPDCPATAPNKNSTKPLDMALVLNNGGCHGLSRKYMHWQEELIVGGTVKS
TGKLVSAHALQTMFQLMTPKQMYEHFKGYEYVSHINWNEKAAAILEAWQ
RTYVEVVHQSVQNSTQKVLSTTTTLDLILKSFSDVSVIRVASGYLLML
AYACLMLRWDCSKSQGAVGLAGVLLVALSVAAGLGLCSLIGISFNAATT
QVLPFLALGVGVDDVFLLAHAFSETGQNKRIPFEDRTGECLKRTGASVAL
TSISNVTAFMAALIPALRAFSLQAAVVVVFNFAMVLLIFPAILSMDL
YRREDRRLDIFCCFTSPCVSRVIQVEPQAYTDTHDNTRYSPPPYSSHSF
AHETQITMQSTVQLRTEYDPHTHVYYTTAEPRSEISVQPVTVTQDTLSCQ
SPESTSSTRDLSQFSDSSLHCLEPPCTKWTLSSFAEKHYAPFLKPKAK
VVVIFLFLGLLGVSLYGTTRVRDGLDLTDIVPRETREYDFIAAQFKYFSF

5

YNMYIVTQKADYPNIQHLLYDLHRSFSNVKYVMLEENKQLPKMWLHYFRI
WLQGLQDAFSDSWETGKIMPNNYKNGSDDGVLAYKLLVQTGSRDKPIDIS
QLTKQRLVDADGIINPSAFYIYLTAWVSNDPVAYAASQANIRPHRPEWVH
DKADYMPETRLRIPAAEPIEYAQFPFYLNGLRDTSDFVEAIEKVRTICSN
YTSLGLSSYPNGYPFLFWEQYIGLRHWLLLFISVVLACTFLVCAVFLNP
WTAGIIVMVLALMTVELFGMMGLIGIKLSAVPVVILIASVGIGVEFTVHV
ALAFLLTAIGDKNRRAVLALEHMFAPVLDGAVSTLLGVLMLAGSEFDFIVR
YFFAVLAILTILGVLNGLVLLPVLLSFFGPYPEVSPANGLNRLPTPSPEP
PPSVVRFAMPPGHTHSGSDSSDSEYSSQTTVSGLSEELRHVEAQQGAGGP
AHQVIVEATENPVFAHSTVVHPESRHHPPSNPRQQPHLDSGSLPPGRQQQ
QPRRDPPREGLWPPLYRPRRDAFEISTEGHSGPSNRARWGPRGARSHNPR
NPASTAMGSSVPGYCQPITTVTASASVTVAVHPPPVPGPGRNPRGGLCPG
YPETDHGLFEDPHVPHVRCERRDSKVEVIELQDVECEERPRGSSSN

SEC ID N°: 2 flanqueo de PSMD2

CTTCTTCNTGACTCCTGGATTTCTCTGTTCNCAACGGGACACAGCCTTACCAAAT
TCAA
ACGGCCGAGAGGACGTTATGTATCATCTAGAACTAATCCTGACTTCAACAGTGTC
CTTCA
CACCCCTTCTAAGTCAAATCACGGAAAGACTCAAAAGACAGAGATTGAAGAAGG
CAAAGC
CTGTGTCTTGATCTGCCTTTAGTTCTAGAGTTTAGCATCNGAGCATANGACCACAT
TGTA
TTGATGGACTCCGACCAGGNTCCGCAGGNGGATTTAAGGTGGGGGCGGTACGCG
GCAGGT
GGTACCCGACCACTCTCCTTACCNNGGGGTAAAACGTTACGAGGTTAATATTCC
GCGGC
GGCGGAAGTAGATACAGGTTGCAGATCTCACACGGGCGGCGATCAAGCATTCCG
GACGTG

5

AAGAGTCTCGTTCGTCTGTCCCACCACGCAGCCGACTGCGGTGTCACTGTGGGTA
CCGGT
CGCTCGGCNAGTAAGGAGACCCCGCGGGCGGNCCCTCGGNTCGCGGCTCTTCATC
TCCTA
CCGCAGCCAGCGGACTCGGATCNCAGACTGCACGGCCNCATGGCCTTCCGGAAA
CTCCCG
GTCCGAGCCGGGGCGGCGCCTGGGGCGNATNAACNGTTAGAACTTGCAGTTTTG
GGGGCG
GNCTCCGAGGGNGGGGGTCCAGGGCCCGGGCCTCNCGAAA

SEC ID N°: 10, ADNc de PSMD2

TGCGCGCGCAGCGGGCCGGCAGTGGCGGCGGAGATGGAGGAGGGAGGCCGGGA
CAAGGCG
CCGGTGCAGCCCCAGCAGTCTCCAGCGGCGGCCCCGGCGGCACGGACGAGAAG
CCGAGC
GGCAAGGAGCGGCGGGATGCCGGGGACAAGGACAAAGAACAGGAGCTGTCTGA
AGAGGAT
AAACAGCTTCAAGATGAACTGGAGATGCTCGTGGAACGACTAGGGGAGAAGGAT
ACATCC
CTGTATCGACCAGCGCTGGAGGAATTGCGAAGGCAGATTCGTTCTTCTACAACCT
CCATG
ACTTCAGTGCCCAAGCCTCTCAAATTTCTGCGTCCACACTATGGCAAACCTGAAGG
AAATC
TATGAGAACATGGCCCCTGGGGAGAATAAGCGTTTTGCTGCTGACATCATCTCCG
TTTTG
GCCATGACCATGAGTGGGGAGCGTGAGTGCCTCAAGTATCGGCTAGTGGGCTCCC
AGGAG
GAATTGGCATCATGGGGTCATGAGTATGTCAGGCATCTGGCAGGAGAAGTGGCT
AAGGAG

5

TGGCAGGAGCTGGATGACGCAGAGAAGGTCCAGCGGGAGCCTCTGCTCACTCTG
GTGAAG
GAAATCGTCCCCTATAACATGGCCCACAATGCAGAGCATGAGGCTTGCGACCTGC
TTATG
GAAATTGAGCAGGTGGACATGCTGGAGAAGGACATTGATGAAAATGCATATGCA
AAGGTC
TGCCTTTATCTCACCAGTTGTGTGAATTACGTGCCTGAGCCTGAGAACTCAGCCCT
ACTG
CGTTGTGCCCTGGGTGTGTTCCGAAAGTTTAGCCGCTTCCCTGAAGCTCTGAGATT
GGCA
TTGATGCTCAATGACATGGAGTTGGTAGAAGACATCTTCACCTCCTGCAAGGATG
TGGTA
GTACAGAAACAGATGGCATTGCTAGGCCGGCATGGGGTGTTCCTGGAGCTGA
GTGAA
GATGTCGAGGAGTATGAGGACCTGACAGAGATCATGTCCAATGTACAGCTCAAC
AGCAAC
TTCTTGGCCTTAGCTCGGGAGCTGGACATCATGGAGCCCAAGGTGCCTGATGACA
TCTAC
AAAACCCACCTAGAGAACAACAGGTTTGGGGGCAGTGGCTCTCAGGTGGACTCT
GCCCCG
ATGAACCTGGCCTCCTCTTTTGTGAATGGCTTTGTGAATGCAGCTTTTGGCCAAGA
CAAG
CTGCTAACAGATGATGGCAACAAATGGCTTTACAAGAACAAGGACCACGGAATG
TTGAGT
GCAGCTGCATCTCTTGGGATGATTCTGCTGTGGGATGTGGATGGTGGCCTCACCC
AGATT
GACAAGTACCTGTACTCCTCTGAGGACTACATTAAGTCAGGAGCTCTTCTTGCCT
GTGGC

ATAGTGA ACTCTGGGGTCCGGAATGAGTGTGACCCTGCTCTGGCACTGCTCTCAG
ACTAT
GTTCTCCACAACAGCAACACCATGAGACTTGGTTCCATCTTTGGGCTAGGCTTGG
CTTAT
GCTGGCTCAAATCGTGAAGATGTCCTAACACTGCTGCTGCCTGTGATGGGAGATT
CAAAG
TCCAGCATGGAGGTGGCAGGTGTCACAGCTTTAGCCTGTGGAATGATAGCAGTAG
GGTCC
TGCAATGGAGATGTA ACTTCCACTATCCTTCAGACCATCATGGAGAAGTCAGAGA
CTGAG
CTCAAGGATACTTATGCTCGTTGGCTTCCTCTTGGACTGGGTCTCAACCACCTGGG
GAAG
GGTGAGGCCATCGAGGCAATCCTGGCTGCACTGGAGGTTGTGTCAGAGCCATTCC
GCAGT
TTTGCCAACACACTGGTGGATGTGTGTGCATATGCAGGCTCTGGGAATGTGCTGA
AGGTG
CAGCAGCTGCTCCACATTTGTAGCGAACACTTTGACTCCAAAGAGAAGGAGGAA
GACAAA
GACAAGAAGGAAAAGAAAGACAAGGACAAGAAGGAAGCCCCTGCTGACATGGG
AGCACAT
CAGGGAGTGGCTGTTCTGGGGATTGCCCTTATTGCTATGGGGGAGGAGATTGGTG
CAGAG
ATGGCATTACGAACCTTTGGCCACTTGCTGAGATATGGGGAGCCTACACTCCGGA
GGGCT
GTACCTTTAGCACTGGCCCTCATCTCTGTTTCAAATCCACGACTCAACATCCTGGA
TACC
CTAAGCAAATTCTCTCATGATGCTGATCCAGAAGTTTCCTATAACTCCATTTTGC
CATG

GGCATGGTGGGCAGTGGTACCAATAATGCCCGTCTGGCTGCAATGCTGCGCCAGT
TAGCT
CAATATCATGCCAAGGACCCAAACAACCTCTTCATGGTGCCTTGGCACAGGGCC
TGACA
CATTTAGGGAAGGGCACCTTACCCTCTGCCCCTACCACAGCGACCGGCAGCTTA
TGAGC
CAGGTGGCCGTGGCTGGACTGCTCACTGTGCTTGTCTCTTTCCTGGATGTTGAAA
CATT
ATTCTAGGCAAATCACACTATGTATTGTATGGGCTGGTGGCTGCCATGCAGCCCC
GAATG
CTGGTTACGTTTGATGAGGAGCTGCGGCCATTGCCAGTGTCTGTCCGTGTGGGCC
AGGCA
GTGGATGTGGTGGGCCAGGCTGGCAAGCCGAAGACTATCACAGGGTTCAGACG
CATACA
ACCCAGTGTTGTTGGCCACGGGGAACGGGCAGAATTGGCCACTGAGGAGTTTC
TTCCT
GTTACCCCATTTCTGGAAGGTTTTGTTATCCTTCGGAAGAACCCCAATTATGATCT
CTAA
GTGACCACCAGGGGCTCTGAACTGCAGCTGATGTTATCAGCAGGCCATGCATCCT
GCTGC
CAAGGGTGGACACGGCTGCAGACTTCTGGGGGAATTGTCGCCTCCTGCTCTTTTG
TACT
GAGTGAGATAAGGTTGTTCAATAAAGACTTTTATCCCAAGGAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA
AA

SEC ID N°: 18, proteína PSDM2

MEEGGRDKAPVQPQQSPAAAPGGTDEKPSGKERRDAGDKDKEQELSEEDK
QLQDELEMLVERLGEKDTSLYRPALEELRRQIRSSSTTSMTSVPKPLKFLR

5

PHYGKLKEIYENMAPGENKRFAADIISVLAMTMSGERECLKYRLVGSQEE
LASWGHEYVRHLAGEVAKEWQELDDAEKVQREPLTLVKEIVPYNMAHNA
EHEACDLLMEIEQVDMLEKIDENAYAKVCLYLTSCVNYVPEPENSALLR
CALGVFRKFSRFPEALRLALMLNDMELVEDIFTCKDVVVQKQMAFMLGR
HGVFLELSEDEVVEYEDLTEIMSNVQLNSNFLALARELDIMEPKVPDDIYK
THLENNRFGGSGSQVDSARMNLASSFVNGFVNAAFGQDKLLTDDGNKWLY
KNKDHGMLSAAASLGMILLWDVDGGLTQIDKYLYSSEDIKSGALLACGI
VNSGVRNECDPALALLSDYVLHNSNTMRLGSIFGLGLAYAGSNREDVLT
LLPVMGDSKSSMEVAGVTALACGMIAVGSNGDVTSTILQTIMEKSETEL
KDTYARWLPLGLGLNHLGKGEAIEAILAALEVSEPFERSFANTLVDVCAY
AGSGNVLKVQQLLHICSEHFDSKEKEEDKDKKEKKDKDKKEAPADMGAHQ
GVAVLGIAMGEEIGAEMALRTFGHLLRYGEPTLRRVPLALALISVS
NPRLNILDTLKFSHDADPEVSYNSIFAMGMVSGTNNARLAAMLRQLAQ
YHAKDPNNLFMVRLAQGLTHLGKGTLTLCOPYHSDRQLMSQVAVAGLLTVL
VSFLDVRNIIKGKSHYVLYGLVAAMQPRMLVTFDEELRPLPVSVRVGQAV
DVVGQAGKPKTITGFQTHHTPVLLAHGERAELATEEFLPVTPILEGFVIL
RKNPNYDL

SEC ID N°: 3, flanqueo de NMT1

GTCTCCAGTTTAGGGAACCATGGGGGAAGGAAGAAAAGTCGCGCANTATCATGC
CATCCT
GCGTTTGCGCNAATGGATGGGTGGGAATCCCATGCTGCCACNNANGNCCGGGGG
AAAAGA
GGTGTCTTCTTAAAATTTTNTANCCGGTCNAGCCNCTGGGGAAAATGTAAGGG
GAGGC
NAAGCCTTCTGAAAAGTGGAGATGATNACTCAGCGAAACAAAAGTACNCATTNA
ANCACT
TTTAATCACTCTATGANATAGGTACCATTCCCGNTTCCAGATGAGCAAAGTGA
GAGTC

5

AGAAAGGTACGCAAGTTGACNGAAATGGAAAGGNCNNATGTTAGATNCAAAAAT
AAANGA
GATCTGGGCAGCGGTGGNTCAGCGNCTTANCGCCGCCTTNAGCCCAGGGCATGAT
CCTGG
GGTCCCGGGATCGAGTCCCACGTCGGGCTCCCTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTCT
GCCT
GTGTCTCTCTGNGNCTATCANGAAATAAATAAGNTNNTAANATATCANATNTT
AAAAA
AATNNTCTCCCTCAGNATCTGCCCCCNAGTTTCTTGAGTCCTAGNGGNCTTTTG
GNAC
TGGAACCTGCCTGTATCTTCAACCCACCTTTCTCAAATCNNNAGNTGNAAANNAG
GNAAN
GGAACNCCTNCCTNAACCGGGTGCCNTTNAGGGCTGATGACCCACNGTATTCCAG
GCNNT
TTTACCCANGGGNTTGNNTCCAAANATCCNTGCTCCAACAATTNNANTNAAAGGN
TTGAA

SEC ID N°: 11. (NMT1) ADNc

CTGCTCTCGCAACTCAAGATGGCGGACGAGAGTGAGACAGCAGTGAAGCCGCCG
GCACCT
CCGCTGCCGCAGATGATGGAAGGGAACGGGAACGGCCATGAGCACTGCAGCGAT
TGCGAG
AATGAGGAGGACAACAGCTACAACCGGGTGGTTTGAGTCCAGCCAATGACACT
GGAGCC
AAAAAGAAGAAAAAGAAACAAAAAAGAAGAAAGAAAAAGGCAGTGAGACAG
ATTCAGCC
CAGGATCAGCCTGTGAAGATGAACTCTTTGCCAGCAGAGAGGATCCAGGAAATA
CAGAAG

GCCATTGAGCTGTTCTCAGTGGGTCAGGGACCTGCCAAAACCATGGAGGAGGCTA
GCAAG
CGAAGCTACCAGTTCTGGGATACGCAGCCCGTCCCCAAGCTGGGCGAAGTGGTG
AACACC
CATGGCCCCGTGGAGCCTGACAAGGACAATATCCGCCAGGAGCCCTACACCCTGC
CCCAG
GGCTTACCTGGGATGCTTTGGACTTGGGCGATCGTGGTGTGCTAAAAGAACTGT
ACACC
CTCCTGAATGAGAACTATGTGGAAGATGATGACAACATGTTCCGATTTGATTATT
CCCCG
GAGTTTCTTTTGTGGGCTCTCCGGCCACCCGGCTGGCTCCCCCAGTGGCACTGTGG
GGTT
CGAGTGGTCTCAAGTCGGAAATTGGTTGGGTTTCATTAGCGCCATCCCAGCAAACA
TCCAT
ATCTATGACACAGAGAAGAAGATGGTAGAGATCAACTTCCTGTGTGTCCACAAG
AAGCTG
CGTTCCAAGAGGGTTGCTCCAGTTCTGATCCGAGAGATCACCAGGCGGGTTCACC
TGGAG
GGCATCTTCCAAGCAGTTTACACTGCCGGGGTGGTACTACCAAAGCCCGTTGGCA
CCTGC
AGGTATTGGCATCGGTCCCTAAACCCACGGAAGCTGATTGAAGTGAAGTTCTCCC
ACCTG
AGCAGAAATATGACCATGCAGCGCACCATGAAGCTCTACCGACTGCCAGAGACT
CCCAAG
ACAGCTGGGCTGCGACCAATGGAAACAAAGGACATTCCAGTAGTGCACCAGCTC
CTCACC
AGGTACTTGAAGCAATTTACCTTACGCCCGTCATGAGCCAGGAGGAGGTGGAGC
ACTGG

