

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 316**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11	(2006.01) C07K 16/16	(2006.01)
C12N 15/12	(2006.01) A61K 38/45	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01) C07K 16/40	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01) C12Q 1/48	(2006.01)
C12N 15/85	(2006.01) G01N 33/68	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01) C12N 9/12	(2006.01)
C12N 9/48	(2006.01)	
C12N 5/16	(2006.01)	
C12N 5/22	(2006.01)	
C07H 21/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2007** **E 13184566 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017** **EP 2730654**

54 Título: **Neuquinasa, una proteína corriente abajo de neuregulina**

30 Prioridad:

21.08.2006 US 839388 P
02.04.2007 US 921655 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

**ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE &
TECHNOLOGY, CO., LTD. (100.0%)**
No.68 Ju Li Road Zhangjiang Hi-Tech Park
Shanghai 201203, CN

72 Inventor/es:

ZHOU, MINGDONG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 625 316 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

Neuquinasa, una proteína corriente abajo de neuregulina

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a la neuquinasa, una proteína quinasa corriente abajo en la ruta de señalización de la neuregulina. En algunos aspectos, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican neuquinasa aislados y polipéptidos de neuquinasa, para usar en un método para tratar, prevenir o retrasar un trastorno de disfunción cardíaca. En otros aspectos, la presente invención proporciona métodos de detección de la presencia de neuquinasa, ácido nucleico de neuquinasa, métodos de cribado de agentes que afectan a la actividad de la neuquinasa, y métodos de modulación de la actividad de neuquinasa.

2. Antecedentes de la invención

La insuficiencia cardíaca afecta aproximadamente a cinco millones de estadounidenses, y se diagnostican más de 550.000 nuevos pacientes cada año con la afección. El tratamiento farmacológico actual para la insuficiencia cardíaca se dirige principalmente a inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que son vasodilatadores que hacen que los vasos sanguíneos se expandan, disminuyendo la tensión arterial y reduciendo la carga de trabajo del corazón. Aunque el porcentaje de reducción de mortalidad ha sido significativo, la reducción real de mortalidad con inhibidores ACE se ha promediado en solo 3%-4%, y hay varios potenciales efectos secundarios. Las limitaciones adicionales están asociadas con otras opciones para prevenir o tratar la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, el trasplante de corazón es claramente más caro e invasivo que el tratamiento con fármacos, y además está limitado por la disponibilidad de corazones de donantes. El uso de dispositivos mecánicos, tales como marcapasos biventriculares, son igualmente invasivos y caros. Por lo tanto, son necesarios nuevos tratamientos dadas las deficiencias de los tratamientos actuales.

Un nuevo tratamiento prometedor implica la administración de neuregulina (en lo sucesivo denominada "NRG") a un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Las NRG comprenden una familia de factores de crecimiento y diferenciación estructuralmente relacionados que incluyen NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 e isoformas de los mismos. Por ejemplo, se han identificado más de 15 isoformas distintas de la NRG1 y se han dividido en dos grandes grupos, conocidos como tipos α y β , basado en diferencias en la secuencia de sus dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) esenciales. Se ha mostrado que los dominios de tipo EGF de NRG1, en el intervalo de tamaño de 50 a 64 aminoácidos, son suficientes para unirse a y activar estos receptores. Estudios previos han mostrado que la neuregulina-1 β (NRG-1 β) se puede unir directamente a ErbB3 y ErbB4 con alta afinidad.

Estudios recientes destacan las funciones de NRG-1 β , ErbB2 y ErbB4 en el desarrollo cardiovascular, así como en el mantenimiento de la función cardíaca normal en el adulto. Se ha mostrado que NRG-1 β potencia la organización del sarcómero en cardiomiocitos adultos. La administración a corto plazo de un dominio de tipo EGF de NRG-1 β recombinante mejora significativamente o protege contra el deterioro del rendimiento del miocardio en tres modelos distintos de animales de insuficiencia cardíaca. Lo que es más importante, la NRG-1 β prolonga significativamente la supervivencia de animales que sufren insuficiencia cardíaca. Estos efectos hacen que la NRG-1 β sea prometedora como un fármaco o compuesto candidato de amplio espectro para la insuficiencia cardíaca debida a una variedad de enfermedades comunes.

Sin embargo, son necesarios métodos adicionales para afectar a la transducción de señales de la neuregulina y/o activación de las dianas de señalización de la neuregulina corriente abajo, que se pueden usar en un marco clínico para la prevención, tratamiento o retraso de la insuficiencia cardíaca y/o hipertrofia cardíaca.

3. Compendio de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva proteína quinasa, denominada neuquinasa (*neukinase*), que presenta similitud estructural con la quinasa de la cadena ligera de la miosina del músculo esquelético, y actúa como un componente corriente abajo en la ruta de señalización de la neuregulina. Se ha clonado y secuenciado el ADNc de la neuquinasa, y se ha determinado una secuencia de aminoácidos de la neuquinasa. La proteína reguladora corriente arriba, la neuregulina, potencia la expresión y/o fosforilación de la neuquinasa, que a su vez aumenta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina diana corriente abajo. Puesto que la neuquinasa es altamente expresada en el tejido cardíaco, la presente invención proporciona un nuevo mecanismo subyacente de los efectos profilácticos y terapéuticos de la neuregulina en el corazón, e identifica una nueva diana para tratar la enfermedad cardiovascular.

En lo sucesivo, la referencia a "polipéptidos de la invención" o a "polipéptidos" dentro del alcance de la invención, debe entenderse como una referencia a un polipéptido neuroquinasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

Además, la referencia a "ácido nucleico de la invención" o a "ácido nucleico" dentro del alcance de la invención, debe entenderse como una referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido neuroquinasa que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o a un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4.

5 Además, la referencia al “producto terapéutico de la invención” o “composición farmacéutica de la invención” debe entenderse como una referencia a un producto terapéutico o una composición farmacéutica que comprende el polipéptido o ácido nucleico de la invención para usar en un método de tratamiento, prevención o retraso de un trastorno de la función cardíaca.

10 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente solicitud describe polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido es capaz de fosforilar la cadena ligera de miosina. En otro aspecto, la presente solicitud describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido es capaz de fosforilar la cadena ligera de miosina. El polipéptido aislado es capaz de fosforilar la cadena ligera de miosina de la miosina cardíaca. En particular, el polipéptido aislado es capaz de fosforilar la cadena ligera de miosina de la miosina cardíaca de un mamífero, que incluye, pero no se limita a una rata, ratón o ser humano. El polipéptido aislado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Alternativamente, el polipéptido aislado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El polipéptido aislado de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

20 En otro aspecto, la solicitud describe un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 1. El ácido nucleico aislado puede codificar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Alternativamente, el ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3 o la complementaria de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico aislado puede comprender al menos aproximadamente 500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, o la complementaria de la misma. En particular, el ácido nucleico aislado comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, o la complementaria de la misma.

25 En otro aspecto, la solicitud describe un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 2. El ácido nucleico aislado puede codificar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Alternativamente, el ácido nucleico aislado puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 25. El ácido nucleico aislado de la invención codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. El ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4 o la complementaria de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico aislado puede comprender al menos aproximadamente 500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, o la complementaria de la misma. El ácido nucleico aislado de la invención comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, o la complementaria de la misma.

30 En otro aspecto, la solicitud describe un oligonucleótido aislado que comprende al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3 o su cadena complementaria. En otro aspecto, la solicitud describe un oligonucleótido aislado que comprende al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 4 o su cadena complementaria. El oligonucleótido aislado puede comprender la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

35 En otro aspecto, la solicitud describe un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido codificado es capaz de fosforilar la cadena ligera de miosina. El vector puede comprender al menos aproximadamente 500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. Alternativamente, el vector puede comprender la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el vector comprende al menos aproximadamente 500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el vector comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4. En particular, la secuencia de ácido nucleico de neuquinasa en el vector está operativamente unida a una secuencia reguladora de la transcripción. En algunos casos, el vector se selecciona del grupo que comprende un plásmido, un cósmido, un virus y un bacteriófago. En algunos casos, el vector expresa un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 en una célula transformada con dicho vector. Alternativamente, el vector expresa un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2 en una célula transformada con dicho vector. Para los fines de la invención, el vector expresa un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25 en una célula transformada con dicho vector.

40 En otro aspecto, la solicitud describe una célula hospedante aislada que comprende un ácido nucleico de neuquinasa según la presente invención. Para los fines de la invención, una célula hospedante aislada comprende un vector que expresa la neuquinasa de la invención. En algunos casos, la célula hospedante aislada es un miocito ventricular de rata neonatal. En algunos casos, la célula hospedante aislada es una célula H9c2(2-1).

45 En otro aspecto, la solicitud describe un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El anticuerpo se puede unir específicamente a un polipéptido que

comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Alternativamente, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de neuquinasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, monoclonal monocatenario, recombinante, quimérico, humanizado, de mamífero o humano.

5 En otro aspecto, la solicitud describe un animal transgénico no humano, que expresa un ácido nucleico que codifica el polipéptido de neuquinasa. El animal transgénico no humano que expresa el polipéptido de neuquinasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Alternativamente el animal transgénico no humano que expresa el polipéptido de neuquinasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Para los fines de la invención, el animal transgénico no humano que expresa el polipéptido de neuquinasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En casos particulares, el animal transgénico no humano expresa en exceso o en menor cantidad el polipéptido de neuquinasa. El animal transgénico no humano puede comprender un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 3, o la complementaria de la misma. Alternativamente, el animal transgénico no humano comprende un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 4, o la complementaria de la misma. En algunos casos, el animal transgénico no humano puede ser un mamífero, incluyendo, pero no limitado a un ratón, rata, conejo, hámster u oveja.

20 En otro aspecto, la solicitud describe un animal transgénico no humano cuyas células germinales comprenden una mutación nula homocigótica en la secuencia de ácido nucleico endógena que codifica la neuquinasa, en donde la mutación se crea por inserción, p. ej., de un casete de neomicina, en orientación inversa a la transcripción de neuquinasa y en donde dicha mutación se ha introducido en dicho animal por recombinación homóloga en un citoblasto embrionario de modo que dicho animal no expresa un polipéptido de neuquinasa funcional. En algunos casos, el animal transgénico no humano es fértil y transmite dicha mutación nula a su progenie. En particular, el animal transgénico no humano es un mamífero, incluyendo, pero no limitado a un ratón, rata, conejo, hámster u oveja.