TTCTACCCCCAGGAGAATATCATCGACACTTTCGTGGTGGAGAACGCAAACGGAG
AGGTG
ACAGATTTCTGAGCTTTTATACGCTGCCCTCCACCATCATGAACCATCCAACCCA
CAAG
AGTCTCAAAGCTGCTTATTCTTTCTACAACGTTACACCCAGACCCCTCTTCTAGA
CCTC
ATGAGCGACGCCCTTGTCCTCGCCAAAATGAAAGGGTTTGATGTGTTCAATGCAC
TGGAT
CTCATGGAGAACAAAACCTTCCTGGAGAAGCTCAAGTTTGGCATAGGGGACGGC
AACCTG
CAGTATTACCTTTACAATTGGAAATGCCCCAGCATGGGGGCAGAGAAGGTTGGAC
TGGTG
CTACAATAACCAGTCACCAGTGCGATTCTGGATAAAGCCACTGAAAATTCGAACC
AGGAA
ATGGAACCCCACTGTTGGTCCAATTTTCACACACGTGAGAATCCCTGGCAA
GGGAG
CAGAACTGAACCGGCTTTACCAAACCGCCAGCGAACTTGACAATTGTATTGCGAT
GGCGT
GGGCTGCGTGACGTCACCTCCGGTCGTGTCTCTGGTCTCCGTGTTTTCCAGTTAAT
TACA
TCCTCATGCAGCCGTGATCAAGGGAATGTAAGTCTGAAAAGTCTAGCTCGTGATTG
GCATA
TAATGGAGTTAACGGGTGAATAATAAAAGTATATATATATATTATATATATATAA
ATATT
TTAAATATCTTTCATGTTCCAAATGTACAAGGATGTTTGGTCTTTAATGAAAAGCT
GAAT
CTAGATCATTCCCTCAGAATGAGGACCCGAGGACAGTGGCAGACAGACGCGTTGG
CACAGT

TCATGGTTTCCTCCAGAGGAGACATTGGCTTATCATGGGGAAAAAGAGGATCTGG
AGAAC
CTCATCCAGCTCCCCTTCTGAATCAGCTGGGATGACTGGCTTTGAGAAGGAAGGG
AAGAT
GGAACAGGCTCAGATCTCATGGGATAGCACGTGGAGCTCTTGGCTGGGGCTGACC
CTGGG
CAGGGACTTTCCTGCAGGGCCAGACCTGCCTGCATTCTGAGACAAAGCAATGGAC
GGTCC
GCAGAAGCAGACCTCATTGATTGAGTCCTTTCTTCCATCCCCTTGGCCTGCTCCCT
GTAG
GAAGTCATCCTGCCAACTGATTTAAAAGGGCTCTTTAGCCAGTTGTTGCCAACCTT
ATAG
GGATGAGTCCCCTGTGAGATTTTGCTTTTCCACTGCCTGGGATGATGCAGTTTGAA
GAGG
CCCTTGGACCTCCTTGTAACATCAGGGACCTTTGGAGACCATTATCAGTGTAAGC
CCTGC
TTAGCTCATCTTAGAGCAAAGAGCCAGCACCCCTGATGTCCCTGGGGTGGCTAGGC
AGGAG
TGGCGTGGGGCCAATACCCAGACCCCTTCAGCCACCAGCCCCTGGCCTGTGCCTT
CCAAC
CCATTAGCCATTTCTTGTTGTGCCCTTTCCAAGATACAGCCTGCAAGTGGTAGCA
AGAA
GTGATTAGAGGCAGATCTGGACTTGGCAACAGAAGTGGTTTCCCATCTCCATTGT
CTGAG
TCTGATTTTCGCTGATGCTGTTTTGTGGATTTTTGTGGTAGTGATGGTTGTCAGTG
CTGC
CAGTTTCCCAAACGTAATCAAGCCTCTGGTCACATGGCTGTCGATGTAGGCATT
CTGGA

GTGGTGTT CAGCCAAGTGACCGGGCAA AATTGGGCTGTGAAATTG TACTTCCAGG
CTTGG
ATGTAATTTT TGGCTCTAGAGAGAAGCAAGTGGTGGGAAGGAGGTAGCATGACGT
GTGGTG
TGCGGGTTTCCTTGCTGCCGTCACCTCTCCGCTCATA CAGGAATGAAGCCTTAGCC
AGGA
GGCCAGGCTCAGCCCTGTGCCACTCACCGAAGCCACTTTCTACAGGCCAGCAGGG
GCTTG
TTGCAGGCTGTGGGTTTTGGTGTGGTTTGT CAGAGGCTAATTCTGCAGAGTTTCCA
AAAC
CAGAAGACATCGTATGCTTGGGATGGGGGCCGTGCCACCCGTGGGAATGCTGCC
GCTCT
GCAGACTGCTGCTAGAGCCAGCAACTCCACTAAGGTGGATTTTCATCAGGGGCCT
GCAGG
GCCCTCCCTTTTCCCATTTGTTCTGCGCTGCAAATTGCAGGCCCCAGCAATCGTGA
CTGA
CGTTTGCTCCTTGACTCCAAGAACTGAGACCAAAGAAGCTGCTGTTCTTAGCAA
GATGC
GCACTGCATTCCACAGGTGGGAGGAGTCGGAGAGGCAGGGGCTTGCTTTGCAGC
CCCACA
GACAACAGTTGCACAGTGCCTCAAGCCCCAGAGTGGCTCACCTGTCCAGACCTT
TGAGG
ATATCAAAGGACAAAGTGCCCAAGTCTTTCTACCTTGGGGGAACCTGGAACCTG
GAAAG
GCTCCCTGTCCTAGTCTTGATCTGTTCTGGGCCAGGTCCCAGCTTGAGCTGCCTCT
GAGA
TTTGGGCTGTGCGGATCTCTGGAGTGAGCTCTGTTTCGGTTGACCCAGGTCATGG
AATGG

AAACGGTGAGGCCCCAGTGGCTGTTCTGGAAGAAACAGATCTCCTGGCAAAGGC
CCCAGC
ATCTCCCTCACTGAAACCAGGTGGCCGGCTCCTCGGACTCTGCTTTATGTTGCGGT
GAGA
ACTCTGCCCAGGTGTGCAGGGTTTGGCTTGTGGGCTGCTTGCTGCTCATCTGATTT
TTGT
CCCAGTAGTCCCTGCGTTCCTTCAATCAACCCCTTCTGGGACTTCAGCTCAGAGAGC
ACCA
TCCCGGGGGTCAGGGCCTCCCCACAGGAGCCCTGCAGTGTGGTAGCGCCATGGCT
GTCTC
AAACCAAGCAAAGGAAGGACCCTGAGGCCTTACGCTAACCATCCTCGAGCAAC
TGCTGT
TGGAAGGCCTCCCTGGGCCTGGCCCCACCCTCTGCCACCCAGTCCTCCCAGCTG
CCATG
TTTCAAAGACGACCTTTACCTCCTGCCTTTGGATTGACTCTGCATTTGACCACGGA
CTCC
AGTCTGTGTGTAGGGAGAGAGCTGAGTAGGAGGCCTCCACTCCGGATCGAGGCC
TGTATA
GGGCTCGTTTCCCCACACATGCCTATTTCTGAAGAGGCTTCTGTCTTATTTGAAGG
CCAG
CCCACACCCAGCTACTTTAACACCAGGTTTATGGAAAATGTCAGGCCTTCCCCAC
AACTC
CTGTCTAACTGCTGTCGCCCCCTACTTGCTGGCTCTCAGAAGCCTAGGGGAGTCC
CTGT
GGTCCTGAATTCTTTCCCAAAGACGACCAGCATTTAACCAACCTAAGGGCCCAA
AGGCC
TTGGACAACTGCATGGAGCTGCACTCTAGGAGAAGGAGGGGAACCAGATGTTAG
ATCAGG

GGAGGGAGCAGGAGTGTCCCTCCCGTCAGTGCCTACCCACCTGTGAGGCAGCCTT
CTGAT
GGCCTGGCCCACCTTCCCCAGAACCAGGGGAGGCCTGAGGCTTCAGTTTTACTCT
GCTGC
AAAATGAAGGCGGGCCTGCAAGCCGACTACACCTACGGAGGCTGTTGAGGACAA
TTTCAT
TCCATTAAATTAATAAATACTGACTGGCTGGCAGGCAGGTGCCATGTCTGGGAAC
AGGGA
CGGGGGAGCTTCACCTTTTTGTCTTGGCTTTTCTTTGGGCTGTGGGGGGGCATCCA
TTTC
CAGGGTCGGGGAGGAAATACCAAATGCATTGTTGTTCTGCTCAATACATCTCACT
TGTTT
CTAATAAAGAAAGCAGCTGAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Nº: 19 proteína (NMT1)

MADESETAVKPPAPPLPQMMEGNGNGHEHCSDCENEEDNSYNRGGGLSPAN
DTGAKKKKKKQKKKKEKGETDSAQDQPVKMNSLPAERIQEIQKAIELFS
VGQGPAKTMEEASKRSYQFWDTPVPKLGEEVNTHGPEPKDNIRQEPY
TLPQGFTWDALDLGDRGVLKELYLLNENYVEDDDNMFRFDYSPEFLWA
LRPPGWLPQWHCGVRVSSRKLVGFIAPANIHIYDTEKKMVEINFLCV
HKKLRSKRVAPVLIREITRRVHLEGIFQAVYTAGVVLKPKVGTCRYWHRS
LNPRKLIEVKFSLSRNMTMQRTMKLYRLPETPKTAGLRPMETKDIPVVH
QLLTRYLKQFHLTPVMSQEEVEHWFYPQENIIDTFVVENANGEVTDFLSF
YTLPSTIMNHPTHKSLKAAYSFYNVHTQTPLLDLMSDALVLAKMKGFDVF
NALDLMENKTFLEKLFKFGIGDGNLQYYLYNWKCPMGAEKVGLVLQ

5

Nº: 4, flaqueo de Macro

CTGGTGCTGCCCTCTCTCCACCCACTCACTCACCTTTCTCTGGTCATCTTGAATTC
CTA

10

CAGTTTATCAATGCTGTTCCCTTCAATTGAACGACTTCTCTCACTCCCAAATCCCTT
CTGG
TGAATGACTATCACTCATCCTAAGGGCACCTTTTCAATGAATCCTACTGCCAAGT
AGAAC
TGACCCCTCACACTCCCAATCCATCTTTTCAATGTATATTCTGCACAGAGATTCTT
CAAT
AGCACAAATAACTCTACAAGTTGGTTGTTTTTCTTTCTTTTTTTAGAGATTTTATT
TAA
GAAAGAGAGAGAGAGAACAAGAGGGAGGGAGAGGCAACAAGAGAGGAAAA
AACAGATT
CCCTGCTGAACAGGGAGCTCAAAGCGGGGCTCAGTCTTAGTACCCTGAGACCATG
ACCTG
AACAGAAGGCAGATGGTTAACTGAATGAGCCACCGAGGTGCCCCAGTGGTTGCT
TTTATT
GGTCTCTCCCGACTGTGAGTTCCCAAGAGCAGGAACCACACATTACATTGCTT
AAACC
TCAGTTCAAGCAGGAATAAAGAAGNGAAAGGATGATGGNAATTATCCAAACNCT
GAGGAG
CAAACCCACGCANCATGCC

Nº: 12 ADNc de MACRO

GGGGGCCAAAGGGAAGTGCTGCGAGGTTTACAACCAGCTGCAGTGGTTCGATGG
GAAGGA
TCTTTCTCCAAGTGGTTCCTCTTGAGGGGAGCATTCTGCTGGCTCCAGGACTTTG
GCCA
TCTATAAAGCTTGGCAATGAGAAATAAGAAAATTCTCAAGGAGGACGAGCTCTT
GAGTGA
GACCCAACAAGCTGCTTTTCACCAAATTGCAATGGAGCCTTTCGAAATCAATGTT
CCAAA

GCCCAAGAGGAGAAATGGGGTGAACCTCTCCCTAGCTGTGGTGGTCATCTACCTG
ATCCT
GCTCACCGCTGGCGCTGGGCTGCTGGTGGTCCAAGTTCTGAATCTGCAGGCGCGG
CTCCG
GGTCCTGGAGATGTATTTCTCAATGACACTCTGGCGGCTGAGGACAGCCCGTCC
TTCTC
CTTGCTGCAGTCAGCACACCCTGGAGAACACCTGGCTCAGGGTGCATCGAGGCTG
CAAGT
CCTGCAGGCCCAACTCACCTGGGTCCGCGTCAGCCATGAGCACTTGCTGCAGCGG
GTAGA
CAACTTCACTCAGAACCCAGGGATGTTTCAAGATCAAAGGTGAACAAGGCGCCCC
AGGTCT
TCAAGGCCACAAGGGGGCCATGGGCATGCCTGGTGCCCTGGCCCCGCGGGACC
ACCTGC
TGAGAAGGGAGCCAAGGGGGCTATGGGACGAGATGGAGCAACAGGCCCCCTCGG
GACCCCA
AGGCCACCGGGAGTCAAGGGAGAGGCGGGCCTCCAAGGACCCAGGGTGCTCC
AGGGAA
GCAAGGAGCCACTGGCACCCAGGACCCCAAGGAGAGAAGGGCAGCAAAGGCG
ATGGGGG
TCTCATTGGCCAAAAGGGGAAACTGGAACCTAAGGGAGAGAAAGGAGACCTGGG
TCTCCC
AGGAAGCAAAGGGGACAGGGGCATGAAAGGAGATGCAGGGGTCATGGGGCCTC
CTGGAGC
CCAGGGGAGTAAAGGTGACTTCGGGAGGCCAGGCCACCAGGTTTGGCTGGTTTT
CCTGG
AGCTAAAGGAGATCAAGGACAACCTGGACTGCAGGGTGTTCGGGGCCCTCCTGG
TGCAGT

GGGACACCCAGGTGCCAAGGGTGAGCCTGGCAGTGCTGGCTCCCCTGGGCGAGC
AGGACT
TCCAGGGAGCCCCGGGAGTCCAGGAGCCACAGGCCTGAAAGGAAGCAAAGGGG
ACACAGG
ACTTCAAGGACAGCAAGGAAGAAAAGGAGAATCAGGAGTTCAGGCCCTGCAGG
TGTGAA
GGGAGAACAGGGGAGCCCAGGGCTGGCAGGTCCCAAGGGAGCCCCTGGACAAG
CTGGCCA
GAAGGGAGACCAGGGAGTGAAAGGATCTTCTGGGGAGCAAGGAGTAAAGGGAG
AAAAAGG
TGAAAGAGGTGAAAACCTCAGTGTCCGTCAGGATTGTCGGCAGTAGTAACCGAGG
CCGGGC
TGAAGTTTACTACAGTGGTACCTGGGGGACAATTTGCGATGACGAGTGGCAAAT
TCTGA
TGCCATTGTCTTCTGCCGCATGCTGGGTTACTCCAAAGGAAGGGCCCTGTACAAA
GTGGG
AGCTGGCACTGGGCAGATCTGGCTGGATAATGTTTCAGTGTCTGGGGCACGGAGAG
TACCCT
GTGGAGCTGCACCAAGAATAGCTGGGGCCATCATGACTGCAGCCACGAGGAGGA
CGCAGG
CGTGGAGTGCAGCGTCTGACCCGGAAACCCTTTCACTTCTCTGCTCCCGAGGTGT
CCTCG
GGCTCATATGTGGGAAGGCAGAGGATCTCTGAGGAGTTCCTGGGGACAACCTGA
GCAGCC
TCTGGAGAGGGGCCATTAATAAAGCTCAACATCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAA
AAAAAA
AAA

Nº: 20, proteína de MACRO

MRNKKILKEDELLSETQQAAFHQIAMEPFEINVPKPKRRNGVNFSLAVVV
IYLILLTAGAGLLVVQVLNLQARLRVLEMYFLNDTLAAEDSPSFSLLQSA
HPGEHLAQGASRLQVLQAQLTWVRVSHEHLLQRVDNFTQNPGMFRIKGEQ
GAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQGPV
KGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKG
DLGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPLAGFPGAKGDQ
GQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGS
KGDGTGLQGGQGRKGESGVPGPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQG
VKGSSGEQGVKGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDE
WQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESTLWSCTK
NSWGHHDCSHEEDAGVECSV

SEC ID N°: 5, flanqueo de CDK6

CCTCTGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGACTATCATAAA
TAA
ATAAAAATTAAAAAAGATATTCAGTTCTGATCTGTGTCAGATTCACCGT
GAAGT
GTTCTCTTTTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAAGTAAGTAAGTAAATA
AAGCG
CTAAACATAACAGGAAAGATTGGCCATACAGACTTCTTACAATTTAAAACGTCTT
TTCAT
GGGACACCTGAATGGCTCAATGTTGGACATCCGACCCTCAATTTTGGCTCAGGTT
ATGAT
CTCGGGGTCATGGGATCAAGTCCCACTAGACACAGTCTGCTTGTCTTCTCCCTCT
GCTC
CTCCTCAATTCTCTCTCTTTCTCAAATGAATAAATAAAATCTTTAAAAAATAA
AACC
TCTATTCATCAAAATATAACATTAAGAGAATGAAAAGACNAGAAGTAATGTGGA
ATAAGA

5

CATTTTACATGGATAAATCATNCNAAGGACTATTTCTAGACCATATAAATATCTCT
TANA
AATTAATAAGNNNAAATTGTCTGACTCAATTATTTTTAAGAGNAGGATAAAAGAN
TTGAA
TAGATTTTTTNCAAATGAAAATATCCCAATGGNCCAATGNCCATGAAAATATNNT
CCNNC
CNCNAAAGNTATCCGGAAAATGCNAGNNGGAAATTAAACN

SEC ID N°: 13, ADNc de CDK6

GGCTTCAGCCCTGCAGGGAAAGAAAAGTGCAATGATTCTGGACTGAGACGCGCT
TGGGCA
GAGGCTATGTAATCGTGTCTGTGTTGAGGACTTCGCTTCGAGGAGGGAAGAGGAG
GGATC
GGCTCGCTCCTCCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGACTCTGCAGGCGGAGTTTCGCGG
CGGCG
GCACCAGGGTTACGCCAGCCCCGCGGGGAGGTCTCTCCATCCAGCTTCTGCAGCG
GCGAA
AGCCCCAGCGCCCGAGCGCCTGAGCCGGCGGGGAGCAAGTAAAGCTAGACCGAT
CTCCGG
GGAGCCCCGGAGTAGGCGAGCGGCGGCCAGCTAGTTGAGCGCACCCCCCGC
CCGCC
CAGCGGCGCCGCGGCGGGCGGCGTCCAGGCGGCATGGAGAAGGACGGCCTGTGC
CGCGCT
GACCAGCAGTACGAATGCGTGCGGAGATCGGGGAGGGCGCCTATGGGAAGGTG
TTCAAG
GCCCCGCGACTTGAAGAACGGAGGCCGTTTCGTGGCGTTGAAGCGCGTGCGGGTG
CAGACC
GGCGAGGAGGGCATGCCGCTCTCCACCATCCGCGAGGTGGCGGTGCTGAGGCAC
CTGGAG

ACCTTCGAGCACCCCAACGTGGTCAGGTTGTTTGATGTGTGCACAGTGTACGAA
 CAGAC
 AGAGAAACCAAACCTAAGTTAGTGTGTTGAACATGTCGATCAAGACTTGACCACTT
 ACTTG
 GATAAAGTTCCAGAGCCTGGAGTGCCCACTGAAACCATAAAGGATATGATGTTTC
 AGCTT
 CTCCGAGGTCTGGACTTTCTTCATTCACACCGAGTAGTGCATCGCGATCTAAAAC
 CACAG
 AACATTCTGGTGACCAGCAGCGGACAAATAAAACTCGCTGACTTCGGCCTTGCCC
 GCATC
 TATAGTTTCCAGATGGCTCTAACCTCAGTGGTCGTCACGCTGTGGTACAGAGCAC
 CCGAA
 GTCTTGCTCCAGTCCAGCTACGCCACCCCGTGGATCTCTGGAGTGTTGGCTGCAT
 ATTT
 GCAGAAATGTTTCGTAGAAAGCCTCTTTTTTCGTGGAAGTTCAGATGTTGATCAAC
 TAGGA
 AAAATCTTGGACGTGATTGGACTCCAGGAGAAGAAGACTGGCCTAGAGATGTT
 GCCCTT
 CCCAGGCAGGCTTTTCATTCAAATCTGCCCAACCAATTGAGAAGTTTGTAACAG
 ATATC
 GATGAACTAGGCAAAGACCTACTTCTGAAGTGTTTGACATTTAACCCAGCCAAAA
 GAATA
 TCTGCCTACAGTGCCCTGTCTCACCCATACTTCCAGGACCTGGAAAGGTGCAAAG
 AAAAC
 CTGGATTCCCACCTGCCGCCAGCCAGAACACCTCGGAGCTGAATACAGCCTGAI
 372GGCCTC
 AGCAGCCGCCTTAAGCTGATCCTGCGGAGAACACCCTTGGTGGCTTATGGGTCCC
 CCTCA

GCAAGCCCTACAGAGCTGTGGAGGATTGCTATCTGGAGGCCTTCCAGCTGCTGTC
 TTCTG
 GACAGGCTCTGCTTCTCCAAGGAAACCGCCTAGTTTACTGTTTTGAAATCAATGC
 AAGAG
 TGATTGCAGCTTTATGTTCAATTTGTTTGTGGTTTGTCTGTTTGTTC AAGAACCTG
 GAA
 AAATTCAGAAGAAGAGAAGCTGCTGACCAATTGTGCTGCCATTTGATTTTTCTA
 ACCTT
 GAATGCTGCCAGTGTGGAGTGGGTAATCCAGGCACAGCTGAGTTATGATGTAATC
 TCTCT
 GCAGCTGCCGGGCCTGATTTGGTACTTTTGAGTGTGTGTGTGCATGTGTGTGTGTG
 TGTG
 TGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGAGAGATTCTGTGATCTTTTAAAGTGTTACTTTTT
 GTAA
 ACGACAAGAATAATTCAATTTTAAAGACTCAAGGTGGTCAGTAAATAACAGGCA
 TTTGTT
 CACTGAAGGTGATTCACCAAATAGTCTTCTCAAATTAGAAAGTTAACCCCATGT
 CCTCA
 GCATTTCTTTTCTGGCCAAAAGCAGTAAATTTGCTAGCAGTAAAAGATGAAGTTT
 TATAC
 ACACAGCAAAAAGGAGAAAAAATTCTAG
 TATATTTTAAAGAGATGTGCATGCATTCTATTT
 AGTCTTCAGAATGCTGAATTTACTTGTTGTAAGTCTATTTTAACTTCTGTATGAC
 ATCA
 TGCTTTATCATTCTTTTGGAAAATAGCCTGTAAGCTTTTTTATTACTTGCTATAGGT
 TTAGGGAGTGTACCTCAGATAGATTTTAAAAAAAAGAATAGAAAGCCTTTATTTT
 CTGGTTTG

AAATTCCTTTCTTCCCTTTTTTTGTTGTTGTTATTGTTGTTTGTGTTGTTGTTATTTTGT
TT
TTGTTTTTAGGAATTTGTCAGAACTCTTTCCTGTTTTGGTTTTGGAGAGTAGTTCTC
TCT
AACTAGAGACAGGAGTGGCCTTGAAATTTTCCTCATCTATTACACTGTACTTTCTG
CCAC

ACACTGCCTTGTGGCAAAGTATCCATCTTGTCTATCTCCCGGCACTTCTGAAATA
TATT
GCTACCATTGTATAACTAATAACAGATTGCTTAAGCTGTTCCCATGCACCACCTGT
TTGC
TTGCTTCAATGAACCTTTCATAAATTCGCAGTCTCAGCTTATGGTTTATGGCCTC
GATT
CTGCAAACCTAACAGGGTCACATATGTTCTCTAATGCAGTCCTTCTACCTGGTGTT
TACT
TTTGCTACCCAAATAATGAGTAGGATCTTGTTTTTCGTATACCCCCACCACTCCCAT
TGCT
ACCAACTGTCACCTTGTGCACTCCTTTTTTATAGAAGATATTTTCAGTGTCTTTAC
CTGA
GGGTATGTCTTTAGCTATGTTTTAGGGCCATACATTTACTCTATCAAATGATCTTT
TCTC
CATCCCCCAGGCTGTGCTTATTTCTAGTGCCTTGTGCTCACTCCTGCTCTCTACAG
AGCC
AGCCTGGCCTGGGCATTGTAAACAGCTTTTCCTTTTTCTCTTACTGTTTTCTCTACA
GTC
CTTTATATTTCATACCATCTCTGCCTTATAAGTGGTTTAGTGCTCAGTTGGCTCTA
GTAA

CCAGAGGACACAGAAAGTATCTTTTGGAAAGTTTAGCCACCTGTGCTTTCTGACT
CAGAG
TGCATGCAACAGTTAGATCATGCAACAGTTAGATTATGTTTAGGGTTAGGATTTT
CAAAG
AATGGAGGTTGCTGCACTCAGAAAATAATTCAGATCATGTTTATGCATTATTAAG
TTGTA
CTGAATTCTTTGCAGCTTAATGTGATATATGACTATCTTGAACAAGAGAAAAAAC
TAGGA
GATGTTTCTCCTGAAGAGCTTTTGGGGTTGGGAAC TATTCTTTTTTAATTGCTGTA
CTAC
TTAACATTGTTCTAATTCAGTAGCTTGAGGAACAGGAACATTGTTTTCTAGAGCA
AGATA
ATAAAGGAGATGGGCCATACAAATGTTTTCTACTTTCGTTGTGACAACATTGATT
AGGTG
TTGTCAGTACTATAAATGCTTGAGATATAATGAATCCACAGCATTCAAGGTCAGG
TCTAC
TCAAAGTCTCACATGGAAAAGTGAGTTCTGCCTTTCCTTTGATCGAGGGTCAAAA
TACAA
AGACATTTTTGCTAGGGCCTACAAATTGAATTTAAAAACTCACTGCACTGATTCA
TCTGA
GCTTTTTGGTTAGTATTCATGGCTAGAGTGAACATAGCTTTAGTTTTTGCTGTTGT
AAAA
GTGTTTTCATAAGTTCACTCAAGAAAAATGCAGCTGTTCTGAACTGGAATTTTTCA
GCAT
TCTTTAGAATTTTAAATGAGTAGAGAGCTCAACTTTTATTCTAGCATCTGCTTTT
GACT
CATTTCTAGGCAGTGCTTATGAAGAAAAATTAAAGCACAAACATTCTGGCATTCA
ATCGT

TGGCAGATTATCTTCTGATGACACAGAATGAAAGGGCATCTCAGCCTCTCTGAAC
 TTTGT
 AAAAATCTGTCCCCAGTTCTTCCATCGGTGTAGTTGTTGCATTTGAGTGAATACTC
 TCTT
 GATTTATGTATTTTATGTCCAGATTTCGCCATTTCTGAAATCCAGATCCAACACAAG
 CAGT
 CTTGCCGTTAGGGCATTTTGAAGCAGATAGTAGAGTAAGAACTTAGTGACTACAG
 CTTAT
 TCTTCTGTAACATATGGTTTCAAACATCTTTGCCAAAAGCTAAGCAGTGGTGAAC
 TGAAA
 AGGGCATATTGCCCAAGGTTACACTGAAGCAGCTCATAGCAAGTTAAAATATTG
 TGACA
 GATTTGAAATCATGTTTGAATTCATAGTAGGACCAGTACAAGAATGTCCCTGCT
 AGTTT
 CTGTTTGATGTTTGGTTCTGGCGGCTCAGGCATTTTGGGAACTGTTGCACAGGGTG
 CAGT
 CAAAACAACCTACATATAAAAATTACATAAAAGAACCTTGTCCATTTAGCTTTCA
 TAAGA
 AATCCCATGGCAAAGAGTAATAAAAAGGACCTAATCTTAAAAATACAATTTCTAA
 GCACT
 TGTAAGAACCCAGTGGGTTGGAGCCTCCCACTTTGTCCCTCCTTTGAAGTGGATG
 GGAAC
 TCAAGGTGCAAAGAACCTGTTTTGGAAGAAAGCTTGGGGCCATTTAGCCCCCTG
 TATTC
 TCATGATTTTCTCTCAGGAAGCACACACTGTGAATGGCAGACTTTTCATTTAGCCC
 CAGG
 TGACTTACTAAAATAGTTGAAAATTATTCACCTAAGAATAGAATCTCAGCATTG
 TGTTA

AATAAAAATGAAAGCTTTAGAAAGGCATGAGATGTTCCCTATCTTAAATAAAGCATG
TTTCT
TTTCTATAGAGAAATGTATAGTTTGACTCTCCAGAATGTACTATCCATCTTGATGA
GAAA
ACTCTTAAATAGTACCAAACATTTTGAACCTTAAATTATGTATTTAAAGTGAGTGT
TTAA
GAAACTGTAGCTGCTTCTTTTACAAGTGGTGCCTATTAAAGTCAGTAATGGCCATT
ATTG
TTCCATTGTGGAAATTAATTATGTAAGCTTCCTAATATCATAAACATATTTAAAT
TCTT
CTAAAATATTGCTTTTCTTTTAAGTGACAATTTGACTATTCTTATGATAAGCACAT
GAGA
GTGTCTTACATTTTCCAAAAGCAGGCTTTAATTGCATAGTTGAGTCTAGGAAAAA
ATAAT
GTTAAAAGTGAATATGCCACCATAAATACTTAATTATGTTAGTATAGAACTACA
GAATA
TTTACCCTGGAAAGAAAATATTGGAATGTTATTATAAACTCTTAGATATTTATATA
ATTC
AAAAGAATGCATGTTTCACATTGTGACAGATAAAGATGTATGATTTCTAAGGCTT
TAAAA
ATTATTCATAAAACAGTGGGCAATAGATAAAGGAAATTCTGGAGAAAATGAAGG
TATTTA
AAGGGTAGTTTCAAAGCTATATATATTTTGAAGGATATATTCTTTATGAACAAAT
ATATT
GTAAAAATTTATACTAAGGTCATCTGGTAACTGTGGGATTAATATGGTCGAAAAC
AAATG
TTATGGAGAAGCTGTCCCAAGCAAATAATTACCTGTACTTTTTTCCATTTCAA
GGGA

AGAGGCAACCACATGAAGCAATACTTCTTACACATGCCTAAGAACGTTTCATTGAA
AAAAT
AAATTTTTAAAAGGCATGTGTTTCCTATGCCACCAATACTTTTGAAAAATTGTGAA
CCTT
ACCCAAAACCATTTATCATGTCCATTAAGTATATTTGGGTATATAATTAGGAAGA
TATTT
ACATGTTCCATCTCCACAGTGGAAAACTTATTGAGGCTACCAAAGTGTGCCAAG
AAATG
TAAGTCCTTAGAGTAATTAGAAATGCTGTTTTCTCAAAGCATGAGAACTAGC
ATTTT
CATTTCTTATTTACTCCCTTTCTATATCAATGCAATTCACAACCCAATTTTAATACA
TCC
CTATATCTCAAGCATTCTATCTTGTACTTTTTTCAGAAAATAAACCAAAAATAATC
CTTT
GGTCTCTCTATCTTCTGACCTTTGTAAGCAACAGAAATGTAAAAACAGAAGGGGT
CCAAT
TTTTACACGTTTTTTTTCTCAAGTAGCCTTTCTGGGGATTTTTATTTTCTTAATGAAG
TGC
CAATCAGCTTTTCAAATGTTTTCTATTTCTCAGCATTTCAGGAAGTGATAACGT
TTAG
CTAAATGAGTAGAAGTGGACTTCCTTCAACATATTGTTACCTTGTCTAGCCTTAGG
AAGA
AAACAAGAGCCACCTGAAAATAAATACAGGCTTTTTTCGAGCATCTGCTGAAATA
CTGTT
ACAGCAATTTGAAGTTGATGTGGTAGGAAAGGAAGGTGACTTTTCTTGCAAAGT
CTTTC
TAAACATTCACACTGTCCTAAGAGATGAGCTTTCTTGTTTTATTCCGGTATATTCC
ACAA

GGTGGCACTTTTAGAGAAAAACAAATCTGATGAAGACTAAAGAGGTACTTCTAA
AAGAGA
TTTCATTCTAACTTTATTTTTCTGCGCATATTTAACTCTTTCCTAGCACTTGTTTTT
GG
GATGATTAATAGTCTCTATAATGTTCTGTA ACTTCAATATTTTACTTGTTACCTAG
GTTC
TGAACAATTGTCTGCAAATAAATTGTTCTTAAGGATGGATAATACACCCATTTG
ATCAT
TTAAGTAAAGAAAGCCTAGTCATTCATTCAGTCAAGAAAAAATTTTTGAAGTACC
CAGTT
ACCTTACTTTTCTAGATTA AACAGGCTTAGTTACTAAAAAGGCAGTCCTCATCTG
TGAA
CAGGATAGTTTCGTTAGAAGTATAAACTCCTTTAGTGGCCCCAGTTAA AACACA
CATAC
CCTCTCTGCTGCTTTCAAATTCCCTAGCATGGTGGCCTTTCAACATTGATTA AATT
TTAA
AATCCTAATTTAAAGATCAGGTGAGCAAAATGAGTAGCACATCAGTAATTCAGTA
GACAA
AACTTTTGTCTGAAAAATTGCTGTATTGAAACAGAGCCCTAAAATACCAA AAGAC
CAGGT
AATTTAACATTTGTGGAATCACAAATGTAAATTCATAAGAAGCTCTAATTA AAA
AAAA
AAGTCTGAAGTATATGAGCATAACA ACTTAGGAGTGTGTCTACATACTTAACTTT
TGAAG
TTTTTTGGCAACTTTATATACTTTTTTTAAATTTACAAGTCTACTTAAAGACTTCTT
ATA
CCCCAAATGATTAAGTTAATTTTAGAGGTCACCTTTCTCACAGCAGTGTC ACTTGA
AATT

TAGTAGGGAAGGATATTGCAGTATTTTTAGTTTTCTTAGCACAGCACCACAGAA
AGCAG
CTTATTCCTTTTGAGTGGCAGACACTCGACGGTGCCTGCCAACTTTCCTCCTGAG
TGGC
AAGCAGATGAGTCTCAGTAATTCATACTGAACCAAAATGCCACATACACTAGGG
GCAGTC
AGAACTGGCTGAGAAATCCCCGCCTCATTGCCCCCTCTGCTCCCAGGAACTAG
AGTCC
AGTTAAAGCCCCTATGCGAAAGGCCGAATTCCACCCCAGGGTTTGTTATAACAGT
GGCCA
GTCTGAACCCCATTTGCTCGTGCTCAAACTTGATTCCCCTTGAAAGCCTTCCGG
GCGC
GCTGCCTCGTTGCCCCGCCCTTTGGCAGGAGAGAGGCAGTGGGCGAGGCCGGG
CTGGGG
CCCCGCCTCCCCTCACCTGCCGGTGCCTGAAATTATGTGCGGCCCGCGGGCTG
CTTTC
CGAGGTCAGAGTGCCCTGCTGCTGTCTCAGAGGCATCTGTTCTGCAAATCTTAGG
AAGAA
AAATGTCCCTAGTAGCAAACGGGTGTCTTCTGTGCATAAATAAGTACAACACAAT
TCTCC
GAAAGTTCGGGTAAAAAGAGATGCGGTAGCAGCTGCCCTGTGTGAAGCTGTCTA
CCCCGC
ATCTCTCAGGCGCTAAGCTCAGTTTTTGTTTTTGTTTTTGTTTTTTAAAGAAAAGA
TGT
ATAATTGCAGGAATTTTTTTTTATTTTTTTATTTTCCATCATTCTATATATGTGATG
GTG
AAAGATATGCCTGGAAAAGTTTTGTTTTGAAAAGTTTATTTTCTGCTTCGTCTTCA
GTTG