25 La invención proporciona un método in vitro de cribado de agentes que afectan a la actividad de la neuquinasa que comprende: a) administrar dicho agente a una célula que expresa un polipéptido de neuquinasa de la invención; y b) evaluar una actividad biológica de la neuquinasa en la célula. En algunas realizaciones, la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en autoinhibición, fosforilación de la miosina cardiaca y expresión de neuquinasa.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado de agentes que afectan a la actividad de la neuquinasa que comprende: a) administrar dicho agente a un animal transgénico no humano según la presente invención; y b) evaluar en el animal una alteración en la función cardiaca a la que afecte dicho agente. El animal transgénico no humano según la invención expresa o comprende el ácido nucleico de la invención. En algunas realizaciones, la función cardiaca se puede seleccionar del grupo que consiste en el tamaño del tabique interventricular, dimensión diastólica final ventricular izquierda, grosor de la pared posterior, dimensión sistólica final ventricular izquierda, fracción de eyección, acortamiento fraccional, y ciclo cardiaco.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método de detección de la presencia del ácido nucleico de neuquinasa en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de la neuquinasa de la invención; y (b) determinar si el ácido nucleico se une a un ácido nucleico en la muestra.

40 En otro aspecto, la solicitud describe un método para identificar si un sujeto está genéticamente predispuesto a la disfunción cardiaca que comprende, detectar en una muestra biológica del sujeto, un gen de neuquinasa asociado con la disfunción cardiaca. En algunas realizaciones, la disfunción cardiaca es la miocardiopatía hipertrófica o insuficiencia cardiaca.

45 En otro aspecto, la solicitud describe una composición que comprende un polipéptido de neuquinasa de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 25 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 En otro aspecto, la solicitud describe una composición que comprende un ácido nucleico que codifica la neuquinasa de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El polinucleótido puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3. Alternativamente, la composición comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la composición comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 25 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. A veces, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, la solicitud describe un kit que comprende i) un oligonucleótido aislado que comprende al menos 10

nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, o su cadena complementaria; y ii) un recipiente. Alternativamente, el kit contiene el oligonucleótido que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3 o su cadena complementaria.

5 Además, se describe un kit que comprende i) un oligonucleótido aislado que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 4, o su cadena complementaria; y ii) un recipiente. El kit puede contener el oligonucleótido que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 4, o su cadena complementaria.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método in vitro de modulación de la actividad de neuquinasa, que comprende inhibir el dominio autoinhibidor del polipéptido de neuquinasa, con un compuesto que inhibe dicho dominio. En algunas realizaciones, el compuesto es Ca^{2+} /calmodulina.

4. Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el análisis de transferencia Northern de la expresión de ARNm de neuquinasa de rata en tejidos de rata de corazón, cerebro, bazo, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y testículos. La hibridación con una sonda específica de β -actina sirve como un control de carga.

15 La figura 2 muestra el análisis de transferencia Western de la expresión de proteína neuquinasa humana en tejidos humanos de intestino, hígado, corazón, músculo esquelético, pulmón, riñón, útero, bazo y tiroides. La membrana se hibridó con un anticuerpo policlonal anti-neuquinasa de conejo. La hibridación con un anticuerpo anti-GAPDH sirve como un control de carga.

20 La figura 3 muestra los niveles de cadena ligera de miosina reguladora fosforilada (RLC-P) en un ensayo de actividad de neuquinasa sin células. La neuquinasa expresada de forma recombinante y RLC se coincubaron en presencia o ausencia de Ca^{2+} y calmodulina (CaM), $-/+EGTA$. La fosforilación de RLC se evaluó por análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-RLC-P como sonda.

25 La figura 4 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de neuquinasa de rata (r.NK), neuquinasa humana (h.NK) y quinasa de la cadena ligera de miosina esquelética humana (s.MLCK; n° de acceso NP_149109). Los recuadros sombreados oscuros representan restos completamente conservados, los recuadros moderadamente sombreados representan restos iguales, y los recuadros ligeramente sombreados representan restos similares. El dominio catalítico de la serina/treonina proteína quinasa de la quinasa de la cadena ligera de miosina esquelética está subrayado (restos 291-540).

5. Descripción detallada de la invención

30 Esta descripción proporciona, por primera vez, una molécula de ADNc aislada que, cuando se transfecta en células pueden producir proteína neuquinasa. Se cree que la proteína neuquinasa está conectada, entre otros, con la disfunción cardíaca, hipertrofia cardíaca y determinadas formas de miocardiopatía tales como miocardiopatía hipertrófica e hipertrofia ventricular mesocavitaria. Esta descripción proporciona la molécula, la secuencia de nucleótidos de este ADNc y la secuencia de aminoácidos de la proteína neuquinasa codificada por este ADNc.

35 Habiendo proporcionado en la presente memoria la secuencia de nucleótidos del ADNc de neuquinasa, se proporcionan de forma correspondiente las cadenas de ADN complementarias de la molécula de ADNc, y moléculas de ADN que hibridan en condiciones restrictivas con la molécula de ADNc de neuquinasa, o su cadena complementaria. Dichas moléculas de hibridación incluyen moléculas de ADN que difieren solo por cambios de secuencia poco importantes, que incluyen sustituciones, eliminaciones y adiciones de nucleótidos. Esta invención
40 también comprende oligonucleótidos aislados que comprenden al menos una parte de la molécula de ADNc o su cadena complementaria. Estos oligonucleótidos se pueden usar como sondas de hibridación de ADN eficaces o cebadores para usar en la reacción en cadena de la polimerasa. Dichas sondas y cebadores son particularmente útiles en el cribado y diagnóstico de personas con predisposición genética a la miocardiopatía hipertrófica y otras formas de disfunción cardíaca, como resultado de mutaciones del gen de neuquinasa.

45 También se proporcionan el vector de ADN recombinante que comprende las moléculas de ADN descritas, y células hospedantes transgénicas que contienen dichos vectores recombinantes. Las realizaciones descritas también incluyen animales no humanos transgénicos que expresan en exceso o en menor cantidad la proteína neuquinasa, y expresan en exceso o en menor cantidad fragmentos o variantes de la proteína neuquinasa.

50 Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención en lo sucesivo se divide en las siguientes subsecciones. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria ayudan a describir y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

5.1. Definiciones

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las

patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a los que se hace referencia en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad. Si una definición expuesta en esta sección es contraria o discordante de otra forma con una definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se incorporan por referencia en la presente memoria, prevalece la definición expuesta en esta sección frente a la definición que se incorpora por referencia en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una”, y “el”, “la” significan “al menos uno” o “uno o más”, salvo que el contexto dicte claramente otra cosa.

Como se usa en la presente memoria, “neuregulina” o “NRG” usado en la presente invención se refiere a proteínas o péptidos que se pueden unir y activar ErbB2, ErbB3, ErbB4 o combinaciones de los mismos, incluyendo, pero no limitado a todas las isoformas de neuregulina, solo dominio EGF de neuregulina, polipéptidos que comprenden el dominio de tipo EGF de neuregulina, mutantes o derivados de neuregulina, y cualquier clase de productos génicos de tipo neuregulina, que también activan los receptores anteriores como se describe con detalle más adelante. En realizaciones preferidas, la neuregulina usada en la presente invención se une y activa heterodímeros de ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. La neuregulina también incluye proteínas NRG-1, NRG-2, NRG-3, y NRG-4, péptidos, fragmentos y compuestos que imitan las actividades de neuregulina. La neuregulina usada en la presente invención puede activar los receptores de ErbB anteriores y modular sus reacciones biológicas, p. ej., estimular la diferenciación de células de cáncer de mama y secreción de proteínas de la leche; inducir la diferenciación de células de la cresta neural en células de Schwann; estimular la síntesis del receptor de acetilcolina en células de músculo esquelético; y/o mejorar la diferenciación, supervivencia y síntesis de ADN de cardiocitos. La neuregulina también incluye las variantes con sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad biológica. Las sustituciones conservativas adecuadas de aminoácidos son conocidas para los expertos en la técnica y en general se pueden hacer sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocerán que, en general, las sustituciones individuales de aminoácidos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4^a ed., The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 (1987)). La proteína neuregulina abarca una proteína y péptido de neuregulina. El ácido nucleico de neuregulina abarca el ácido nucleico de neuregulina y oligonucleótidos de neuregulina.

Como se usa en la presente memoria, “dominio tipo factor de crecimiento epidérmico” o “dominio tipo EGF” se refiere a un motivo de polipéptido codificado por el gen de la neuregulina que se une a y activa ErbB2, ErbB3, ErbB4 o combinaciones de los mismos, y tiene una similitud estructural con el dominio de unión al receptor de EGF como se describe en el documento WO 00/64400, Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); patentes de EE.UU. n° 5.530.109 y 5.716.930; Hijazi et al., *Int. J. Oncol.*, 13:1061-1067 (1998); Chang et al., *Nature*, 387:509-512 (1997); Carraway et al., *Nature*, 387:512-516 (1997); Higashiyama et al., *J. Biochem.*, 122:675-680 (1997); y documento WO 97/09425, cuyos contenidos se incorporan todos por referencia en la presente memoria. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF se une a y activa los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-1. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos 177-226, 177-237, o 177-240 de NRG-1. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-2. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-3. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-4. En algunas realizaciones, el dominio de tipo EGF comprende la secuencia de aminoácidos de Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro, (SEQ ID NO: 27), como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.834.229.

Como se usa en la presente memoria, “neuquinasa” se refiere a proteínas o péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 25, así como a proteínas que comparten similitud de secuencia, p. ej., un porcentaje de identidad de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o mayor, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 25. Además, estas proteínas tienen una actividad biológica en común con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 25, incluyendo, pero no limitado a reactividad cruzada antigénica, autoinhibición, actividad de fosforilación, y similares. También está contemplado que una proteína neuquinasa puede tener una o más sustituciones, o adiciones o eliminaciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 25, siempre que la proteína que tiene dicha alteración de la secuencia comparta una actividad biológica como se ha descrito antes, con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 25. La neuquinasa también incluye proteínas o péptidos expresados de diferentes mutaciones, diferentes formas de corte y empalme y diferentes polimorfismos de secuencia del gen de la neuquinasa.