GCAAAAGCTCTCAATTCTTTAGCTTCCAGTTTCTTTTCTCTCTTTTTCTTTGTTAGG
TAA
TTAAAGGTATGTAAACAAATTATCTCATGTAGCAGGGGATTTTCATGTTGAGAGG
AATCT
TCCGTGTGAGTTGTTTGGTCACACAAATAACCCTTCTCAATTTTAGGAGTTTGG
TTGT
CAAATGTAGGTTTTTCTCAAAGGGGGCATATAACTACATATTGACTGCCAAGAAC
TATGA
CTGTAGCACTAATCAGCACACATAGAGCCACACAATTATTTAATTTCTAACTCTCT
GTGG
TCCCTAGAAAAATTCCGTTGATGTGCTTAGGTTAAAGTTCTGAAGATACCCGTTGT
ACCC
TTACTTGAAAGTTTCTAATCTTAAGTTTTATGAAATGCAATAATATGTATCAGCTA
GCAA
TATTTCTGTGATCACCAACAACCTCTCAGTTTGATCTTAAAGTCTGAATAATAAAAC
AAAT
CCCAGCAGTAATACATTTCTTAAACCTCACAGTGCATGATATATCTTTTCATTCTG
ATCC
TGTGTTTGCAAAAATATACACATGTATATCATAGTTCCTCACTTTTTATTCAATTTGT
TTT
CCTATTACCTGTAGTAAATATATTAGTTAGTACATGGAATTTATAGCATCAGCTAC
CCCC
AGGAACAGCACCTGACAGGCGGGGGATTTTTTTTCAAGTTGTTCTACATTTGCAT
AAATT
ATTTCTATTATTATTCATGTATGTTATTTATTTCTGAATCACACTAGTCCTGTGAAA
GTA
CAACTGAAGGCAGAAAGTGTTAGGATTTTGCATCTAATGTTTCATTATCATGGTAT
TGATG

GACCTAAGAAAATAAAAATTAGACTAAGCCCCCAAATAAGCTGCATGCATTTGTA
ACATG
ATTAGTAGATTTGAATATATAGATGTAGTATTTTGGGTATCTAGGTGTTTTATCAT
TATG
TAAAGGAATTAAAGTAAAGGACTTTGTAGTTGTTTTTATTAAATATGCATATAGT
AGAGT
GCAAAAATATAGCAAAAATAAAAATAAAAGGTAGAAAAGCATTTTAGATATGCC
TTAATT
TAGAAACTGTGCCAGGTGGCCCTCGGAATAGATGCCAGGCAGAGACCAGTGCCT
GGGTGG
TGCTCCTCTTGTCTGCCCTCATGAAGAAGCTTCCCTCACGTGATGTAGTGCCTC
GTAG
GTGTCATGTGGAGTAGTGGGAACAGGCAGTACTGTTGAGAGGAGAGCAGTGTGA
GAGTTT
TTCTGTAGAAGCAGAACTGTCAGCTTGTGCCTTGAGGCTTCCAGAACGTGTCAGA
TGGAG
AAGTCCAAGTTTCCATGCTTCAGGCAACTTAGCTGTGTACAGAAGCAATCCAGTG
TGGTA
ATAAAAAGCAAGGATTGCCTGTATAATTTATTATAAAAATAAAAAGGGATTTTAA
ACCAA
CAATCCCAACACCTCAAAGCTTGTTCATTTTTTGGTATTTGAGGTTTTTATCT
GAAG
GTAAAGGGCAAGTGTTTGGTATAGAAGAGCAGTATGTGTTAAGAAAAGAAAA
TATTGG
TCACGTAGAGTGCAAATTAGAACTAGAAAGTTTTATACGATTATCATTTTGAGAT
GTGT
TAAAGTAGGTTTTCACTGTAAAATGTATTAGTGTTTCTGCATTGCCATAGGGCCTG
GTTA

AAACTTTCTCTTAGGTTTCAGGAAGACTGTCACATACAGTAAGCTTTTTTCCTTCT
GACT
TATAATAGAAAATGTTTTGAAAGTAAAAAAAAAAAAATCTAATTTGGAAATTTGAC
TTGTT
AGTTTCTGTGTTTGAAATCATGGTTCTAGAAATGTAGAAATTGTGTATATCAGATA
CTCA
TCTAGGCTGTGTGAACCAGCCCAAGATGACCAACATCCCCACACCTCTACATCTC
TGTCC
CCTGTATCTCTTCCTTTCTACCACTAAAGTGTTCCCTGCTACCATCCTGGCTTGTCC
ACA
TGGTGCTCTCCATCTTCCTCCACATCATGGACCACAGGTGTGCCTGTCTAGGCCTG
GCCA
CCACTCCCAACTTGACCTAGCCACATTCATCTAGAGATGGTTCCTGATGCTGGGC
ACAGA
CTGTGCTCATGGCACCCATTAGAAATGCCTCTAGCATCTTTGTATGCATCTTGATT
TTTA
AACCAAGTCATTGTACAGAGCATTGAGTTTTGGCTGTGGTACCAAGAGAAAAACT
AATCA
AGAATATAAACCACATTCCAGGCTGCTGTTTTCTCTCCATCTACAGGCCACACTTT
TACT
GTATTTCTTCATACTTGAAATTCATTCTGCTATTTTCATATCAGGGTACAGACTTA
TAAG
GGTGCATGTTCTTAAAGGTGCATAATTATTCTTATTCCGTTTGCTTATATTGCTA
CAGA
ATGCTCTGTTTTGGTGCTTTGAGTTCTGCAGACCCAAGAAGCAGTGTGGAAATTC
ACTGC
CTGGGACACAGTCTTATAAGAATGTTGGCAGGTGACTTTGTATCAGATGTTGCTT
CTCTT

TTCTCTGTACACAGATTGAGAGTTACCACAGTGGCCTGTCGGGTCCACCCTGTGG
 GTGCA
 GCACAGCTCTCTGAAAGCAAGAACCTTCTACCTATTCTAACGTTTTTGGCCCTCTA
 AGAA
 AAATGGCCTCAGGTATGGTATAGACATAGCAAGAGGGGAAGGGCTGTCTCACTC
 TAGCAA
 CCATCCCTCCATTACACACAGAAAGCCCTCTTGAAGCAAAAGAAGAAGAAAGAA
 AGAAAG
 CTTATCTCTAAGGCTACTGTCTTCAGAATGCTCTGAGCTGAATGCTCTTGCTCCTT
 TCCC
 AAGAGGCAGATGAAAATATAGCCAGTTTATCTATACCCTTCTATCTGAGGAGGA
 GAATA
 GAAAAGTAGGGTAAATATGTAACGTAAAATATGTCATTCAAGGACCACCAAAC
 TTTAAG
 TACCCTATCATTAAAAATCTGGTTTTAAAAGTAGCTCAAGTAAGGGATGCTTTGT
 GACCC
 AGGGTTTCTGAAGTCAGATAGCCATTCTTACCTGCCCCTTACTCTGACTTATTGGG
 AAAG
 GAGAACTGCAGTGGTGTCTGTTGCAGTGGCAAAGGTAACATGTCAGAAAATTC
 AGAG
 GGTTCATACCAATAATCCTTTGGAACTGGATGTCTTACTGGGTGCTAGAATGA
 AAATG
 TAGGTATTTATTGTCAGATGATGAAGTTCATTGTTTTTTTCAAATTGGTGTTGAA
 ATAT
 CACTGTCCAATGTGTTCACTTATGTGAAAGCTAAATTGAATGAGGCAAAAAGAGC
 AAATA
 GTTTGTATATTTGTAATACCTTTTGTATTTCTTACAATAAAAATATTGGTAGCAAA
 TAAA

AATAATAAAAACAATAACTTTAAACTGCTTTCTGGAGATGAATTACTCTCCTGGC
TATTT
TCTTTTTTACTTTAATGTAAAATGAGTATAACTGTAGTGAGTAAAATTCATTAAAT
TCCA
AGTTTTAGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Nº: 21, Proteína de CDK6.:

MEKDGLCRADQQYECVAEIGEGAYGKVFKARDLKNNGGRFVALKRVRVQTG
EEGMPLSTIREVAVLRHLETFEHPNVVRLFDVCTVSRDRETKLTLVFEH
VDQDLTTYLDKVPEPGVPTETIKDMMFQLLRGLDFLHSHRVVHRDLKPQN
ILVTSSGQIKLADFLARIYSFQMALTSVVVTLWYRAPEVLLQSSYATPV
DLWSVGCIFAEMFRRKPLFRGSSDVDQLGKILDVIGLPGEEDWPRDVALP
RQAFHSKSAQPIEKFVTDIDELGKDLLKCLTFNPAKRISAYSALSHPYF
QDLERCKENLDSHLPPSQNTSELNTA

5

Nº: 6, flanqueo de FLJ16046

TGATCTCCAGATTTACATATTCAGTTCCTACTTGACAACTCCCCTTGGATATTTCA
AAGA
TATCTCAAATTCAAAGTGTCACACCTGTCACACACTCTTCTGCTCTCTGCCCTTC
AACC
TGATCCTCTCTTTTTTTNGACTCTATGAAAGGCATCNCCTTTCATTCTATTTAGCTA
GAG
ACTANAAGGCACTCTAGCATTCTTCTCTACCCCTTACCCAATTGATTACCTAATC
CCAT
GGATTTACCTCCTTAAATATCTCTGTGTCATCTCTTGCTTCCCTTGTCCTTATC
TTC
ACCACCTCCACCTCCCGCCATCCAGAGAAATTAGTCATCCAGCTAGTTTCCTTATA
TTTA
CCTTTATACTCCTTTCCTGCATTAGNCATATGAAAGCCACAATGATTTCTAACAAG
ATAC

10

TAATCTGATATCCTGTAAACTCCTTCNTAAAAAACTTTAGTGGCTTACCTTCAGT
CTTA
AGATAGAAAATATAACTTCTAAGAAGGACCCACATGGNTCCTCAAGGACTAGTTC
TCCTG
ACCTCTCCATTCTCATCACACAGGACTTGCCCCCTTGCTGTCTTCTCTTCAGTCCTG
CTT

NTGNNTCCCCCAGAAATTTTGTGTATGCCAGGCTCCTACATGCCAAAGAGCATT
GCAAT
GCTGTTCCCTCTGTTTTAGAAAANCTTATA

Nº: 14, ADNc de FLJ16046

GATACAGATCAGATGGTGACTGAATAGAAGCTGCCCCAGTCCTGGGCTCATGATG
TACGC
ACCTGTTGAATTTTCAGAAGCTGAATTCTCACGAGCTGAATATCAAAGAAAGCAG
CAATT
TTGGGACTCAGTACGGCTAGCTCTTTTCACATTAGCAATTGTAGCAATCATAGGA
ATTGC
AATTGGTATTGTTACTCATTTTGTTGTTGAGGATGATAAGTCTTCTATTACCTTGC
CTC
TTTTAAAGTCACAAATATCAAATATAAAGAAAATTATGGCATAAGATCTTCAAGA
GAGTT
TATAGAAAGGAGTCATCAGATTGAAAGAATGATGTCTAGGATATTCGACATTCT
TCTGT
AGGCGGTCGATTTATCAAATCTCATGTTATCAAATTAAGTCCAGATGAACAAGGT
GTGGA
TATTCTTATAGTGCTCATATTTTCGATACCCATCTACTGATAGTGCTGAACAAATCA
AGAA

AAAAATTGAAAAGGCTTTATATCAAAGTTTGAAGACCAAACAATTGTCTTTGACC
TTAAA
CAAACCATCATTTAGACTCACACCTATTGACAGCAAAAAGATGAGGAATCTTCTC
AACAG
TCGCTGTGGAATAAGGATGACATCTTCAAACATGCCATTACCAGCATCCTCTTCT
ACTCA
AAGAATTGTCCAAGGAAGGGAAACAGCTATGGAAGGGGAATGGCCATGGCAGGC
CAGCCT
CCAGCTCATAGGGTCAGGCCATCAGTGTGGAGCCAGCCTCATCAGTAACACATGG
CTGCT
CACAGCAGCTCACTGCTTTTGGAAAAATAAAGACCCAACTCAATGGATTGCTACT
TTTGG
TGCAACTATAACACCACCCGCAGTGAAACGAAATGTGAGGAAAATTATTCTTCAT
GAGAA
TTACCATAGAGAAACAAATGAAAATGACATTGCTTTGGTTCAGCTCTCTACTGGA
GTTGA
GTTTTCAAATATAGTCCAGAGAGTTTGCCTCCCAGACTCATCTATAAAGTTGCCAC
CTAA
AACAAGTGTGTTTCGTCACAGGATTTGGATCCATTGTAGATGATGGACCTATACAA
AATAC
ACTTCGGCAAGCCAGAGTGGAAACCATAAGCACTGATGTGTGTAACAGAAAGGA
TGTGTA
TGATGGCCTGATAACTCCAGGAATGTTATGTGCTGGATTCATGGAAGGAAAAATA
GATGC
ATGTAAGGGAGATTCTGGTGGACCTCTGGTTTATGATAATCATGACATCTGGTAC
ATTGT
GGGTATAGTAAGTTGGGGACAATCATGTGCGCTTCCCAAAAAACCTGGAGTCTAC
ACCAG

AGTAACTAAGTATCGAGATTGGATTGCCTCAAAGACCGGTATGTAG
TGTGGATTGTCCAT
GAGTTATACACATGGCACACAGAGCTGATACTCCTGCGTATTTTGTATTGTTTAAA
TTCA
TTTACTTTGGATTAGTGCTTTTGGCTAGATGTCAAGAAGCCCTTCAGACCCAGACAA
ATCT
AATATCCTGAGGTGGCCTTTACATACGTAGGACCAAACCCTCTCTACCATGAGGG
AAGAA
GACACAGCAAATGACAGACAGCACCTATTCCTTACTCACAAGGGAAACTGCTTGT
GATAC
TTCCTAATAAGATAAATGAGTGGTTTCCCTCAATTGAAGACAGGAACATCATTTT
CCACA
GGATATGAAGAGCTGCCAGTAATGCCAAAATCTTACCTCATATAATACCTGGAGC
ATGTG
AGATTCTTCTAGTGAAAAAGAACAGTCTTCCCTGAAGACTCAGGGCTTCAACATT
CTAGA
ACTGATAAGTGGACCTTCAGTGTGCAAGAATGGAGAAGCATGGGATTTGCATTAT
GACTT
GAACTGGGCTTATATCTAATAATACAGAGCACTATCACTAACCTCAACAGTTGAC
ATTTT
AAAAGTTTTTAAATGTATCTGAACTTGCTGTTAACACAGTGTATAACTCAAGCA
CTAGC
TTCAGGAAGCATGTTGTGTTGTTAAGAAGCTTTTCTGATTTATTCTTTAACAGCAT
CTTG
CCATCTATATGTTAGTAGCAGTTGGCCCAGAAAGGAC

Nº: 22, Proteína de FLJ16046

MMYAPVEFSEAEFSRAEYQRKQQFWDSVRLALFTLAIVAIIIGIAIGIVTH
FVVEDDKSFYYLASFKVTNIKYKENYGIRSSREFIERSHQIERMMSRIFR

HSSVGGRFIKSHVIKLSPEQGVLDILIVLIFRYPSTDSAEQIKKKIEKAL
YQSLKTKQLSLTLNKPSFRLTPIDSKKMRNLLNSRCGIRMTSSNMPLPAS
SSTQRIVQGRETAMEGEWPWQASLQLIGSGHQCGASLISNTWLLTAAHCF
WKNKDPTQWIATFGATITPPAVKRNVRKIILHENYHRETNENDIALVQLS
TGVEFSNIVQRVCLPDSSIKLPPKTSVFVTGFGSIVDDGPIQNTLRQARV
ETISTDVCNRKDVYDGLITPGMLCAGFMEGKIDACKGDSGGPLVYDNHDI
WYIVGIVSWGQSCALPKKPGVYTRVTKYRDWIASKTGM

SEC ID N°: 7, flanqueo de PCSK

TGTTCTATGTATTATATAGATGAAATATCTTTCTTCTATCTTCCCTGAGGACACCA
TATG
AGATAACAGAATTTATATCCTGGTCTCTGTTTTAGTTCTTGGCACANAGCTCCTGA
GAAC
CTTGTCATTTCTGATTGGGAAGAGCAATAGGAGGATCTTTTGTTATAATATTTGC
CTTT
GACCCTGTTCTGACTCAGTACTAACATCCTTGTAATTCTAAGTGATAAGAGC
ACTAG
GAACATCCTTTGTTCTACGAAGGGGACTTGGGGTGGGCTCCTGGATGGGGGCTGG
TCACC
AAAAGGACCAAGCTACGATTANAACTTGGAAATTTTCAGCCCTGTCCCCACTTC
TCTAN
AGAGGGGAGAACAATNAAGTCCNTTACTGATCATACTACCTGAGGAAGCCTCCT
TAAAA
TCNCAATAGNNATGAGGATCTGGNGAGATTCCNAANTGNGCNAACNCATNCNNT
NCCNNG
AGGGTGNNNNACCCNNNCNCTGCCNGGNCAGANCCNCCTNGTNTTGNNANCTNC
CCNTAC
5 TTAACCNTTCCNNGGAANTCNTCAGAGT

SEC ID N°: 15, ADNc de PCSK6

TCGCGGGCCGAGGACGCCTCTGGGGCGGCACCGCGTCCCGAGAGCCCCAGAAGT
CGGCGG
GGAAGTTTCCCCGGTGGGGGGCGTTTCGGGCCTCCCGGACGGCTCTCGGCCCCGG
AGCCC
GGTCGCAGGAGCGCGGGCCCCGGGGGCGGGAACGCGCCGCGGCGCCTCCTCCTC
CCCGGC
TCCCGCCCCGCGGCGGTGTTGGCGGCGGCGGTGGCGGCGGCGGCGGCGCTTCCCCG
GCGCG
GAGCGGCTTTAAAAGGCGGCACTCCACCCCCGGCGCACTCGCAGCTCGGGCGCC
GCGCG
AGCCTGTCGCCGCTATGCCTCCGCGCGCGCCGCCTGCGCCCCGGGCCCCCGGCCGCC
GCCCC
GGGCCGCCGCCGCCACCGACACCGCCGCGGGCGCGGGGGGCGCGGGGGGCGCGG
GGGGCG
CCGGCGGGCCCCGGGTCCGGCCGCTCGCGCCGCGTCCCTGGCGCTGGCTGCTGCT
GCTGG
CGCTGCCTGCCGCCTGCTCCGCGCCCCCGCCGCGCCCCGTCTACACCAACCACTG
GGCGG
TGCAAGTGCTGGGCGGCCCGGCCGAGGCGGACCGCGTGGCGGCGGCGCACGGGT
ACCTCA
ACTTGGGCCAGATTGGAAACCTGGAAGATTACTACCATTTTTATCACAGCAAAAC
CTTTA
AAAGATCAACCTTGAGTAGCAGAGGCCCTCACACCTCCTCAGAATGGACCCCCA
GGTGA
AATGGCTCCAGCAACAGGAAGTGAAACGAAGGGTGAAGAGACAGGTGCGAAGT
GACCCGC
AGGCCCTTTACTTCAACGACCCCATTTGGTCCAACATGTGGTACCTGCATTGTGGC
GACA

AGAACAGTCGCTGCCGGTCGGAAATGAATGTCCAGGCAGCGTGGAAGAGGGGCT
ACACAG
GAAAAAACGTGGTGGTCACCATCCTTGATGATGGCATAGAGAGAAATCACCTG
ACCTGG
CCCCAAATTATGATTCCTACGCCAGCTACGACGTGAACGGCAATGATTATGACCC
ATCTC
CACGATATGATGCCAGCAATGAAAATAAACACGGCACTCGTTGTGCGGGAGAAG
TTGCTG
CTTCAGCAAACAATTCCTACTGCATCGTGGGCATAGCGTACAATGCCAAAATAGG
AGGCA
TCCGCATGCTGGACGGCGATGTCACAGATGTGGTCGAGGCAAAGTCGCTGGGCAT
CAGAC
CCAACTACATCGACATTTACAGTGCCAGCTGGGGGCCGGACGACGACGGCAAGA
CGGTGG
ACGGGCCCGGCCGACTGGCTAAGCAGGCTTTCGAGTATGGCATTAAAAAGGGCC
GGCAGG
GCCTGGGCTCCATTTTCGTCTGGGCATCTGGGAATGGCGGGAGAGAGGGGGACTA
CTGCT
CGTGCGATGGCTACACCAACAGCATCTACACCATCTCCGTCAGCAGCGCCACCGA
GAATG
GCTACAAGCCCTGGTACCTGGAAGAGTGTGCCTCCACCCTGGCCACCACCTACAG
CAGTG
GGGCCTTTTATGAGCGAAAAATCGTCACCACGGATCTGCGTCAGCGCTGTACCGA
TGGCC
AACTGGGACCTCAGTCTCTGCCCCATGGTGGCGGGCATCATCGCCTTGGCTCT
AGAAG
CAAACAGCCAGTTAACCTGGAGGGACGTCCAGCACCTGCTAGTGAAGACATCCC
GGCCGG

CCCACCTGAAAGCGAGCGACTGGAAAGTGAACGGCGCGGGTCATAAAGTTAGCC
ATTTCT
ATGGATTTGGTTTGGTGGACGCAGAAGCTCTCGTTGTGGAGGCAAAGAAGTGGAC
AGCAG
TGCCATCGCAGCACATGTGTGTGGCCGCCTCGGACAAGAGACCCAGGAGCATCCC
CTTAG
TGCAGGTGCTGCGGACTACGGCCCTGACCAGCGCCTGCGCGGAGCACTCGGACC
AGCGGG
TGGTCTACTTGGAGCACGTGGTGGTTCGCACCTCCATCTCACACCCACGCCGAGG
AGACC
TCCAGATCTACCTGGTTTCTCCCTCGGGAACCAAGTCTCAACTTCTGGCAAAGAG
GTTGC
TGGATCTTTCCAATGAAGGGTTTACAAACTGGGAATTCATGACTGTCCACTGCTG
GGGAG
AAAAGGCTGAAGGGCAGTGGACCTTGGAAATCCAAGATCTGCCATCCCAGGTCC
GCAACC
CGGAGAAGCAAGGGAAGTTGAAAGAATGGAGCCTCATACTGTATGGCACAGCAG
AGCACC
CGTACCACACCTTCAGTGCCCATCAGTCCCGCTCGCGGATGCTGGAGCTCTCAGC
CCCAG
AGCTGGAGCCACCCAAGGCTGCCCTGTCACCCTCCAGGTGGAAGTTCCTGAAGA
TGAGG
AAGATTACACAGGTGTGTGCCATCCGGAGTGTGGTGACAAAGGCTGTGATGGCCC
CAATG
CAGACCAGTGCTTGAAGTGCCTCACTTCAGCCTGGGGAGTGTCAAGACCAGCAG
GAAGT
GCGTGAGTGTGTGCCCTTGGGCTACTTTGGGGACACAGCAGCAAGACGCTGTCCG
CCGGT

GCCACAAGGGGTGTGAGACCTGCTCCAGCAGAGCTGCGACGCAGTGCCTGTCTTG
CCGCC
GCGGGTTCTATCACCACCAGGAGATGAACACCTGTGTGACCCTCTGTCCTGCAGG
ATTTT
ATGCTGATGAAAGTCAGAAAAATTGCCTTAAATGCCACCCAAGCTGTAAAAAGT
GCGTGG
ATGAACCTGAGAAATGTA CTGTCTGTAAAGAAGGATTCAGCCTTGCACGGGGCA
GCTGCA
TTCCTGACTGTGAGCCAGGCACCTACTTTGACTCAGAGCTGATCAGATGTGGGGA
ATGCC
ATCACACCTGCGGAACCTGCGTGGGGCCAGGCAGAGAAGAGTGCATTCACTGTG
CGAAAA
ACTTCCACTTCCACGACTGGAAGTGTGTGCCAGCCTGTGGTGAGGGCTTCTACCC
AGAAG
AGATGCCGGGCTTGCCCCACAAAGTGTGTGCGAAGGTGTGACGAGAACTGCTTGA
GCTGTG
CAGGCTCCAGCAGGAACTGTAGCAGGTGTAAGACGGGCTTCACACAGCTGGGGA
CCTCCT
GCATACCAACCACACGTGCAGCAACGCTGACGAGACATTCTGCGAGATGGTGA
AGTCCA
ACCGGCTGTGCGAACGGAAGCTCTTCATTCAGTTCTGCTGCCGCACGTGCCTCCT
GGCCG
GGTAAGGGTGCCTAGCTGCCACAGAGGGCAGGCACTCCCATCCATCCATCCGTC
CACCT
TCCTCCAGACTGTCGGCCAGAGTCTGTTTCAGGAGCGGGCCCTGCACCTGACAG
CTTTA
TCTCCCCAGGAGCAGCATCTCTGAGCACCCAAGCCAGGTGGGTGGTGGCTCTTAA
GGAGG

TGTTCTAAAATGGTGATATCCTCTCAAATGCTGCTTGTTGGCTCCAGTCTTCCGA
 CAAA
 CTAACAGGAACAAAATGAATTCTGGGAATCCACAGCTCTGGCTTTGGAGCAGCTT
 CTGGG
 ACCATAAGTTTACTGAATCTTCAAGACCAAAGCAGAAAAGAAAGGCGCTTGGCA
 TCACAC
 ATCACTCTTCTCCCCGTGCTTTTCTGCGGCTGTGTAGTAAATCTCCCCGGCCCAGC
 TGGC
 GAACCCTGGGCCATCCTCACATGTGACAAAGGGCCAGCAGTCTACCTGCTCGTTG
 CCTGC
 CACTGAGCAGTCTGGGGACGGTTTGGTCAGACTATAAATAAGATAGGTTTGAGGG
 CATAA
 AATGTATGACCACTGGGGCCGGAGTATCTATTTCTACATAGTCAGCTACTTCTGA
 AACTG
 CAGCAGTGGCTTAGAAAGTCCAATTCCAAAGCCAGACCAGAAGATTCTATCCCC
 GCAGC
 GCTCTCCTTTGAGCAAGCCGAGCTCTCCTTGTTACCGTGTTCTGTCTGTGTCTTCA
 GGAG
 TCTCATGGCCTGAACGACCACCTCGACCTGATGCAGAGCCTTCTGAGGAGAGGCA
 ACAGG
 AGGCATTCTGTGGCCAGCCAAAAGGTACCCCGATGGCCAAGCAATTCCTCTGAAC
 AAAAT
 GTAAAGCCAGCCATGCATTGTTAATCATCCATCACTTCCCATTTTATGGAATTGCT
 TTTA
 AAATACATTTGGCCTCTGCCCTTCAGAAGACTCGTTTTTAAGGTGGAAACTCCTGT
 GTCT
 GTGTATATTACAAGCCTACATGACACAGTTGGATTTATTCTGCCAAACCTGTGTA
 GGCAT

TTTATAAGCTACATGTTCTAATTTTACCGATGTTAATTATTTTGACAAATATTTCA
TAT
ATTTTCATTGAAATGCACAGATCTGCTTGATCAATTCCTTGAATAGGGAAGTAA
CATT
GCCTTAAATTTTTTCGACCTCGTCTTTCTCCATATTGTCCTGCTCCCCTGTTTGACG
ACA
GTGCATTTGCCTTGTCACCTGTGAGCTGGAGAGAACCAGATGTTGTTTATTGAAT
CTAC
AACTCTGAAAGAGAAATCAATGAAGCAAGTACAATGTTAACCTAAATTAATAA
AAGAGT
TAACATCCCATGGC

SEC ID N°: 23, Proteína de PCSK6

MPPRAPPAGPRPPRAAAAATDTAAGAGGAGGAGGAGGPGFRPLAPRPWR
WLLLLALPAACSAPPPRPVYTNHWAVQVLGGPAEADRVA AAHGYLNLGQI
GNLEDYYHFYHSKTFKRSTLSSRGPHTFLRMDPQVKWLQQQEVKRRVKRQ
VRSDPQALYFNDPIWSNMWYLHC GDKNSRCRSEMNVQAAWKRGYTGKNVV
VTILDDGIERNHPDLAPNYDSYASYDVNGNDYDPSPRYDASNENKHGTRC
AGEVAASANN SYCIVGIA YNAKIGGIRMLDGDVTDVVEAKSLGIRPNYID
IYSASWGPDDD GKTVDGPGRLAKQAFEYGIKKGRQGLGSIFVWASGNNGR
EGDYCSCDGYTNSIYTISVSSATENGYKPWYLEECATLATTYSSGAFYE
RKIVTTDLRQRCTDGHTGTSVSAPMVAGIIALALEANSQLTWRDVQHLLV
KTSRPAHLKASDWK VNGAGHKVSHFYGFGLVDAEALVVEAKKWTAVPSQH
MCVAASDKRPRSIPLVQVLRTTALTSACAEHSDQRVVYLEHV VVRTSISH
PRRGDLQIYLVSPSGTKS QLLAKRLLDLSNEGFTNWEFMTVHCWGEKAEG
QWTLEIQDLPSQVRNPEKQ GKLKEW SLILYGTAEHPYHTFSAHQSRSRML
ELSAPELEPPKAALSPSQVEVPEDEEDYTG VCHPECGDKGCDGPNADQCL
NCVHFSLSGVKTSRKCVSVCPLGYFGDTAARRCRRCHKGCETCSSRAATQ
CLSCRRGFYHHQEMNTCVTLCPAGFYADESQKNCLKCHPSCKKCVDEPEK

CTVCKEGFSLARGSCIPDCEPGTYFDSELIRCGECHHTCGTCVGPGREEC
IHCAKNFHFDWKCV PACGEGFYPEEMPGLPHKVCRRCDENCLSCAGSSR
NCSRCKTGFTQLGTSCITNHTCSNADETFCEMVKSNRLCERKLFIQFCCR
TCLLAG

SEC ID N°: 8, flanqueo de PTGDR

GGTGCCTTAGACATTACAGGCGGGGCACCATGGGTGGCATCAGTGGTTGAGATG
ACTGCC
TTTGACTCAGGGTGTGACCCATGGGGTCCTGGGATCAAGTCCTGCATCCGGCTCC
CTGCA
GGGAGCCCACTTCTCCCTCTTCCTAGGTCTCTGCCTCTCTCCTTATATCTCTCATGA
ATA
AATAAATAAAAATCTTTAAAAAAAATTAGAGGCATTATGGATGGCACGTGATGT
GATTAG
CATTGGATTGACAAATTGACAAATTGAATTTAAGTAAAAAAAATAACAGGNAAA
AATGCT
ACTGGGAGGGGTGCCTGGGTCGCTCTGTTGGTTAAACTTTGCCTTTGGCTCAGG
TCATG
ATCTCAGGGTTCTGNGNATTGAGCCCCACCTTAGGCTCTGCTTGTTTCTCTGCCCC
TCCC
CCTGCTNNNNTTCTATCGAATAAANAANAANCCTTAAAAAAAATGCTATTGGGA
GTTAT
TTGATTACCTACAAGTGAAAAGATNTGACAGTCGGAGATCANAAAAACATTATGT
CTATT
ACNTATTTTANCTTTTTTTTTTTTTT

5 SEC ID N°: 16, ADNc de PTCGR

CGCCCGAGCCGCGCGCGGAGCTGCCGGGGGCTCCTTAGCACCCGGGCGCCGGGG
CCCTCG
CCCTCCGCAGCCTTCACTCCAGCCCTCTGCTCCCGCACGCCATGAAGTCGCCGTT

CTAC
CGCTGCCAGAACACCACCTCTGTGGAAAAAGGCAACTCGGCGGTGATGGGCGGG
GTGCTC
TTCAGCACCGGCCTCCTGGGCAACCTGCTGGCCCTGGGGCTGCTGGCGCGCTCGG
GGCTG
GGGTGGTGTCTCGCGGCGTCCACTGCGCCCGCTGCCCTCGGTCTTCTACATGCTGGT
GTGT
GGCCTGACGGTCACCGACTTGCTGGGCAAGTGCCTCCTAAGCCCGGTGGTGTGG
CTGCC
TACGCTCAGAACCGGAGTCTGCGGGTGTCTGCGCCCGCATTGGACAACCTCGTTGT
GCCAA
GCCTTCGCCTTCTTCATGTCCTTCTTTGGGCTCTCCTCGACACTGCAACTCCTGGCC
ATG
GCACTGGAGTGCTGGCTCTCCCTAGGGCACCCCTTCTTCTACCGACGGCACATCA
CCCTG
CGCCTGGGCGCACTGGTGGCCCCGGTGGTGTGAGCGCCTTCTCCCTGGCTTTCTGCG
CGCTA
CCTTTCATGGGCTTCGGGAAGTTCGTGCAGTACTGCCCCGGCACCTGGTGTCTTAT
CCAG
ATGGTCCACGAGGAGGGCTCGCTGTCGGTGTGGGGTACTCTGTGCTCTACTCCA
GCCTC
ATGGCGCTGCTGGTCCTCGCCACCGTGCTGTGCAACCTCGGCGCCATGCGCAACC
TCTAT
GCGATGCACCGGCGGCTGCAGCGGCACCCGCGCTCCTGCACCAGGGACTGTGCC
GAGCCG
CGCGCGGACGGGAGGGAAGCGTCCCCTCAGCCCCTGGAGGAGCTGGATCACCTC
CTGCTG
CTGGCGCTGATGACCGTGCTCTTCACTATGTGTTCTCTGCCCGTAATTTATCGCGC

TTAC
TATGGAGCATTTAAGGATGTCAAGGAGAAAAACAGGACCTCTGAAGAAGCAGAA
GACCTC
CGAGCCTTGCGATTTCTATCTGTGATTTCAATTGTGGACCCTTGGATTTTTATCATT
TTC
AGATCTCCAGTATTTCCGGATATTTTTTTCACAAGATTTTCATTAGACCTCTTAGGTA
CAGG
AGCCGGTGCAGCAATTCCACTAACATGGAATCCAGTCTGTGA1182CAGTGTTTTT
CACTCTGT
GGTAAGCTGAGGAATATGTCACATTTTCAGTCAAAGAACCATGATTAAAAAAAAA
AAAGAC
AACTTACAATTTAAATCCTTAAAAGTTACCTCCCATAACAAAAGCATGTATATGT
ATTTT
CAAAAGTATTTGATATCTTAACAATGTGTTACCATTCTATAGTCATGAACCCCTTC
AGTG
CATTTTCATTTTTTTATTAACAGCAACTAAAATTTTATATATTGTAACCAGTGTTA
AAAG
TCTTAAAAACAATGGTATTAATTGTCCCTACATTTGTGCTTGGTGGCCCTATTTT
TTTT
TTTTAGAGAGGCCTTGAGACATACAGGTCTTTTAAAATACAGTAGAAACACCACT
GTTTA
CGATTATACGATGGACATTCATAAAAAGCATAATTTCTTACCCTATTCATTTTTTG
GTGA
AACCTGATTCATTGATTTTATATCATTGCCGATGTTTAGTTCATTTCTTTGCCAATT
GAT
CTAAGCATAGCCTGAATTATGATGTTCTCAGAGAAGTGAGGTGGGAAATATGAC
CAGGT
CAGGCAGTTGGAGGGGCTTCCCCAGCCACCATCGGGGAGTACTTGCTGCCTCAGG