Como se usa en la presente memoria, “fragmentos funcionales y variantes de la neuquinasa” se refiere a aquellos fragmentos y variantes que mantienen una o más funciones de neuquinasa. Se reconoce que el gen o ADNc que codifica la neuquinasa puede estar considerablemente mutado sin alterar materialmente una o más de las funciones de neuquinasa. Primero, es bien sabido que el código genético está degenerado, y por lo tanto diferentes codones pueden codificar los mismos aminoácidos. Segundo, incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácido, la

mutación puede ser conservativa y no tiene impacto material en las funciones esenciales de la neuquinasa. Tercero, parte del polipéptido de neuquinasa se puede eliminar sin deteriorar o eliminar todas sus funciones. Cuarto, se pueden hacer inserciones o adiciones en la neuquinasa, por ejemplo, añadiendo marcadores de epítipo, sin deteriorar o eliminar sus funciones. Se pueden hacer otras modificaciones sin deteriorar materialmente una o más funciones de neuquinasa, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas in vivo o in vitro que incorporan aminoácidos inusuales. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, marcaje con radionúclidos, y diferentes modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Se conoce en la técnica una variedad de métodos para el marcaje de proteínas y sustituyentes o marcadores útiles para dichos fines, e incluyen isótopos radiactivos tales como ligandos que se unen a antiligandos marcados (p. ej. anticuerpos), fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y antiligandos. Los fragmentos funcionales y las variantes pueden ser de longitudes que varían. Por ejemplo, algunos fragmentos tienen al menos 10, 25, 50, 75, 100, o 200 o más restos de aminoácidos.

Como se usa en la presente memoria, la “cadena ligera de miosina” se refiere a una proteína de aproximadamente 18 kDa que se asocia con la cadena pesada de miosina y participa en la regulación de la actividad de ATPasa generadora de fuerza de la miosina. Hay dos agrupamientos principales de MLC: MLC1, a veces denominada cadena ligera de miosina esencial, abreviada ELC; y MLC2, a veces denominada cadena ligera de miosina reguladora, abreviada RLC. La RLC es la diana biológica principal de la fosforilación mediada por la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Cuando es fosforilada por la MLCK, la forma fosforilada de la RLC se abrevia RLC-P. Se han descrito isoformas de ELC y RLC que existen en músculo esquelético, liso y cardíaco. Como un ejemplo, el gen de la RLC cardíaca humana y el ADNc son descritos por Macera et al., *Genomics* 13: 829-31 (1992); (nº de acceso en GenBank NM00432).

Como se usa en la presente memoria, un “fragmento funcional o variante de la cadena ligera de miosina” se refiere a un polipéptido que es capaz de ser fosforilado por una proteína que tiene la actividad biológica de la quinasa de la cadena ligera de miosina. Incluye cualquier polipéptido de seis o más restos de aminoácidos de longitud, que es capaz de ser fosforilado por una proteína que tiene actividad biológica de quinasa de la cadena ligera de miosina.

Como se usa en la presente memoria, la “actividad biológica de quinasa de la cadena ligera de miosina” se refiere a la capacidad enzimática in vitro o in vivo de un polipéptido o proteína para mediar la incorporación covalente de un fosfato en una cadena ligera de miosina reguladora. El término abarca dicha actividad enzimática observada con cualquier isoforma de MLCK (por ejemplo, isoformas de MLCK de músculo liso, músculo esquelético y cardíaco), así como dicha actividad enzimática observada con fragmentos y variantes de isoformas de MLCK (por ejemplo, mutantes que se encuentran de forma natural; mutaciones, inserciones y eliminaciones introducidas por técnicas de ADN recombinantes; y fragmentos generados por proteólisis).

Como se usa en la presente memoria, “proteína” es sinónimo de “polipéptido” o “péptido” salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usa en la presente memoria, un “gen de neuquinasa” se refiere a un gen que codifica la neuquinasa como se define en la presente memoria. Una mutación del gen de neuquinasa incluye cambios, adiciones o eliminaciones en la secuencia de nucleótidos, incluyendo la eliminación de partes largas o del gen de neuquinasa entero, o duplicaciones de todos o sustancialmente todos los genes. Alternativamente, la expresión genética de la neuquinasa puede ser desregulada de modo que la neuquinasa sea expresada en exceso o en menor cantidad. La expresión “gen de neuquinasa” se entiende que incluye los diferentes polimorfismos de secuencia y variaciones alélicas que existen dentro de la población. Esta expresión se refiere principalmente a una secuencia codificante aislada, pero también puede incluir algunos o todos los elementos reguladores flanqueadores y/o secuencias de intrones. El ARN transcrito a partir del gen de neuquinasa mutante es una ARN mensajero de neuquinasa mutante.

Como se usa en la presente memoria, “ADNc de neuquinasa” se refiere a una molécula de ADNc que, cuando es transfectada o introducida de otra forma en células, expresa la proteína neuquinasa. El ADNc de neuquinasa se puede obtener, por ejemplo, por transcripción inversa a partir del ARNm codificado por el gen de neuquinasa y carece de segmentos no codificantes internos y secuencias reguladoras de la transcripción presentes en el gen de neuquinasa. Un ADNc de neuquinasa humana de ejemplo se muestra en la SEQ ID NO: 4.

Como se usa en la presente memoria, “vector” se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ADN heterólogo en células para la expresión o replicación del mismo. La selección y uso de dichos vehículos es bien conocido para el experto en la técnica. Un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar el ADN que está operativamente unido con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de llevar a cabo la expresión de dichos fragmentos de ADN. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula hospedante adecuada, produce la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen los que son replicables en células eucariotas y/o procariotas y los que permanecen episomales o los que se integran en el genoma de la célula hospedante.

Como se usa en la presente memoria, “animales transgénicos” se refiere a animales no humanos, preferiblemente

mamíferos, más preferiblemente roedores tales como ratas o ratones, en los que una o más de las células incluyen un transgén. Otros animales transgénicos incluyen primates, ovejas, conejos, hámsteres, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios, etc. Un “transgén” es ADN exógeno que es integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico, y que permanece en el genoma del animal maduro.

- 5 Como se usa en la presente memoria, un “animal recombinante homólogo” se refiere a un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un roedor tal como una rata o ratón, en la que el gen de neuquinasa endógeno se ha alterado mediante una molécula de ADN exógena que se recombina homológamente con la neuquinasa endógena en una célula (p. ej., embrionaria) antes del desarrollo del animal. Otros animales recombinantes homólogos incluyen conejos, hámsteres y ovejas. Las células hospedantes con neuquinasa exógena se pueden usar para producir animales transgénicos no humanos, tales como ovocitos fertilizados o citoblastos embrionarios en los que se han introducido secuencias codificantes de neuquinasa. Dichas células hospedantes después se pueden usar para crear animales transgénicos no humanos o animales recombinantes homólogos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “muestra biológica” incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto.

- 15 Como se usa en la presente memoria, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o citada en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales, y más en particular en seres humanos.

- 20 Como se usa en la presente memoria, el término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo, con el que se administra un fármaco de la invención. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

Como se usa en la presente memoria, “fracción de eyección” o “FE” significa la parte de sangre que es bombeada fuera de un ventrículo izquierdo (VI) lleno como resultado de un latido del corazón. Se puede definir por la siguiente fórmula: (volumen diastólico del VI - volumen sistólico del VI) / volumen diastólico del VI.

- 25 Como se usa en la presente memoria, “acortamiento fraccional” o “AF” significa una relación del cambio en el diámetro del ventrículo izquierdo entre los estados contraído y relajado. Se puede definir mediante la siguiente fórmula: (diámetro diastólico final del VI - diámetro sistólico final del VI) / diámetro diastólico final del VI.

- 30 Como se usa en la presente memoria, “insuficiencia cardiaca” significa una anomalía de la función cardiaca donde el corazón no bombea sangre a la velocidad necesaria para los requisitos de los tejidos metabolizadores. La insuficiencia cardiaca incluye una amplia variedad de enfermedades tales como la insuficiencia cardiaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmias, miocardiopatía hipertrófica familiar, enfermedad cardiaca isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares. La insuficiencia cardiaca puede ser causada por cualquier serie de factores, incluyendo, sin limitación, formas isquémica, congénita, reumática o idiopática. La hipertrofia cardiaca crónica es un estado patológico significativo que es un precursor de la insuficiencia cardiaca congestiva y paro cardiaco.

Como se usa en la presente memoria, “infarto de miocardio” se refiere a un bloqueo de una arteria coronaria o interrupción del flujo sanguíneo que conduce a necrosis focal de parte del miocardio causada por isquemia grave y persistente.

- 40 Como se usa en la presente memoria, “hipertrofia de células musculares ventriculares” es sinónimo de hipertrofia cardiaca y se refiere a una afección caracterizada por un aumento del tamaño de las células musculares ventriculares individuales, siendo suficiente el aumento del tamaño de las células para dar como resultado un diagnóstico clínico del paciente o suficiente para permitir determinar que las células son más grandes (p. ej., 2 veces o más mayores que las células no hipertroficadas). Puede ir acompañado de la acumulación de proteínas contráctiles dentro de células cardiacas individuales y activación de la expresión de genes embrionarios. Los expertos en la técnica conocen métodos in vitro e in vivo para determinar la presencia de la hipertrofia de células musculares ventriculares. Los ensayos in vitro para la hipertrofia de células musculares ventriculares incluyen los métodos descritos en la presente memoria, p. ej., mayor tamaño de las células y mayor expresión del factor natriurético auricular (ANF). Los cambios en el tamaño de las células se usan en un sistema de puntuación para determinar la extensión de la hipertrofia. Estos cambios se pueden ver con un microscopio de fase invertida, y puntuar el grado de hipertrofia con una escala arbitraria de 7 a 0, siendo 7 células totalmente hipertrofiadas, y siendo 3 células no estimuladas. Los estados 3 y 7 se pueden ver en Simpson et al., *Circulation Res.* 51: 787-801 (1982), Figura 2, A y B, respectivamente. Se ha determinado que la correlación entre la puntuación de la hipertrofia y el área superficial de la célula (μm^2) es lineal (coeficiente de correlación = 0,99). En la hipertrofia inducida por fenilefrina, las células no expuestas (normales) tienen una puntuación de hipertrofia de 3 y un área superficial/célula de $581 \mu\text{m}^2$, y las células totalmente hipertrofiadas tienen una puntuación de hipertrofia de 7 y un área superficial/célula de $1811 \mu\text{m}^2$, o aproximadamente 200% de la normal. Las células con una puntuación de hipertrofia de 4 tienen un área superficial/célula de $771 \mu\text{m}^2$, o aproximadamente 30% mayor tamaño que las células no expuestas; las células con una puntuación de hipertrofia de 5 tienen un área superficial/célula de $1109 \mu\text{m}^2$, o aproximadamente 90% mayor

5 tamaño que las células no expuestas; y las células con una puntuación de hipertrofia de 6 tienen un área superficial/célula de $1366 \mu\text{m}^2$, o aproximadamente 135% mayor tamaño que las células no expuestas. La presencia de hipertrofia de células musculares ventriculares incluye células que presentan un tamaño mayor en aproximadamente 15% (puntuación de hipertrofia 3,5) o más. Los inductores de hipertrofia varían en su capacidad para inducir una respuesta hipertrófica máxima puntuada por el ensayo descrito antes. Por ejemplo, el aumento máximo del tamaño celular inducido por la endotelina es aproximadamente una puntuación de hipertrofia de 5.

10 Como se usa en la presente memoria, la "supresión" de la hipertrofia de células musculares ventriculares significa una reducción en uno de los parámetros que indican hipertrofia con respecto al estado hipertrófico, o una prevención de un aumento en uno de los parámetros que indican hipertrofia con respecto al estado normal. Por ejemplo, la supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares se puede medir como una reducción del tamaño celular con respecto al estado hipertrófico. La supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares significa una disminución del tamaño celular de 10% o mayor con respecto al observado en el estado hipertrófico. Más preferiblemente, la supresión de la hipertrofia significa una disminución del tamaño celular de 30% o mayor; lo más preferiblemente, la supresión de la hipertrofia significa una disminución del tamaño celular de 50% o mayor.

15 Con respecto al ensayo de puntuación de la hipertrofia cuando se usa fenilefrina como agente inductor, estas disminuciones se correlacionarían con puntuaciones de 6,5 o menos, 5,0-5,5, y 4,0-5,0, respectivamente. Cuando se usa un agente diferente como el agente inductor, la supresión se mide con respecto al tamaño máximo de la célula (o puntuación hipertrófica) medida en presencia de ese inductor.

20 La prevención de la hipertrofia de células musculares ventriculares se puede determinar mediante la prevención de aumento del tamaño celular con respecto a las células normales, en presencia de una concentración de inductor suficiente para inducir hipertrofia completamente. Por ejemplo, la prevención de la hipertrofia significa un aumento del tamaño celular de menos de 200% mayor que las células no inducidas en presencia de concentración estimuladora máxima de inductor. Más preferiblemente, la prevención de la hipertrofia significa un aumento del tamaño celular de menos de 135% mayor que las células no inducidas; y lo más preferiblemente, la prevención de la hipertrofia significa un aumento del tamaño celular de menos de 90% mayor que las células no inducidas.

25 Con respecto al ensayo de puntuación de la hipertrofia, cuando se usa fenilefrina como el agente inductor, la prevención de la hipertrofia en presencia de una concentración estimuladora máxima significa una puntuación hipertrófica de aproximadamente 6,0-6,5, 5,0-5,5, y 4,0-4,5, respectivamente.

30 La determinación in vivo de la hipertrofia incluye la medición de parámetros cardiovasculares tales como la presión sanguínea, ritmo cardiaco, resistencia vascular sistémica, contractilidad, fuerza del latido cardiaco, hipertrofia concéntrica o dilatada, presión sistólica ventricular izquierda, presión media ventricular izquierda, presión diastólica final ventricular izquierda, gasto cardiaco, índice de accidente cerebrovascular, parámetros histológicos, y tamaño ventricular y grosor de la pared. Los modelos animales disponibles para determinar el desarrollo y la supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares in vivo, incluyen el modelo de ratón de presión-sobrecarga, modelo disfuncional murino de RV, modelo de ratón transgénico, y modelo de rata de postinfarto de miocardio. Se conocen métodos médicos para evaluar la presencia, desarrollo y supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares en pacientes humanos, e incluyen, por ejemplo, mediciones de parámetros diastólicos y sistólicos, cálculos de la masa ventricular y flujos de venas pulmonares.

35

40 Como se usa en la presente memoria, una "cantidad eficaz" de un agente activo para tratar una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para mejorar, en reducir de alguna forma los síntomas asociados con la enfermedad. La cantidad puede curar la enfermedad, pero típicamente se administra con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad.

45 Como se usa en la presente memoria, "agente activo" significa cualquier sustancia dirigida al diagnóstico, cura, alivio, tratamiento o prevención de enfermedad en seres humanos y otros animales, para potenciar de otra forma el bienestar físico y mental.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en la presente memoria para significar en general obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado en un sujeto que padece activamente una afección. El efecto puede tratar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y por lo tanto puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad.

50 "Tratamiento" como se usa en la presente memoria cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular un ser humano, e incluye inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar la enfermedad, es decir, producir el retroceso de la enfermedad. En un ejemplo, el tratamiento se refiere a tratar pacientes con, o con riesgo de desarrollar una enfermedad cardiaca y afecciones relacionadas, p. ej., insuficiencia cardiaca. Más específicamente, se pretende que "tratamiento" signifique proporcionar un efecto terapéuticamente detectable y beneficioso en un paciente que padece una enfermedad cardiaca.

55

Los términos "prevenir", "prevención" y similares, se usan en la presente memoria para referirse en general a prevenir que aparezca una enfermedad en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad pero que todavía no se le ha diagnosticado que padezca la enfermedad. Por lo tanto, "prevenir" se puede referir a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la hipertrofia cardiaca.

5.2. Polipéptidos de la invención

La presente solicitud describe polipéptidos recién identificados y aislados a los que se refiere la presente solicitud como neuquinasa de rata y neuquinasa humana, respectivamente. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos de neuquinasa de rata de secuencia natural y humana de secuencia natural. En algunas realizaciones, los polipéptidos pueden comprender sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que las encontradas en las secuencias de neuquinasa naturales. La solicitud describe secuencias de aminoácidos de fragmentos funcionales y variantes de neuquinasa que comprenden un determinante antigénico (es decir, una parte de un polipéptido que puede ser reconocida por un anticuerpo) o que son funcionalmente activos de otra forma, así como ácidos nucleicos que codifican los anteriores. La actividad funcional de la neuquinasa abarca una o más actividades funcionales asociadas con un polipéptido de neuquinasa de longitud completa (de tipo natural), actividad biológica de la quinasa de la cadena ligera de miosina; antigenicidad (la capacidad para ser unido por un anticuerpo a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2); inmunogenicidad (la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo que se une a las SEQ ID NO: 1 o 2), etc.

Los polipéptidos pueden comprender las secuencias de aminoácidos que tienen sustituciones de aminoácidos funcionalmente inconsecuentes, y por lo tanto tienen secuencias de aminoácidos que difieren de la de la secuencia de neuquinasa natural. Las sustituciones se pueden introducir por mutación en secuencias de ácidos nucleicos que codifican la neuquinasa, que producen alteraciones en las secuencias de aminoácidos de la neuquinasa codificada, pero no alteran la función de neuquinasa. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos “no esenciales”, en secuencias que codifican la neuquinasa. Un resto de aminoácido “no esencial” es un resto que se puede alterar de la secuencia de tipo natural de neuquinasa sin alterar la actividad biológica de quinasa de la cadena ligera de miosina, mientras que un resto de aminoácido “esencial” es necesario para dicha actividad biológica. Por ejemplo, los restos de aminoácidos que son conservados entre los polipéptidos de neuquinasa de la invención se predice que en particular no son adecuados para la alteración. Los aminoácidos para los que se pueden hacer sustituciones conservativas son bien conocidos en la técnica.

Las sustituciones conservativas útiles se muestran en la tabla 1, “Sustituciones preferidas”. Sustituciones conservativas por las que un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido del mismo tipo, están dentro del alcance de la presente invención siempre que la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, indicados en la tabla 2 como ejemplo, y se criban los productos con actividad biológica del polipéptido de neuquinasa.

Tabla 1 Sustituciones preferidas		
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala

Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

5 Sustituciones no conservativas que afectan a: (1) la estructura de la cadena principal del polipéptido, tal como una conformación en lámina β o hélice α ; (2) la carga; (3) hidrofobicidad; o (4) el volumen de la cadena lateral en el sitio diana, pueden modificar la función del polipéptido neuquinasa o la identidad inmunológica. Los restos se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral, como se indica en la tabla 2. Las sustituciones no conservativas implican intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones se pueden introducir en sitios de sustituciones conservativas o más preferiblemente en sitios no conservados.

Tabla 2	
Clases de aminoácidos	
Clase	Aminoácidos
hidrófobo	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
hidrófilo neutro	Cys, Ser, Thr
ácido	Asp, Glu
básico	Asn, Gln, His, Lys, Arg
altera la conformación de la cadena	Gly, Pro
aromático	Trp, Tyr, Phe

10 Se pueden hacer variantes de polipéptidos usando métodos conocidos en la materia tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (véase, Carter, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Zoller y Smith, *Methods Enzymol.* 154:329-50 (1987)), mutagénesis de casete, mutagénesis de selección por restricción (Wells et al., *Gene* 34:315-323 (1985)) u otras técnicas conocidas, se pueden llevar a cabo en ADN que codifica la neuquinasa clonada para producir ADN variante de neuquinasa (Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (edición actual);
 15 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001).