TGGAG
ACCTGAAGCTGTAAGTAGATGCAGAGCAAGATATGACTATAGCCCACAACCCAA
AGAAGC
AAAAATTCGTTTTTATCTTTTGAAATCCAGTTTCTTTTGTATTGAGTCAAGGGTGT
CAGT
AGGAATCAAAAGTTGGGGGTGGGTTGCAAAATGTTCTTTCAGTTTTTAGAACCTC
CATT
TATAAAAGAATTATCCTATCAATGGATTCTTTAGTGGAAGGATTTATGCTTCTTTG
AAAA
CCAGTGTGTGACTCACTGTAGAGCCATGTTTACTGTTTGACTGTGTGGCACAGGG
GGGCA
TTTGGCACAGCAAAAAGCCCACCCAGGACTTAGCCTCAGTTGACGATAGTAACAA
TGGCC
TTAACATCTACCTAACAGCTACCTATTACAGCCGTATTCTGCTGTCCGTGGAGAC
GGTA
AGATCTTAGGTTCCAAGATTTTACTTCAAATTACACCTTCAAACTGGAGCAGCA
TATAG
CCGAAAAGGAGCACAAGTACTGAGCACTTTAATAGTAATTTAAAAGTTTTCAAGGGTC
AGCAA
TATGATGACTGAAAGGGAAAAGTGGAGGAAACGCAGCTGCAACTGAAGCGGAG
ACTCTAA
ACCCAGCTTGCAGGTAAGAGCTTTCACCTTTGGTAAAAGAACAGCTGGGGAGGTT
CAAGG
GGTTTCAGCATCTCTGGAGTTCCTTTGTATCTGACAATCTCAGGACTCCAAGGTGC
AAAG
CCTGCTGCATTTGCGTGATCTCAAGACCTCCAGCCAGAAGTCCCTTCCAAATATA
AGAGT
ACTCATGTTTATTTATTTCCAAGTACTGAGCAGCAACCTCCTTTGTTTCACTTATGTTTT

TTC

CAGTATCTGAGATAATATAAAGCTGGGTAATTTTTTATGTAATTTTTTGGTATAGC

AAAA

CTGTGAAAAAGCCAAATTAGGCATACAAGGAGTATGATTTAACAGTATGACATG

ATGAAA

AAAATACAGTTGTTTTTGAATTTAACTTTTGTGGTACCTCAATGTGTAAGTAC

ATGC

ATGTTTTATTGTCAGAGGAAGAACATGTTTTTTGTATTCTTTTTTTGGAGAGGTGT

GTTA

GGATAATTGTCCAGTTAATTTGAAAAGGCCCCAGATGAATCAATAAATATAATTT

TATAG

TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEC ID N°: 24, Proteína de PTCGR

MKSPFYRCQNTTSVEKGNSAVMGGVLFSTGLLGNLLALGLLARSGLGWCS
 RRPLRPLPSVFYMLVCGLTVTDLLGKCLLSPVVLAAAYAQNRSRLVLPAL
 DNSLCQAFAMFMSFFGLSSTLQLLAMALECWLSLGHPPFFYRRHITLRLGA
 LVAPVVSASFSLAFCALPFMGFGKFVQYCPGTWCIFIQMVHEEGSLSVLGYS
 VLYSSLMALLVLATVLCNLGAMRNLYAMHRRLQRHPRSCTRDCAEPRADG
 REASPQPLEELDHLALLLALMTVLFTMCSLPVIYRAYYGAFKDVKEKNRTS
 BEAEDLRALRFLSVISIVDPWIFHFRSPVFRIFHFKIFIRPLRYRSRCS
 NSTNMESSL

5

Realizaciones preferentes:

10 Un aspecto de la invención se refiere a un método para prevenir o tratar la gripe en un sujeto. La invención proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe o un método para tratar la infección por virus de la gripe en un mamífero.

15 El anticuerpo para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe se puede administrar a dicho mamífero para proporcionar un título de anticuerpos en dicho mamífero eficaz para aumentar la resistencia de dicho mamífero a la infección por la gripe. El anticuerpo para uso en un método para tratar la infección por el virus de la gripe en un mamífero se puede unir a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 en una cantidad eficaz para tratar el virus de la gripe cuando se administra.

20 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar la gripe en un sujeto, comprendiendo dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH). La composición farmacéutica es para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero al virus de la gripe.

25 En una realización relacionada, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un vehículo de administración farmacéuticamente aceptable.

30 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica que se ha descrito anteriormente, para usar un método para prevenir o tratar la gripe en un sujeto, que comprende la etapa de introducir en el sujeto una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica.

El anticuerpo de la invención se puede unir al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) con una afinidad de unión mayor o igual que 10^5 M^{-1} . El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe o un método para tratar la infección por el virus de la gripe en un mamífero.
- 10 2. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero a la infección por un virus de la gripe.
- 15 3. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo se administra a dicho mamífero para proporcionar un título de anticuerpos en dicho mamífero eficaz para aumentar la resistencia de dicho mamífero a la infección por la gripe.
- 20 4. Una composición farmacéutica para uso en un método para aumentar la resistencia de un mamífero al virus de la gripe, donde dicha composición comprende un anticuerpo suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo anticuerpo se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH).
- 25 5. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 en una cantidad eficaz para tratar el virus de la gripe cuando se administra a un mamífero para uso en un método para tratar la infección por el virus de la gripe en un mamífero.
6. El anticuerpo o composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente donde dicho anticuerpo se une al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (PTCH) con una afinidad de unión mayor o igual que 10^5 M^{-1} .
7. El anticuerpo o composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

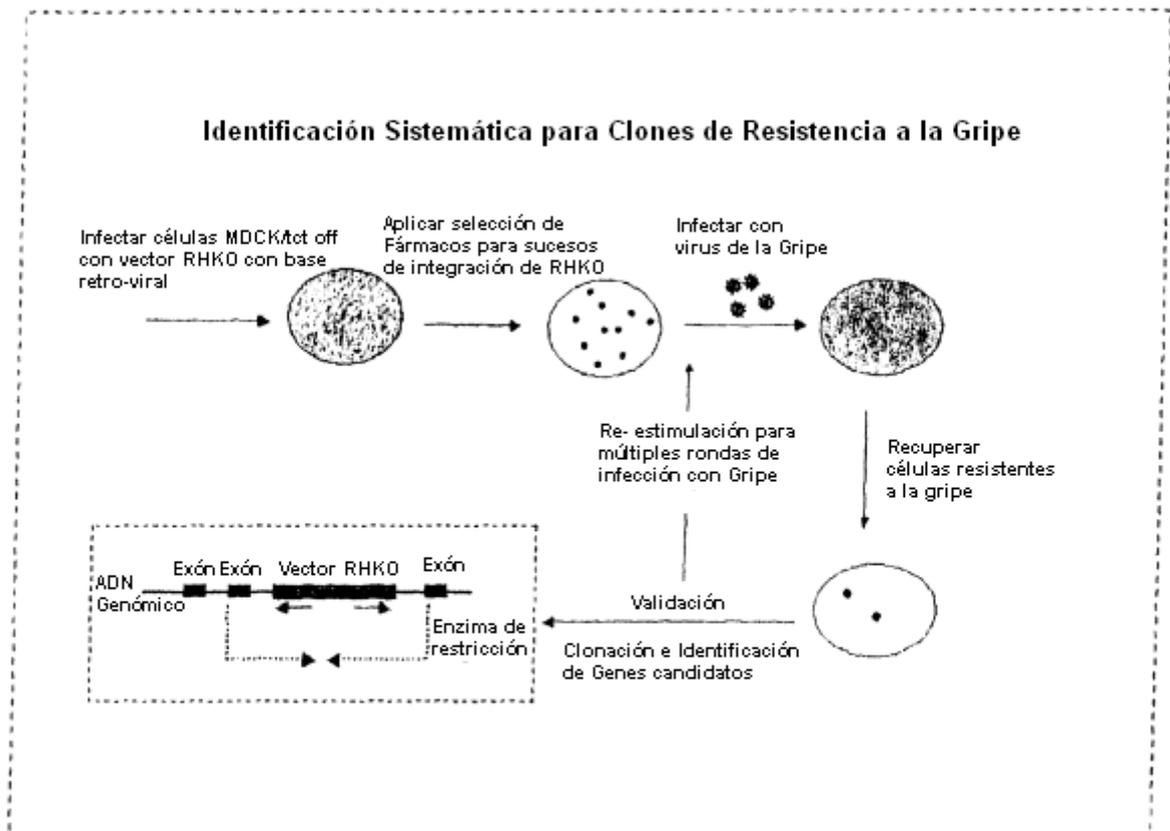


FIG. 1

FIG. 2B

Buscador de Genoma de UCSC en la Reunión de Jul. 2004 sobre Perro

mover <<< << < > >> >>> ampliar 1,5x 3x 10x base reducir 1,5x 3x 10x salto

posición chr1:74,006,856-74,031,155 tamaño 24,300 bp. ancho de imagen: 620

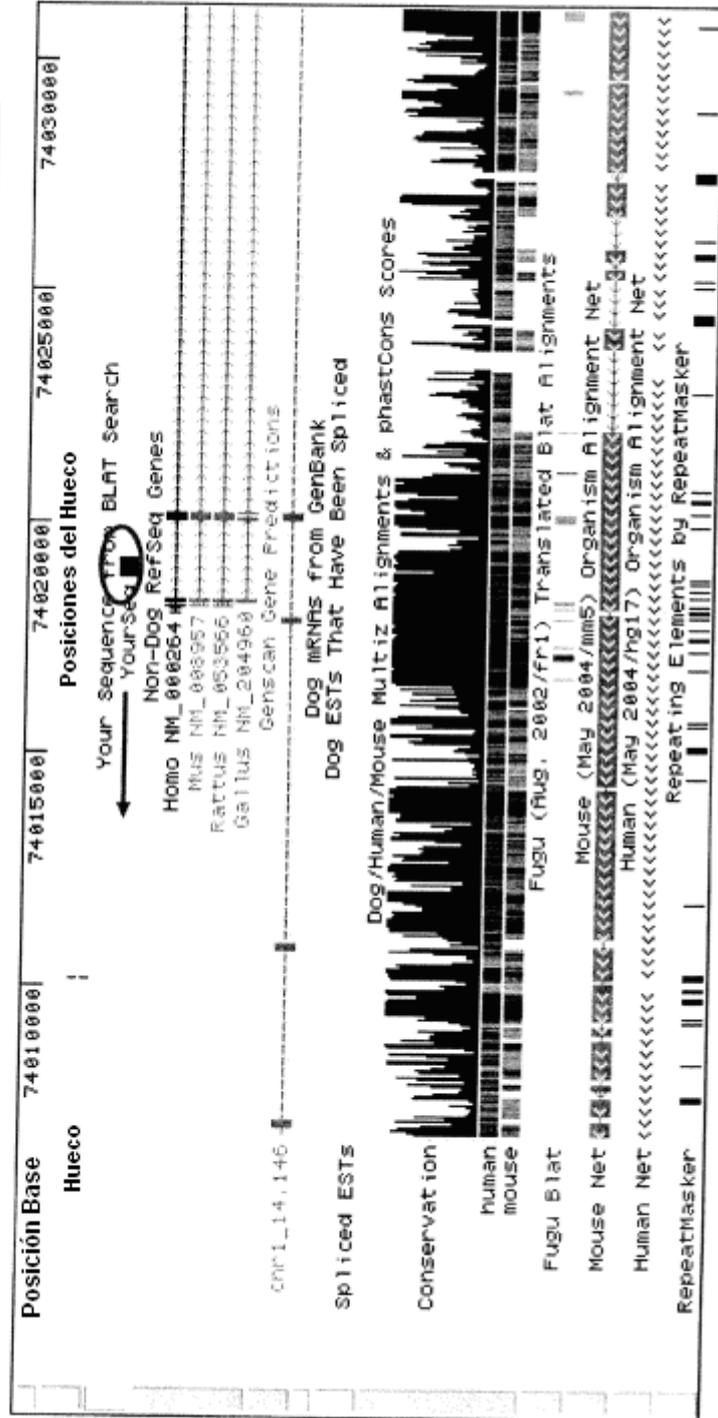


FIG. 2C

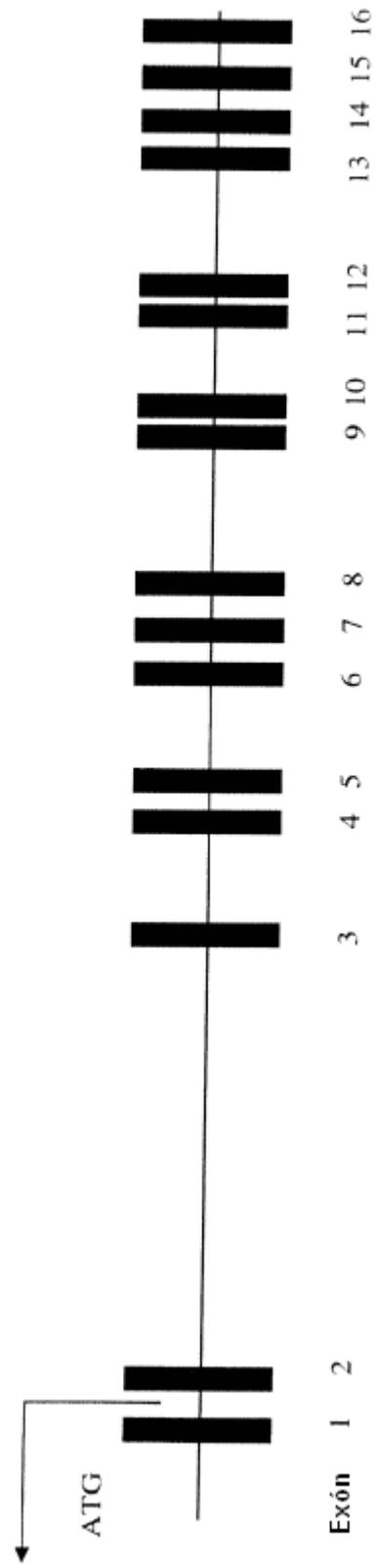


FIG. 3A

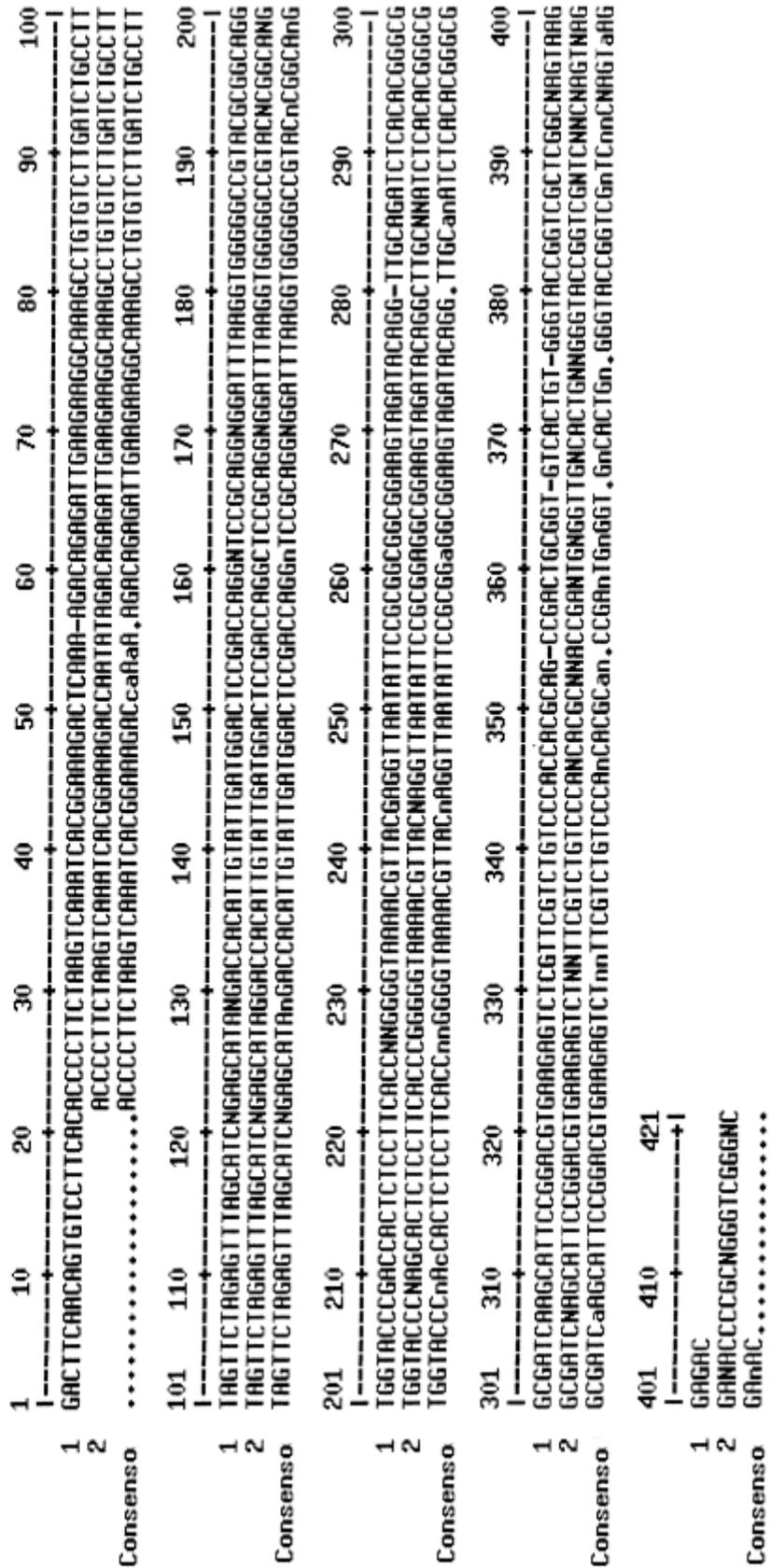


FIG. 3B

Buscador de Genoma de UCSC en la Reunión de Jul. 2004 sobre Perro

mover <<< << < > >> >>>
 ampliar 1,5x 3x 10x base
 reducir 1,5x 3x 10x
 salto

posición tamaño 15.733 bp. ancho de imagen:

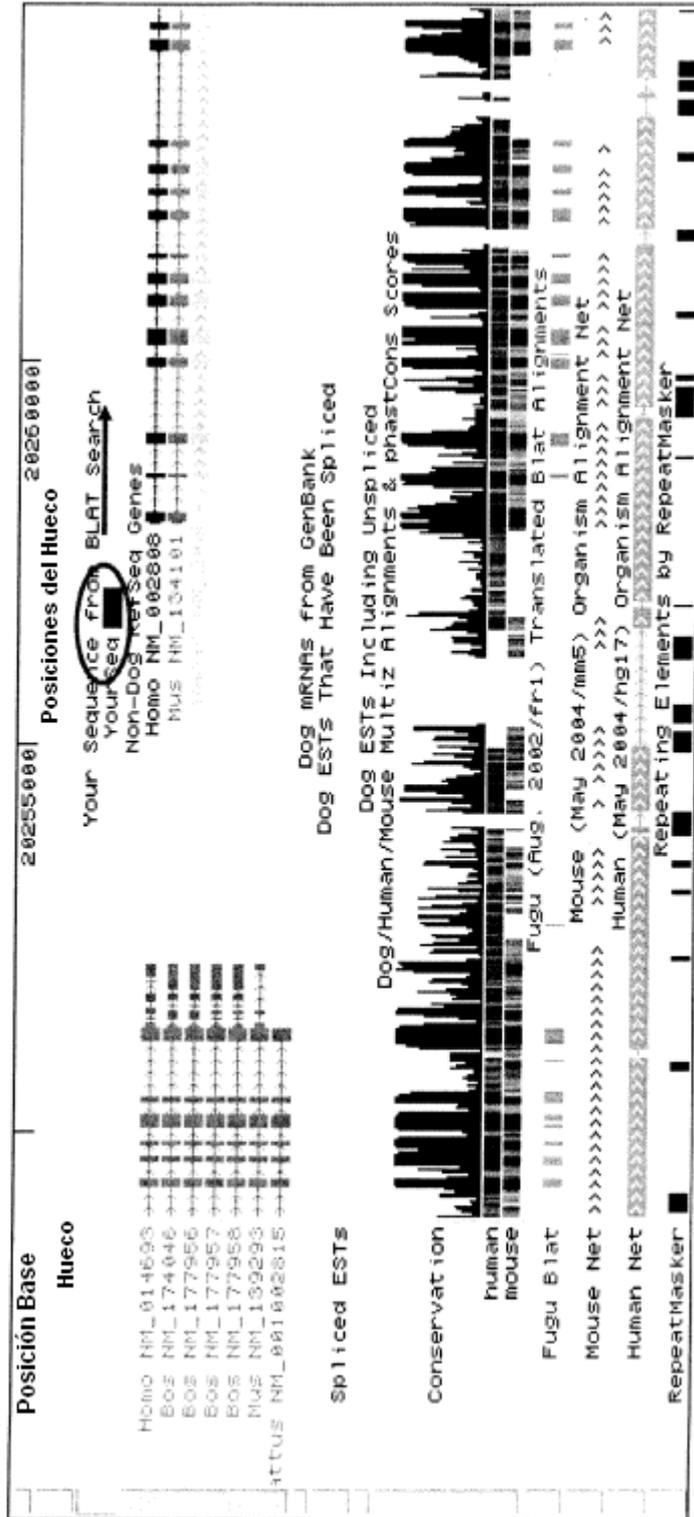


FIG. 3C

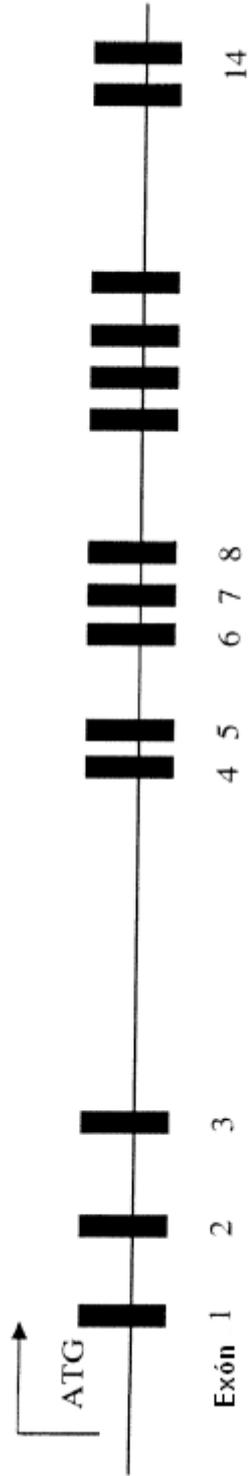


FIG. 4C

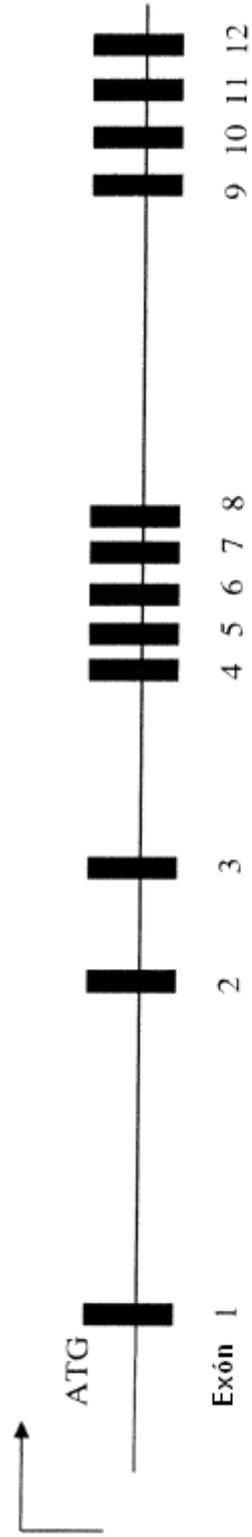
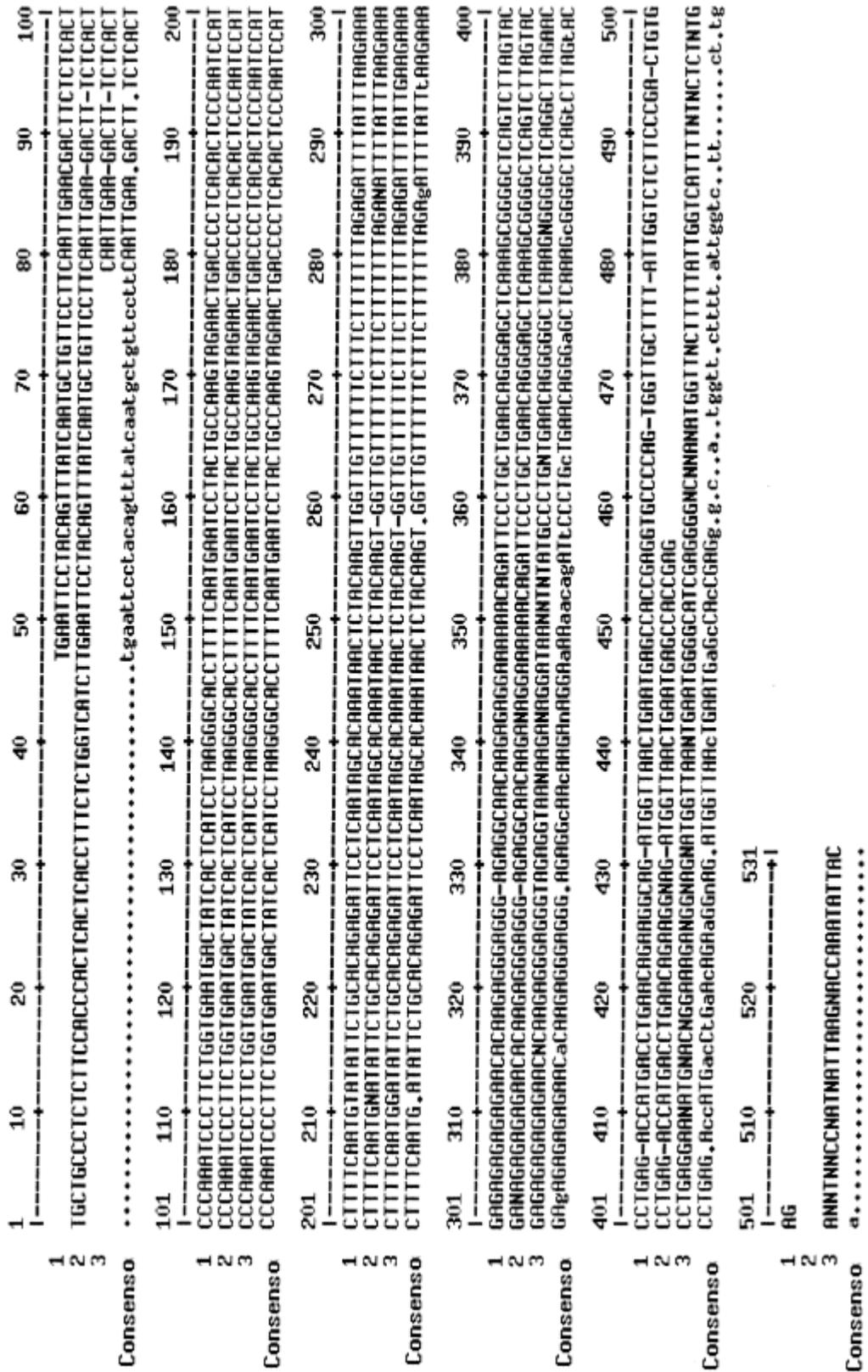


FIG. 5A



Buscador de Genoma de UCSC en la Reunión de Jul. 2004 sobre Perro

mover <<< << < > >> >>> ampliar 1,5x 3x 10x base reducir 1,5x 3x 10x

posición tamaño ancho de imagen:

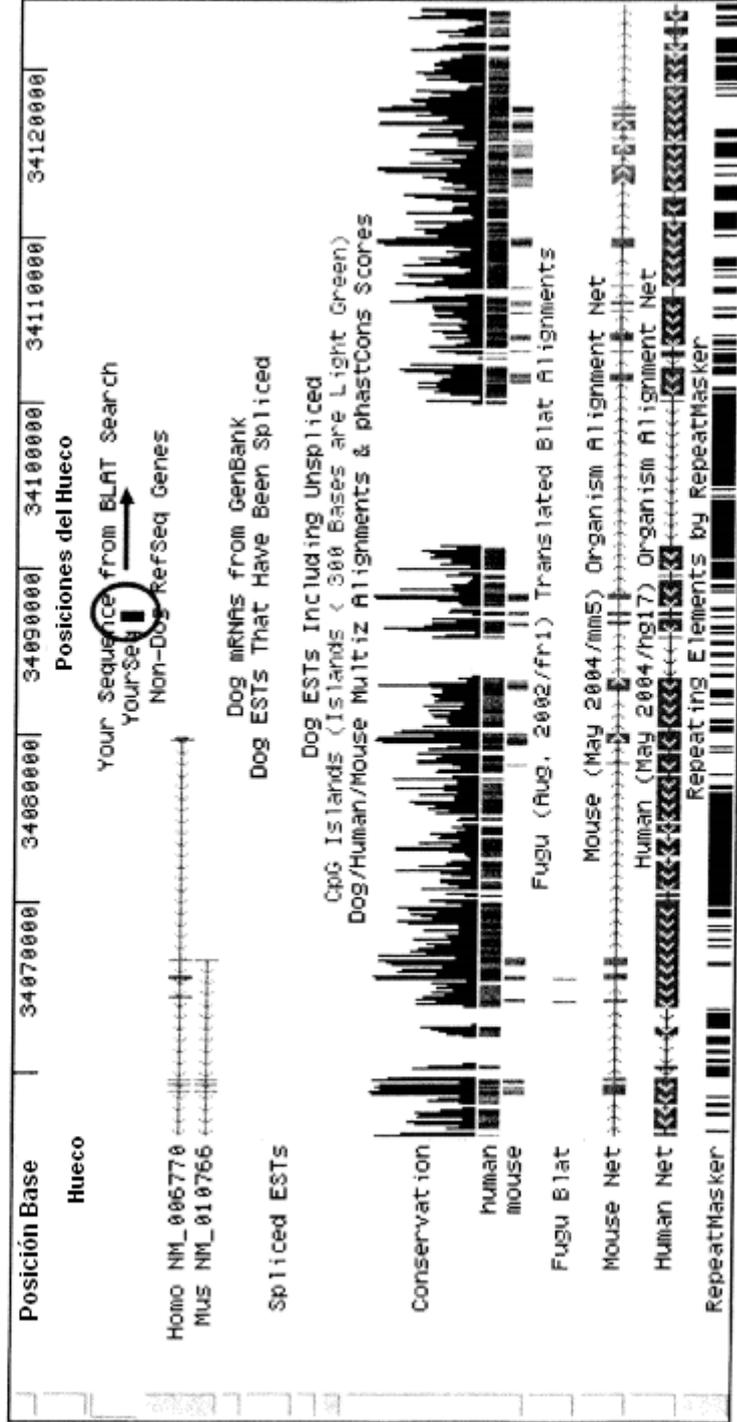


FIG. 5B

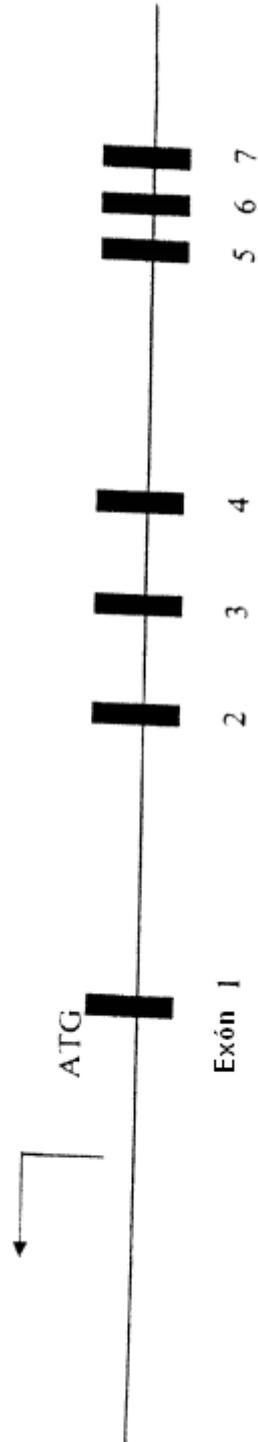


FIG. 5C

FIG. 6B

Buscador de Genoma de UCSC en la Reunión de Jul. 2004 sobre Perro

mover <<< < > >>> ampliar 1,5x 3x 10x base reducir 1,5x 3x 10x

posición chr1:420,722,274-21,321,274 tamaño 599,001 bp. ancho de imagen: 620 salto