20 La neuquinasa puede incluir mutantes o derivados de neuquinasa que tienen una sustitución de aminoácido con un aminoácido no clásico o análogo de aminoácido químico. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cistéico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos diseñados tales como β -metil-aminoácidos, α -metil-aminoácidos, $N\alpha$ -metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

25 En un aspecto, la presente solicitud describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 1. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% con la SEQ ID NO: 1. En particular, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

30 La presente solicitud también describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 2. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% con la SEQ ID NO: 2. En particular, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

La presente solicitud también describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 25. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% con la SEQ ID NO: 25. Para los

finde de la invención, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

El porcentaje de identidad en este contexto significa el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, los restos de aminoácidos en una posición dada en el alineamiento son el mismo resto) o similares (es decir, la sustitución de aminoácido en una posición dada en el alineamiento es una sustitución conservativa como se ha descrito antes), a los correspondientes restos de aminoácidos en el péptido después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología de secuencia. En algunas realizaciones, un homólogo de neuquinasa se caracteriza por su porcentaje de identidad de secuencia o porcentaje de similitud de secuencia con la secuencia de neuquinasa que se encuentra de forma natural. La homología de secuencia, incluyendo porcentajes de identidad y similitud de secuencia, se determina usando técnicas de alineamiento de secuencias bien conocidas en la materia, preferiblemente algoritmos de ordenador diseñados para este fin, que usan parámetros por defecto de dichos algoritmos de ordenador o paquetes de programas que los contienen.

Los ejemplos no limitantes de algoritmos de ordenador y paquetes de programas que incorporan dichos algoritmos incluyen los siguientes. La familia de programas BLAST ilustra un ejemplo no limitante preferido, ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos secuencias (p. ej., Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268 (modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877), Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, (describen NBLAST y XBLAST), Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (describen Gapped BLAST, y PSI-Blast). Otro ejemplo preferido es el algoritmo de Myers y Miller (1988 CABIOS 4:11-17) que está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) y está disponible como parte del paquete de programas de alineamiento de secuencias GCG. También se prefiere el programa FASTA (Pearson W.R. y Lipman D.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988), disponible como parte del Wisconsin Sequence Analysis Package. Ejemplos adicionales incluyen BESTFIT, que usa el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489, 1981) para encontrar la mejor región individual de similitud entre dos secuencias y que es preferido donde las dos secuencias que se están comparando son distintas de longitud; y GAP, que alinea dos secuencias encontrando una "similitud máxima" de acuerdo con el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443-354, 1970), y es preferido donde las dos secuencias son de aproximadamente la misma longitud y se espera un alineamiento a lo largo de toda la longitud.

Los ejemplos de homólogos pueden ser proteínas ortólogas de otras especies incluyendo animales, plantas, levaduras, bacterias y similares. Los homólogos también se pueden seleccionar, p. ej. por mutagénesis en una proteína natural. Por ejemplo, los homólogos se pueden identificar por mutagénesis específica del sitio en combinación con ensayos para detectar las interacciones proteína-proteína. Métodos adicionales, p. ej., cromatografía de afinidad de proteínas, transferencia de afinidad, ensayos de unión in vitro, y similares, serán evidentes para los expertos en la técnica informados de la presente invención.

Para el propósito de comparar dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido diferentes, una secuencia (secuencia de ensayo) se puede describir que es un "tiene un porcentaje específico de identidad" con otra secuencia (secuencia de referencia) en la presente invención. En relación con esto, cuando la longitud de la secuencia de ensayo es menor de 90% de la longitud de la secuencia de referencia, el porcentaje de identidad se determina por el algoritmo de Myers y Miller, *Bull. Math. Biol.*, 51:5-37 (1989) y Myers y Miller, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):11-17 (1988). Específicamente, la identidad se determina por el programa ALIGN. Se pueden usar los parámetros por defecto.

Cuando la longitud de la secuencia de ensayo es al menos 90% de la longitud de la secuencia de referencia, el porcentaje de identidad se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-77 (1993), que está incorporado en varios programas BLAST. Específicamente, el porcentaje de identidad se determina mediante la herramienta "BLAST 2 Sequences". Véase Tatusova y Madden, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174(2):247-250 (1999). Para la comparación de parejas de ADN-ADN, se usa el programa BLASTN 2.1.2 con los parámetros por defecto (Correspondencia: 1; Mala correspondencia: -2; Apertura de hueco: 5 penalizaciones; extensión de hueco: 2 penalizaciones; gap x_dropoff: 50; esperado: 10; y tamaño de palabra: 11, con filtro). Para la comparación de parejas de secuencias de proteína-proteína, se usa el programa BLASTP 2.1.2 usando los parámetros por defecto (Matriz: BLOSUM62; apertura de hueco: 11; extensión de hueco: 1; x_dropoff: 15; esperado: 10.0; y tamaño de palabra: 3, con filtro).

Los polipéptidos aislados usados en la presente invención son capaces de fosforilar la cadena ligera de miosina de la miosina cardiaca. En algunos casos, los polipéptidos aislados usados en la presente invención son capaces de fosforilar un fragmento funcional o variante de la cadena ligera de miosina de la miosina cardiaca. En algunos casos, los polipéptidos aislados son capaces de fosforilar la cadena ligera de miosina, o un fragmento funcional o variantes de la cadena ligera de miosina, de la miosina cardiaca de un mamífero. El mamífero puede ser una rata, ratón o ser humano. En algunos casos, los polipéptidos aislados son capaces de fosforilar la cadena ligera de miosina, o fragmentos funcionales o variantes de la cadena ligera de miosina, de la miosina cardiaca de rata. En algunos casos, los polipéptidos aislados son capaces de fosforilar la cadena ligera de miosina, o fragmentos funcionales o variantes de la cadena ligera de miosina, de la miosina cardiaca de ratón. En casos particulares, los polipéptidos aislados son capaces de fosforilar la cadena ligera de miosina, o fragmentos funcionales o variantes de la cadena ligera de miosina, de la miosina cardiaca humana.

Los polipéptidos aislados usados en la presente invención son capaces de unirse a, y pueden ser activados por Ca^{2+} /calmodulina. Sin querer estar ligados por ninguna teoría particular de operación, se cree que la activación de las quinasas de la cadena ligera de miosina implica la unión de Ca^{2+} /calmodulina a una secuencia de unión de la calmodulina en un segmento regulador conservado del polipéptido, que también contiene una secuencia autoinhibidora. La unión de Ca^{2+} /calmodulina elimina la secuencia autoinhibidora del núcleo catalítico del polipéptido, en donde el sitio activo está expuesto para la unión del sustrato proteína y fosforilación. Por consiguiente, en algunos aspectos, la presente invención proporciona polipéptidos aislados que tienen las propiedades anteriores.

5.3. Ácidos nucleicos de la invención

En otro aspecto, la presente solicitud describe secuencias de nucleótidos recién identificadas y aisladas que codifican la neuquinasa de rata y neuquinasa humana, respectivamente. En particular, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la secuencia natural de la neuquinasa de rata y la secuencia natural de la neuquinasa humana, se han identificado y aislado.

Las secuencias relacionadas o que codifican la neuquinasa descritas en la presente solicitud, incluyen las secuencias de nucleótidos que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos encontradas en la neuquinasa natural, así como las secuencias de aminoácidos codificadas que tienen sustituciones de aminoácidos funcionalmente inconsecuentes, y por lo tanto tienen secuencias de aminoácidos que difieren de la de la secuencia natural. Los ejemplos incluyen la sustitución de un resto básico por otro (es decir, Arg por Lys), la sustitución de un resto hidrófobo por otro (es decir, Leu por Ile), o la sustitución de un resto aromático por otro (es decir, Phe por Tyr, etc.).

La solicitud se refiere además a fragmentos de neuquinasa. Por lo tanto, los ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos también se usan en la invención. El gen de la neuquinasa y las secuencias de ácido nucleico que codifican la neuquinasa pueden incluir genes humanos y relacionados (homólogos) en otras especies. En algunos casos, el gen de la neuquinasa y las secuencias de ácido nucleico que codifican la neuquinasa son de vertebrados, o más en particular, de mamíferos. En algunos casos, el gen de la neuquinasa y las secuencias de ácido nucleico que codifican la neuquinasa proceden de rata. Preferiblemente, el gen de la neuquinasa y las secuencias de ácido nucleico que codifican la neuquinasa son de origen humano.

En un aspecto, la solicitud describe un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 1. El ácido nucleico puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En particular, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Alternativamente, el ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3 o la complementaria de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 75% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 75% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 85% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 85% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el ácido nucleico aislado comprende al menos aproximadamente 500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, o la complementaria de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico aislado comprende al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, o la

complementaria de la misma. En un caso particular, el ácido nucleico aislado comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, o la complementaria de la misma.

Alternativamente, el ácido nucleico aislado puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En algunos casos, el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En una realización particular, ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Además, el ácido nucleico aislado puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 25. En algunos casos, el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 25. Para los fines de la invención, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

Además, el ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 4 o la complementaria de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 70% con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 75% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 75% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 85% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 85% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el ácido nucleico aislado comprende al menos aproximadamente 500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, o la complementaria de la misma. En algunos casos, el ácido nucleico aislado comprende al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos seleccionados de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, o la complementaria de la misma. Para los fines de la invención, el ácido nucleico aislado comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 o la complementaria de la misma.

La presente solicitud también describe ácidos nucleicos que hibrida con o se describe que son complementarios de las secuencias anteriores. Se describen ácidos nucleicos que comprenden una secuencia complementaria a al menos 20, 30, 40, 50, 100, 200 nucleótidos o la región codificante entera de la neuquinasa, o el complemento inverso (sentido contrario) o cualquiera de estas secuencias. En un caso específico, se describe un ácido nucleico que hibrida con una secuencia de ácido nucleico de neuquinasa (p. ej., que tiene parte o toda la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o los complementos de las mismas), en condiciones de baja restricción. En algunos casos, dicho ácido nucleico corresponde a la SEQ ID NO: 7. En otros casos dicho ácido nucleico corresponde a la SEQ ID NO: 8, o una parte de la misma.

A modo de ejemplo y no de limitación, los procedimientos que usan dichas condiciones de baja restricción son los siguientes (véase también Shilo y Weinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6789-6792). Los filtros que contienen ADN se pueden pretratar durante 6 h a 40°C, en una solución que contiene formamida al 35%, 5xSSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1%, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. Las hibridaciones se pueden llevar a cabo en la misma solución con las siguientes modificaciones: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, sulfato de dextrano al 10% (p/vol), y se puede usar sonda marcada con ³²P 5-20x10⁶ cpm. Los filtros se pueden incubar en mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C, y después lavar durante 1,5 h a 55°C, en solución que contiene 2xSSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1%. Después la solución de lavado se puede sustituir por solución reciente e incubar durante 1,5 h adicionales a 60°C. Los filtros se pueden transferir en seco y exponer para

la autorradiografía. Si es necesario, los filtros se pueden lavar una tercera vez a 65-68°C y volver a exponer a película. Otras condiciones de baja restricción que se pueden usar son bien conocidas en la técnica (p. ej., como se usan para las hibridaciones de especies cruzadas).

5 Además, se describe un ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico que codifica la neuquinasa, o su
complemento inverso, en condiciones de alta restricción. A modo de ejemplo y no de limitación, procedimientos que
usan dichas condiciones de alta restricción son las siguientes. La prehibridación de filtros que contienen ADN se
puede llevar a cabo durante 8 h durante la noche a 65°C, en tampón compuesto de 6xSSC, Tris-HCl 50 mM (pH
7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02%, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500
10 µg/ml. Los filtros se pueden hibridar durante 48 h a 65°C, en mezcla de prehibridación que contiene ADN de
esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y sonda marcada con ³²P 5-20x10⁶ cpm. El lavado de los filtros se
puede hacer a 37°C durante 1 h, en una solución que contiene 2xSSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01%, y BSA al
0,01%. A esto le puede seguir un lavado en 0,1xSSC a 50°C, durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Otras
condiciones de alta restricción que se pueden usar son bien conocidas en la técnica.

5.3.1. Clonación del gen o ADNc de la neuquinasa

15 La presente solicitud describe métodos y composiciones relacionadas con la clonación de un gen o ADNc que
codifica la neuquinasa. En un aspecto, se puede usar la clonación de expresión (una técnica usada normalmente en
la materia) para aislar un gen o ADNc que codifica la neuquinasa. Se puede construir una biblioteca de expresión
por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, el ARNm (p. ej., humano) se aísla, y el ADNc se
20 hace y se liga en un vector de expresión, de modo que el ADNc sea capaz de ser expresado por la célula
hospedante en la que se ha introducido. Se pueden usar varios ensayos de cribado para seleccionar el producto de
neuquinasa expresado. En un ejemplo, se pueden usar anticuerpos anti-neuquinasa para la selección.

En otro aspecto, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede usar para amplificar las secuencias de
ácido nucleico de la presente invención deseadas a partir de una biblioteca genómica o de ADNc. Los cebadores
oligonucleótidos aislados que representan secuencias que codifican neuquinasa conocidas se pueden usar como
25 cebadores en la PCR. El cebador oligonucleótido aislado puede comprender al menos 10 nucleótidos consecutivos
de la SEQ ID NO: 3 o su cadena complementaria. Alternativamente, el cebador oligonucleótido aislado comprende
al menos 10 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 4 o su cadena complementaria. En algunos casos, el cebador
oligonucleótido aislado comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 5. En algunos casos, el cebador
oligonucleótido aislado comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, los cebadores
30 oligonucleótidos representan al menos parte de los segmentos conservados de fuerte homología entre genes que
codifican neuquinasa de diferentes especies. Los oligonucleótidos sintéticos se pueden usar como cebadores para
amplificar por PCR secuencias de ARN o ADN, preferiblemente una biblioteca de ADNc, de potencial interés.
Alternativamente, se pueden sintetizar cebadores degenerados para usar en reacciones de la PCR.

En las reacciones de la PCR, el ácido nucleico que se va a amplificar puede incluir ARN o ADN, por ejemplo, ARNm,
35 ADNc o ADN genómico de cualquier especie eucariota. La PCR se puede llevar a cabo, p. ej., usando un ciclador
térmico Cetus de Perkin-Elmer y la polimerasa Taq. También se puede variar la restricción de las condiciones de
hibridación usadas en el cebado de las reacciones de PCR, para permitir mayor o menor grado de similitud de
secuencias de nucleótidos entre una secuencia de nucleótidos de neuquinasa conocida y un homólogo de ácido
40 nucleico que se está aislando. Para la hibridación de especies cruzadas, se prefieren las condiciones de restricción
bajas. Para la hibridación en la misma especie, se prefieren condiciones moderadamente restrictivas. Después de la
amplificación con éxito de un segmento de un homólogo de neuquinasa, ese segmento se puede clonar, secuenciar
y usar como una sonda para aislar un ADNc completo o clon genómico. Esto, a su vez, permitirá la determinación de
la secuencia de nucleótidos completa del gen, el análisis de su expresión y la producción de su producto proteína
45 para el análisis funcional. De esta forma, se pueden identificar secuencias de nucleótidos adicionales que codifican
la neuquinasa u homólogos de neuquinasa.

Los métodos antes citados no se pretende que limitan la siguiente descripción general de métodos por los cuales se
pueden obtener clones de genes que codifican la neuquinasa u homólogos de los mismos.

Cualquier célula eucariota puede servir potencialmente como la fuente de ácido nucleico para la clonación molecular
del gen de neuquinasa, ADNc de neuquinasa o un homólogo de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico que
50 codifican la neuquinasa se pueden aislar de fuente de vertebrado, mamífero, humana, porcina, bovina, felina, aviar,
equina, canina, así como primates adicionales. El ADN se puede obtener por procedimientos convencionales
conocidos en la técnica a partir de ADN clonado (p. ej., una "biblioteca" de ADN), por síntesis química, por clonación
de ADNc o por clonación de ADN genómico o fragmentos del mismo, purificado de la célula deseada o por
amplificación por PCR y clonación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3^a
55 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Glover, D.M. (ed.), *DNA Cloning: A
Practical Approach*, 2^a ed., MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. (1995). Los clones derivados de ADN genómico pueden
contener regiones de ADN reguladoras y de intrones además de las regiones codificantes; los clones derivados de
ADNc contendrán solo secuencias de exones. Cualquiera que sea la fuente, el gen se puede clonar en un vector
adecuado para la propagación del gen.

En la clonación del gen a partir del ADN genómico, se generan fragmentos de ADN, algunos de los cuales codifican el gen deseado. El ADN se puede escindir en sitios específicos usando diferentes enzimas de restricción. Alternativamente, se puede usar DNasa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN o el ADN se puede cizallar físicamente, por ejemplo, mediante ultrasonidos. Los fragmentos de ADN lineales después se pueden separar de acuerdo con el tamaño por técnicas convencionales, incluyendo, pero no limitado a electroforesis en agarosa y gel de poliacrilamida y cromatografía en columna.

Una vez se han generado los fragmentos de ADN, se puede llevar a cabo la identificación del fragmento de ADN específico que contiene el gen deseado, de una serie de formas. Por ejemplo, si está disponible un gen de neuquinasa (de cualquier especie) o su ARN específico, y se puede purificar y marcar, los fragmentos de ADN generados se pueden cribar por hibridación de ácido nucleico con la sonda marcada (Benton y Davis, *Science* 196:180 (1977); Grunstein y Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3961 (1975)). Los fragmentos de ADN con homología sustancial con la sonda hibridarán. También se puede identificar el fragmento adecuado mediante digestión o digestiones con enzimas de restricción y comparación de los tamaños de fragmentos con los esperados de acuerdo con un mapa de restricción conocido, si este está disponible. Se puede llevar a cabo selección adicional basándose en las propiedades del gen.

Alternativamente, la presencia del gen se puede detectar mediante ensayos basados en propiedades físicas, químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, los clones de ADNc o clones de ADN que hibridan-seleccionan los ARNm adecuados, se pueden seleccionar para producir una proteína que tenga, p. ej., migración electroforética, comportamiento de isoelectroenfoque, mapas de digestión proteolítica, actividad de unión de sustrato o propiedades antígenas similares o idénticas, como se conocen para una neuquinasa específica. Si está disponible un anticuerpo contra una neuquinasa particular, la neuquinasa se puede identificar por unión del anticuerpo marcado al clon o clones que producen putativamente la neuquinasa en un procedimiento de tipo ELISA (inmunoensayo de absorción ligado a enzimas).

Una neuquinasa u homólogo de la misma también se puede identificar por selección de ARNm por hibridación de ácido nucleico seguido de traducción in vitro. En este procedimiento, se usan fragmentos para aislar los ARNm complementarios por hibridación. Dichos fragmentos de ADN pueden representar ADN purificado disponible de otras especies que contienen un gen que codifica la neuquinasa. El análisis por inmunoprecipitación o ensayos funcionales de los productos de traducción in vitro de los ARNm aislados identifica el ARNm y, por lo tanto, los fragmentos de ADN complementarios que contienen las secuencias deseadas. Además, se pueden seleccionar los ARNm específicos por adsorción de polisomas aislados de células para inmovilizar anticuerpos específicamente dirigidos contra una neuquinasa específica. Se puede sintetizar un ADNc que codifica la neuquinasa radiomarcada usando el ARNm seleccionado (de los polisomas adsorbidos) como molde. El ARNm o ADNc radiomarcado después se pueden usar como una sonda para identificar los fragmentos de ADN que codifican la neuquinasa de entre otros fragmentos de ADN genómicos.

Las alternativas para aislar el ADN genómico de neuquinasa incluyen, pero no se limitan a la síntesis química de la propia secuencia génica a partir de una secuencia conocida, o hacer el ADNc al ARNm que codifica la neuquinasa. Por ejemplo, el ARN para la clonación del ADNc de neuquinasa se puede aislar de células que expresan un gen de neuquinasa. Son posibles otros métodos y están dentro del alcance de la invención.

El gen que codifica la neuquinasa o análogo de neuquinasa identificado y aislado, después se puede insertar en un vector de clonación adecuado. Se puede usar un gran número de sistemas de vector-hospedante conocidos en la técnica. Los vectores de clonación posibles incluyen, pero no se limitan a plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedante usada. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a bacteriófagos tales como derivados lambda o plásmidos tales como pBR322, derivados de plásmidos pUC o el vector pBluescript (Stratagene). La inserción en un vector de clonación se puede llevar a cabo, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que puede tener extremos cohesivos complementarios. Sin embargo, si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos de ADN. Estos conectores ligados pueden comprender oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen o secuencia de ácido nucleico que codifica la neuquinasa se puede modificar mediante formación de cola homopolímera. Se pueden introducir moléculas recombinantes en células hospedantes por transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de modo que se generan muchas copias del gen.

En un método alternativo, el gen deseado se puede identificar y aislar después de inserción en un vector de clonación adecuado en un procedimiento de "perdigonada". El enriquecimiento del gen deseado, por ejemplo, por fraccionamiento por tamaños, se puede hacer antes de inserción en el vector de clonación.