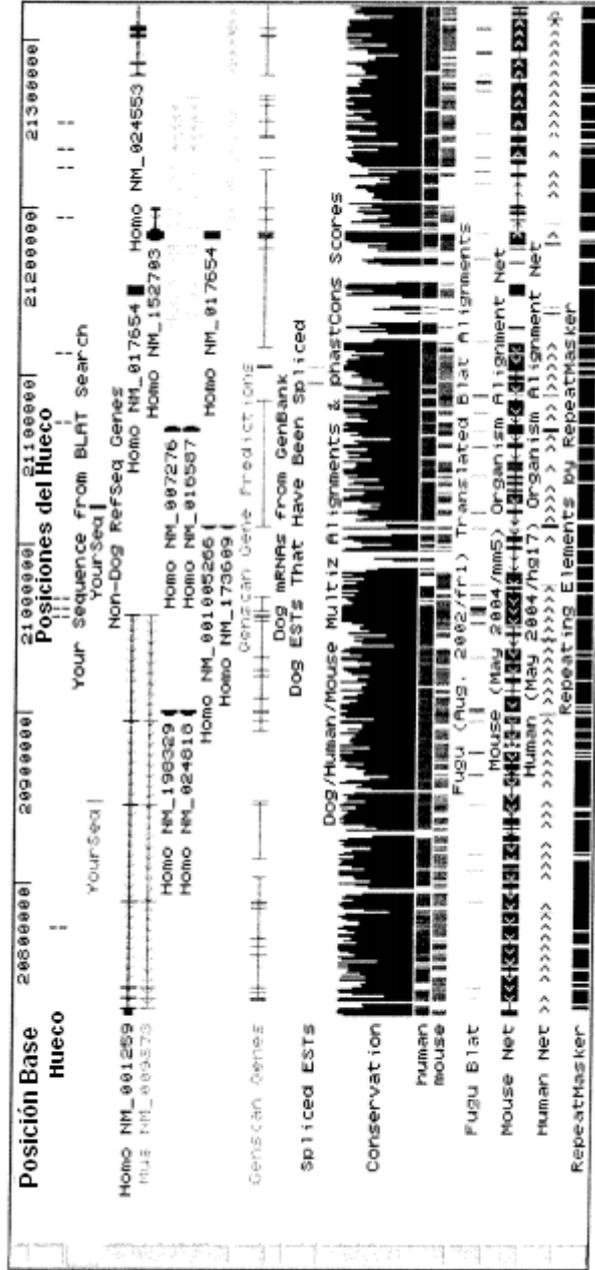


FIG. 6C

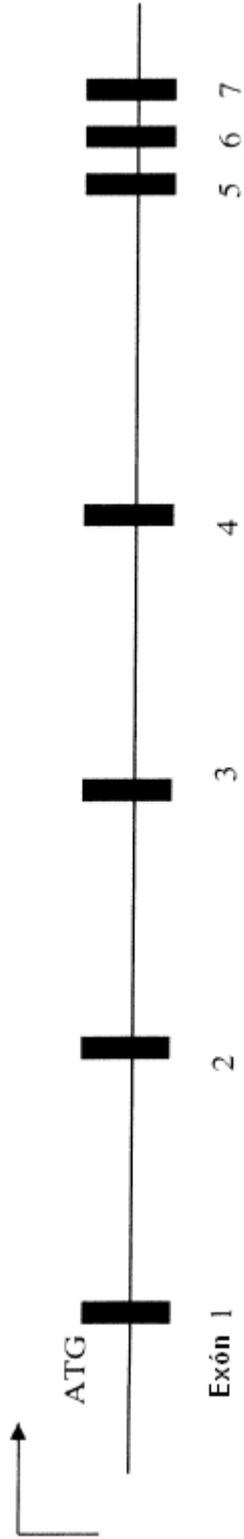
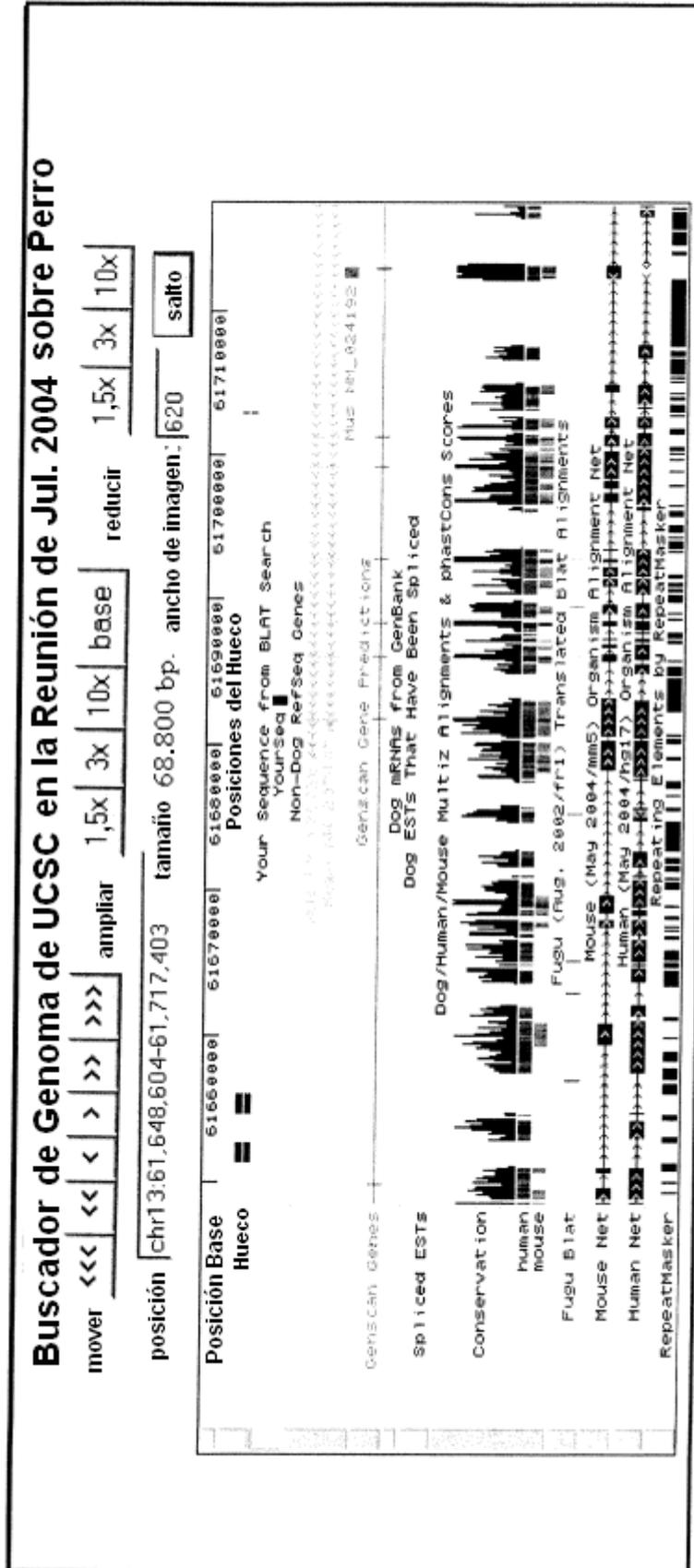


FIG. 7



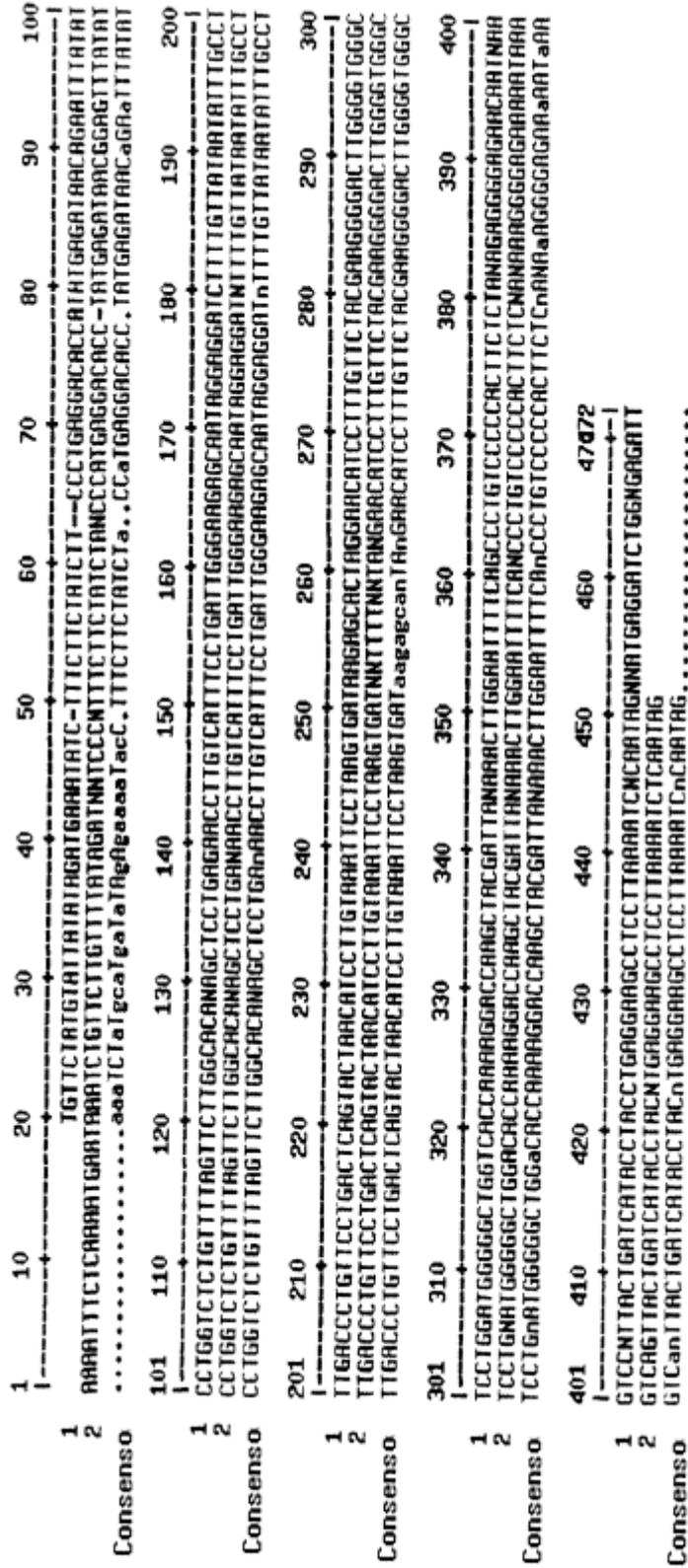


FIG. 8A

Buscador de Genoma de UCSC en la Reunion de Julio 2004 sobre Perro

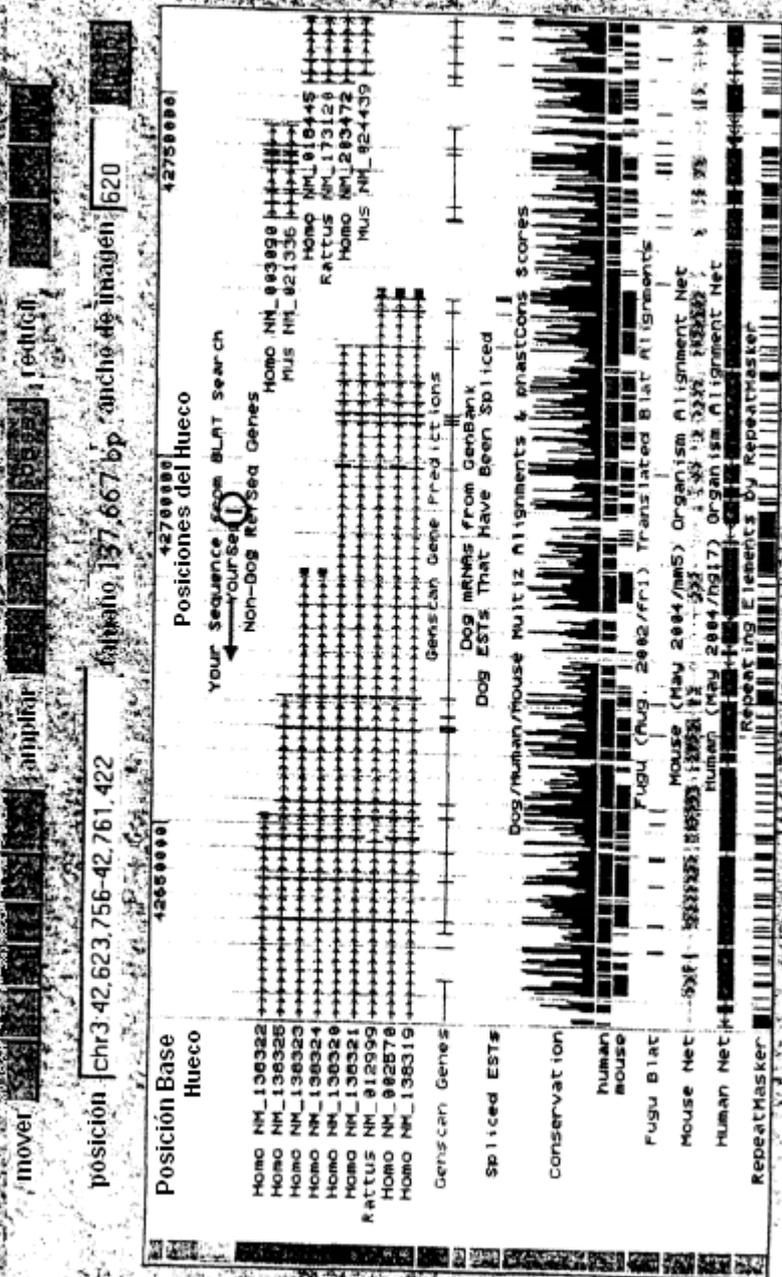


FIG. 8B

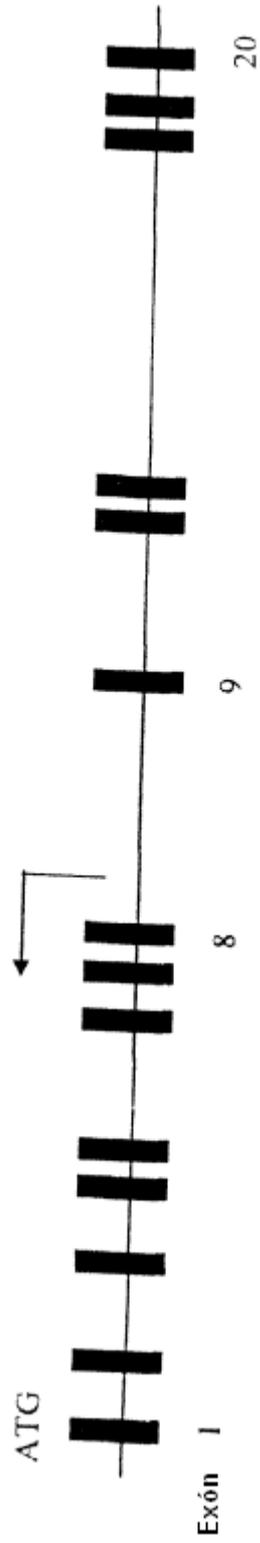


FIG. 8C

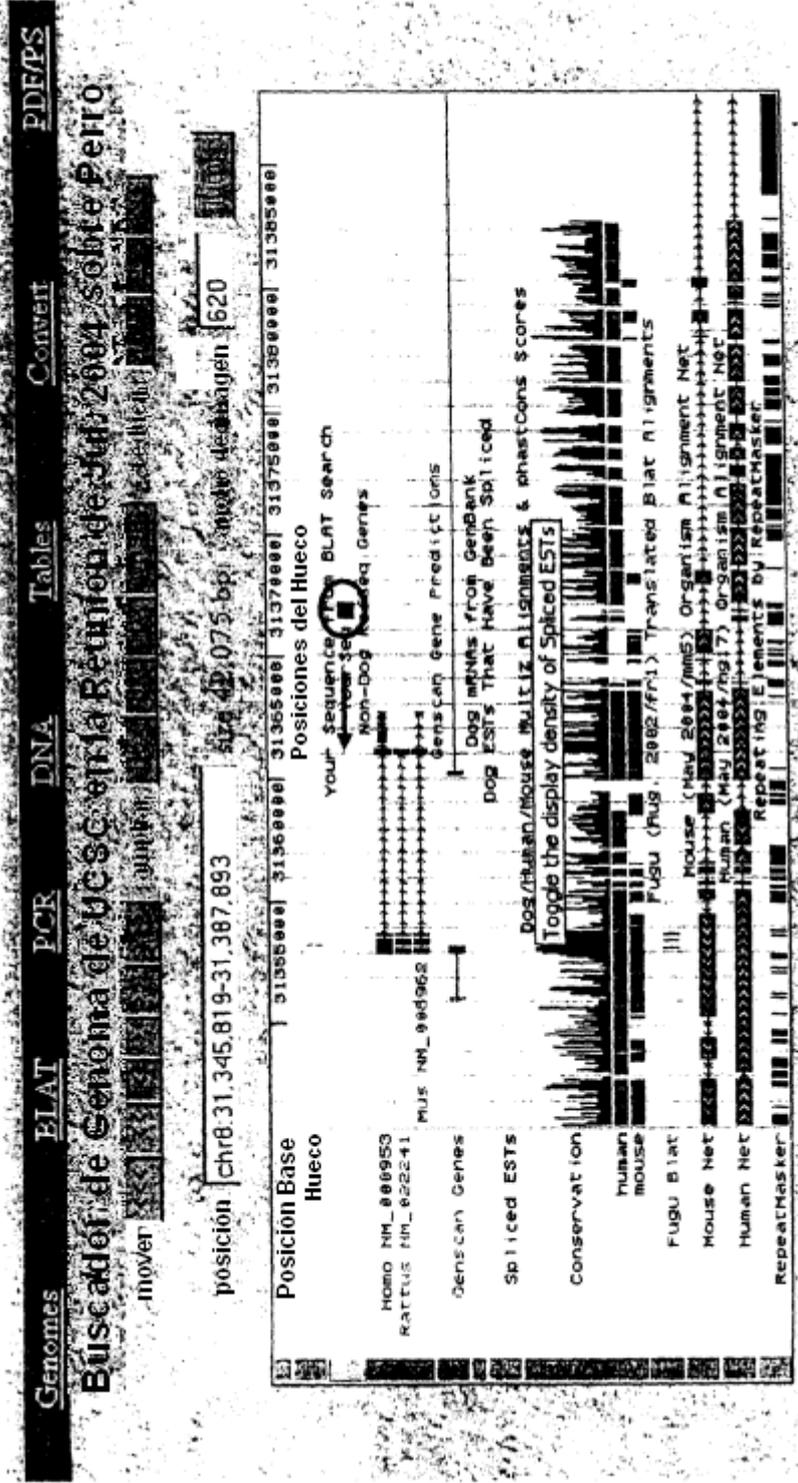


FIG. 9A

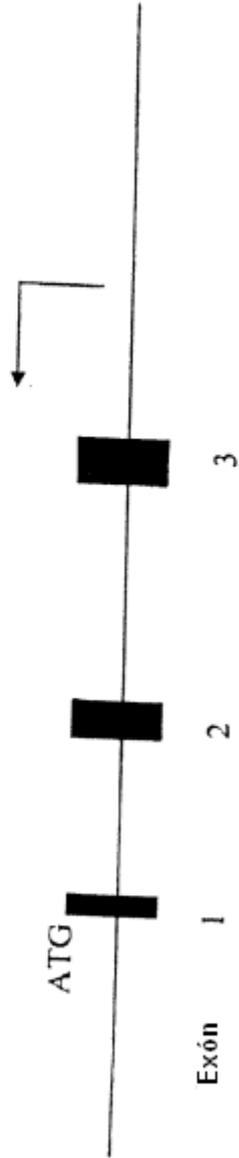


FIG. 9B