Para generar múltiples copias del gen, ADNc o secuencia de ADN sintetizada que codifica la neuquinasa aislado, se pueden transformar células hospedantes, por ejemplo cepas competentes de *E. coli*, con moléculas de ADN recombinantes que incorporan dichas secuencias de acuerdo con cualquier técnica conocida en la materia. Por lo tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades desarrollando transformantes, aislando las moléculas de ADN

recombinantes a partir de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

5.3.2. Vectores de expresión

5 En otro aspecto más, la solicitud describe vectores de expresión para expresar secuencias de ADNc que codifican la neuquinasa aisladas. En general, los vectores de expresión son moléculas de polinucleótidos recombinantes que comprenden secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. Los vectores de expresión se pueden adaptar fácilmente para funcionar en procariotas o eucariotas por inclusión de promotores adecuados, secuencias de replicación, marcadores seleccionables, etc., para producir transcripción estable y traducción del ARNm. Las técnicas para la construcción de vectores de expresión y la expresión de genes en células que comprenden los vectores de expresión son bien conocidas en la materia. Véase, p. ej., Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor, y Ausubel et al., eds., edición actual, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

15 Los promotores útiles para usar en los vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotioneína, un promotor tardío mayor de adenovirus constitutivo, un promotor de MMTV inducible con dexametasona, un promotor de SV40, un promotor pol III de MRP, un promotor de MPSV constitutivo, un promotor de RSV, un promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor de CMV temprano inmediato), y un promotor de CMV constitutivo.

20 Los vectores de expresión deben contener señales de expresión y replicación compatibles con la célula en la que se van a expresar las secuencias que codifican la neuquinasa. Los vectores de expresión útiles para expresar secuencias que codifican la neuquinasa incluyen vectores víricos tales como retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados, vectores plasmídicos, cósmidos, y similares. Los vectores víricos y plasmídicos son preferidos para la transfección de vectores de expresión en células de mamíferos. Por ejemplo, el vector de expresión pcDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA), en el que la secuencia de control de la expresión comprende el promotor de CMV, proporciona buenas tasas de transfección y expresión en dichas células.

25 Los vectores de expresión se pueden introducir en la célula para la expresión de la secuencia que codifica la neuquinasa por cualquier método bien conocido para el experto en la técnica, sin limitación. Dichos métodos incluyen, pero no están limitados a, p. ej., captación directa de la molécula de ADN recombinante por una célula de una solución; captación facilitada mediante lipofección usando, p. ej., liposomas o inmunoliposomas; transfección mediada por partículas; etc. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.272.065; Goeddel et al., *Methods in Enzymology*, vol. 185, Academic Press, Inc., CA (1990); Krieger, *Gene Transfer and Expression - A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York (1990); Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (current edition); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001).

35 Los vectores de expresión también pueden contener un resto de purificación que simplifica el aislamiento de la proteína expresada. Por ejemplo, se puede incorporar un resto de polihistidina de, p. ej., 6 restos de histidina (SEQ ID NO: 28), en el extremo amino terminal de la proteína. El resto de polihistidina permite el aislamiento conveniente de la proteína en una sola etapa por cromatografía de quelato de níquel. En algunas realizaciones, el resto de purificación se puede escindir del resto de la construcción de suministro después de purificación. En otras realizaciones, el resto no interfiere con la función de los dominios funcionales de la proteína expresada y por lo tanto no es necesario escindirlo.

5.3.3. Células

45 La invención usa una célula que comprende un vector de expresión para la expresión de polipéptidos de neuquinasa de la invención. La célula se selecciona preferiblemente según su capacidad para expresar concentraciones altas del polipéptido de neuquinasa para facilitar la posterior purificación del polipéptido. En algunas realizaciones, la célula es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En una realización preferida, el polipéptido neuquinasa está adecuadamente doblado y comprende las uniones disulfuro adecuadas cuando es expresado en *E. coli*.

50 En otras realizaciones, la célula es una célula eucariota. Las células eucariotas útiles incluyen levaduras y células de mamífero. Cualquier célula de mamífero conocida por el experto en la técnica para ser útil para expresar un polipéptido recombinante, sin limitación, se puede usar para expresar construcciones de suministro. Por ejemplo, se pueden usar células de ovario de hámster chino (CHO) para expresar los polipéptidos de neuquinasa de la invención. En algunas realizaciones, el polipéptido de neuquinasa es expresado en miocitos ventriculares de rata neonatal. En algunas realizaciones, el polipéptido de neuquinaa es expresado en células H9c2(2-1).

5.4. Anticuerpos

55 De acuerdo con la solicitud, la neuquinasa, o sus fragmentos, se pueden usar como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a polipéptidos de neuquinasa. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, monoclonales monocatenarios, recombinantes, quiméricos,

humanizados, de mamífero o humanos.

En algunos casos, se producen anticuerpos contra una neuquinasa no humana. En algunos casos, se producen anticuerpos contra neuquinasa de rata. En otros casos, se producen anticuerpos contra neuquinasa humana. En otros casos, se producen anticuerpos que se unen específicamente a una proteína cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 1. En otros casos, se producen anticuerpos que se unen específicamente a una proteína cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 2. En otros casos, se producen anticuerpos que se unen específicamente a una proteína cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 25. En otros casos, se producen anticuerpos contra un fragmento de neuquinasa no humana. En otros casos, se producen anticuerpos contra un fragmento de neuquinasa de rata. En otros casos, se producen anticuerpos contra un fragmento de neuquinasa humana. En un caso específico, se usan fragmentos de neuquinasa, humana o no humana, identificados como que contienen regiones hidrófilas, como inmunógenos para la producción de anticuerpos. En un caso específico, se puede usar un análisis de hidrofiliidad para identificar regiones hidrófilas de la neuquinasa, que son epítotos potenciales, y por lo tanto se pueden usar como inmunógenos.

Para la producción del anticuerpo, se pueden inmunizar diferentes animales hospedantes por inyección con neuquinasa natural, o una versión sintética, o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el animal hospedante es un mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un conejo, ratón, rata, cabra, vaca o caballo.

Para la producción de anticuerpos policlonales contra la neuquinasa, se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica. En un caso particular, se pueden obtener anticuerpos policlonales de conejo contra un epítoto de neuquinasa codificado por una secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o una subsecuencia de la misma. Se pueden obtener diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies hospedantes. Los adyuvantes que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, ácidos nucleicos que contienen C_pG y adyuvantes para seres humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Para preparar anticuerpos monoclonales dirigidos contra un polipéptido de neuquinasa, se puede usar cualquier técnica que proporciona la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales por la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., *Immunol. Today* 4:72 (1983)) o la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96 (1985)).

Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios, como se describen en la patente de EE.UU. 4.946.778, también se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios específicos para la neuquinasa. Una realización adicional de la invención usa técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1988)) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para la neuquinasa. Se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo de la molécula por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a: el fragmento F(ab'), fragmento que se puede producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab'), los fragmentos Fab que se pueden generar tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y fragmentos Fv.

También se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos "quiméricos" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)). Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo de ratón específica para la neuquinasa se cortan y empalman con secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo humana.

Además, se han desarrollado técnicas para la producción de anticuerpos humanizados, y dichos anticuerpos humanizados contra la neuquinasa están dentro del alcance de la presente invención. Véase, p. ej., Queen, patente de EE.UU. n° 5.585.089 y Winter, patente de EE.UU. n° 5.225.539. Una región variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "armazón" interrumpida por tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La extensión de la región armazón y las CDR se han definido con precisión. Véase, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Kabat, E. et al., U.S. Department of Health and Human Services (1983). Brevemente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más CDR de especies no humanas y una región armazón de una molécula de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos humanos se pueden usar y se pueden obtener usando hibridomas humanos (Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:2026-2030 (1983)) o transformando linfocitos B humanos con virus EBV in vitro (Cole et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77-96 (1985)).

En la producción de anticuerpos, el cribado del anticuerpo deseado se puede llevar a cabo por técnicas conocidas en la materia, p. ej., ELISA (inmunoensayo de absorción con enzimas ligadas), RIA (radioinmunoensayo) o RIBA (ensayo de inmunotransferencia recombinante). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de neuquinasa, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de neuquinasa que contiene dicho dominio. Para seleccionar un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo de neuquinasa pero que no se une específicamente a un segundo homólogo de neuquinasa diferente, se puede seleccionar basándose en la unión positiva al primer homólogo de neuquinasa y la falta de unión al segundo homólogo de neuquinasa.

También se proporcionan anticuerpos específicos contra un dominio de neuquinasa o un homólogo del mismo. Los anticuerpos anteriores se pueden usar en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y actividad de la neuquinasa de la invención, p. ej., para la generación de imágenes de estas proteínas, midiendo los niveles de los mismos en muestras fisiológicas adecuadas, en métodos de diagnóstico, etc.

5.5. Animales transgénicos para la neuquinasa

Los animales transgénicos son útiles para estudiar la función y/o actividad de la neuquinasa y para identificar y/o evaluar los moduladores de la actividad de neuquinasa. Los transgenes dirigen la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del animal transgénico. En algunos casos, los transgenes previenen la expresión de un producto génico naturalmente codificado en una o más tipos de células o tejidos (animal transgénico con "genes inactivados"). En algunas realizaciones, los transgenes sirven como un marcador o indicador de una integración, situación cromosómica o región de recombinación (p. ej., ratón cre/loxP).

Un animal transgénico se puede crear, para los fines de la invención, introduciendo un ácido nucleico de la invención en los pronúcleos masculinos de un ovocito fertilizado (p. ej., por microinyección, infección retroviral) y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal hembra adoptivo pseudopreñada (PFFA)). Las secuencias de neuquinasa se pueden introducir como un transgén en el genoma de un animal no humano. En algunos casos, la secuencia de neuquinasa es la secuencia de neuquinasa de rata (SEQ ID NO: 3). Para los fines de la invención, la secuencia de neuquinasa es la secuencia de neuquinasa humana (SEQ ID NO: 4). En otros casos, se puede usar un homólogo de neuquinasa como un transgén. También se pueden incluir secuencias intrónicas y señales de poliadenilación en el transgén para aumentar la expresión del transgén. Las secuencias reguladoras específicas de tejido se pueden unir operativamente al transgén de neuquinasa para dirigir la expresión de la neuquinasa a células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos por manipulación embrionaria y microinyección, en particular animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica, p. ej., Evans et al., patente de EE.UU. n° 4.870.009 (1994); Leder y Stewart, patente de EE.UU. n° 4.736.866, 1988; Wagner y Hoppe, patente de EE.UU. n° 4.873.191 (1989). Se pueden hacer otros animales transgénicos que no son ratones por métodos similares. Un animal fundador transgénico, que se puede usar para reproducir animales transgénicos adicionales, se puede identificar basándose en la presencia del transgén en su genoma y/o expresión del ARNm del transgén en tejidos o células del animal. Los animales transgénicos para la neuquinasa se pueden reproducir con otros animales transgénicos que llevan otros transgenes.

Para crear un animal recombinante homólogo, se puede introducir un vector que contiene al menos una parte de neuquinasa con una eliminación, adición o sustitución para así alterar, p. ej., alterar funcionalmente la expresión de neuquinasa. En algunos casos, el vector puede contener un casete de neomicina insertado en la orientación inversa con respecto a la transcripción de neuquinasa. La neuquinasa puede ser un gen humano (SEQ ID NO: 10), u otro homólogo de neuquinasa. En un procedimiento, un vector con gen inactivado altera funcionalmente el gen de neuquinasa endógeno tras la recombinación homóloga, y por lo tanto se expresa una proteína neuquinasa no funcional, si se expresa.

Alternativamente, se puede diseñar el vector de modo que tras la recombinación homóloga, la neuquinasa endógena se muta o altera de otra forma pero todavía codifica la proteína funcional (p. ej., se puede alterar la región reguladora en la dirección 5' para así alterar la expresión de la neuquinasa endógena). En este tipo de vector de recombinación homólogo, la parte alterada de la secuencia de neuquinasa está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por secuencia de ácido nucleico adicional de neuquinasa para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre la secuencia de neuquinasa exógena que lleva el vector y una secuencia de neuquinasa endógena en un citoblasto embrionario. La secuencia de neuquinasa flanqueadora adicional es suficiente para crear recombinación homóloga con la neuquinasa endógena. Típicamente, están incluidas varias kilobases de ADN flanqueador (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector (véase Thomas and Capecchi, *Cell* 51:503-512 (1987)).

Después, el vector se introduce en una línea de citoblastos embrionarios (p. ej., por electroporación), y se seleccionan las células en las que la secuencia de neuquinasa introducida se ha recombinado de forma homóloga con la secuencia de neuquinasa endógena (Li et al., *Cell* 69:915-926 (1992)).

Las células seleccionadas después se inyectan en un blastocisto de un animal (p. ej., un ratón) para formar quimeras de agregación (véase Bradley, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Oxford University Press, Inc., Oxford (1987)). Después, se puede implantar un embrión quimérico en una PFFA adecuada, en donde el embrión se lleva a término. La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus

células germinales se puede usar para reproducir animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga por transmisión de la línea germinal del transgén. Hay métodos descritos para la construcción de vectores recombinantes homólogos y animales recombinantes homólogos (Berns et al., documento WO 93/04169, 1993; Kucherlapati et al., documento WO 91/01140, 1991; Le Mouellic y Brullet, documento WO 90/11354, 1990).

Alternativamente, se pueden producir animales transgénicos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriófago P1 (Lakso et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236 (1992)). Otro sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al., *Science* 251:1351-1355 (1991)). Si se usa un sistema de recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgén, se requieren animales que contengan transgenes que codifican tanto la recombinada Cre como una proteína seleccionada. Dichos animales se pueden producir como animales transgénicos "dobles", por apareamiento de un animal que contiene un transgén que codifica una proteína seleccionada con otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa.

También se pueden producir clones de animales transgénicos (Wilmut et al., *Nature* 385:810-813 (1997)). En resumen, se puede aislar una célula de un animal transgénico e inducir que salga del ciclo de crecimiento y entre en la fase G₀. La célula quiescente después se puede fusionar con un ovocito enucleado de un animal de la misma especie del que se ha aislado la célula quiescente. Después, el ovocito reconstruido se cultiva para el desarrollo hasta una mórula o blastocito y después se transfiere a una PFFA. La descendencia nacida de esta animal madre adoptiva será un clon del animal transgénico "parental".

5.6. Métodos de cribado para moduladores de la actividad de neuquinasa

La presente invención también proporciona métodos para identificar un compuesto que modula la actividad de neuquinasa en una célula o tejido de interés. Un compuesto puede modular la actividad de neuquinasa afectando, por ejemplo: (1) al número de copias del gen de neuquinasa en la célula (amplificadores y desamplificadores); (2) aumentando o disminuyendo la transcripción del gen de neuquinasa (reguladores por aumento y reguladores por disminución de la transcripción); (3) aumentando o disminuyendo la traducción del ARNm de neuquinasa en proteína (reguladores que aumentan y reguladores que disminuyen la traducción); o (4) aumentando o disminuyendo la actividad de la proteína neuquinasa (agonistas y antagonistas). Para identificar compuestos que afectan a la neuquinasa a nivel del ADN, ARN y proteína, se ponen en contacto células u organismos con un compuesto candidato y se puede evaluar el correspondiente cambio en el ADN, ARN o proteína neuquinasa. Para los amplificadores o desamplificadores de ADN, se puede medir la cantidad de ADN de neuquinasa. Para aquellos compuestos que son reguladores por aumento y reguladores por disminución de la transcripción, se puede medir la cantidad de ARNm de neuquinasa. Alternativamente, la secuencia promotora de neuquinasa se puede unir operativamente a un gen indicador, y se pueden ensayar potenciales moduladores de la transcripción de neuquinasa midiendo la actividad del gen indicador en presencia y ausencia del compuesto. Para reguladores que aumentan y disminuyen la traducción, se puede medir la cantidad de polipéptido de neuquinasa. Alternativamente, los cambios en la actividad biológica de la neuquinasa, medidos por la técnica descrita a continuación, pueden ser un indicador indirecto de la capacidad de un compuesto para modular la traducción de neuquinasa.

La actividad de neuquinasa de los métodos descritos en la presente memoria abarca la actividad biológica de la neuquinasa que incluye, pero no se limita a la fosforilación de la cadena ligera de la miosina cardiaca y/o fragmentos funcionales o variantes de la cadena ligera de miosina, unión de calmodulina, y autoinhibición. Los métodos para examinar los sucesos de fosforilación basados en célula son conocidos normalmente en la técnica, y se pueden usar para examinar cambios en la fosforilación de la cadena ligera de miosina después de contacto con un modulador putativo de la actividad biológica de neuquinasa.

En una realización, la célula o tejido útil para los métodos descritos en la presente memoria, expresa un polipéptido de neuquinasa a partir de una copia endógena del gen de neuquinasa. En otra realización, la célula o tejido expresa un polipéptido de neuquinasa después de transformación transitoria o estable con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neuquinasa de la presente invención. Se puede usar cualquier célula de mamífero conocida por el experto en la técnica como útil para expresar un polipéptido recombinante, sin limitación, para expresar un polipéptido de neuquinasa útil para los métodos descritos en la presente memoria.

En una realización, el método de identificación de un compuesto que modula la actividad de neuquinasa comprende determinar un primer nivel de actividad de neuquinasa en una célula o tejido que expresa un polipéptido de neuquinasa, poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo, después determinar un segundo nivel de actividad de neuquinasa en dicha célula o tejido. Una diferencia en el primer nivel y el segundo nivel de actividad de neuquinasa es indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de la neuquinasa. En una realización, un compuesto puede tener actividad agonista si el segundo nivel de actividad de neuquinasa es mayor que el primer nivel de actividad de neuquinasa. En algunas realizaciones, la actividad agonista comprende al menos aproximadamente un aumento de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 o más veces en el segundo nivel de actividad de neuquinasa comparado con el primer nivel de actividad de neuquinasa. En otra realización, un compuesto puede tener actividad antagonista si el segundo nivel de actividad de neuquinasa es menor que el primer nivel de actividad de neuquinasa. En algunas realizaciones, la actividad antagonista comprende

una disminución de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 o más veces en el segundo nivel de actividad de neuquinasa comparado con el primer nivel de actividad de neuquinasa.

En otra realización, la invención proporciona un método de identificación de un compuesto que modula la actividad de neuquinasa en una célula o tejido que expresa un polipéptido de neuquinasa, que comprende poner en contacto dicha célula o tejido con un compuesto de ensayo y determinar un nivel de neuquinasa en dicha célula o tejido. La diferencia en este nivel y un nivel de referencia o inicial de actividad de neuquinasa en una célula o tejido comparable, p. ej., una célula o tejido de control que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo, es indicativa de la capacidad de dicho compuesto de ensayo para modular la actividad de neuquinasa. En una realización, un compuesto puede tener actividad agonista si el nivel de actividad de neuquinasa en la célula o tejido puesto en contacto con dicho compuesto, es mayor que el nivel de actividad de neuquinasa en la célula o tejido de control. En algunas realizaciones, la actividad agonista comprende un aumento de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 o más veces en el nivel de actividad de una célula o tejido puesto en contacto con el compuesto de ensayo, comparado con el nivel de actividad de neuquinasa en la célula o tejido de control. En otra realización, un compuesto puede tener actividad antagonista si el nivel de actividad de neuquinasa en la célula o tejido puesto en contacto con dicho compuesto, es menor que el nivel de actividad de neuquinasa en la célula o tejido de control. En algunas realizaciones, la actividad antagonista comprende una disminución de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 o más veces en el nivel de actividad de una célula o tejido puesto en contacto con el compuesto de ensayo, comparado con el nivel de actividad de neuquinasa en la célula o tejido de control.

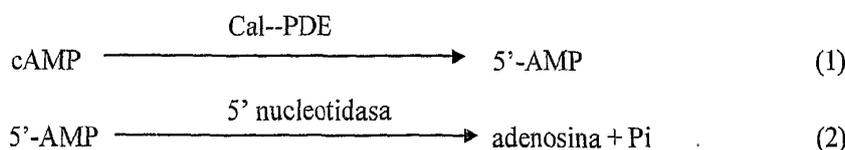
La presente invención también proporciona métodos de identificación de un compuesto que modula la actividad de neuquinasa en un animal transgénico no humano que expresa un polipéptido de neuquinasa, que comprenden administrar el compuesto a dicho animal y evaluar en el animal una alteración de la función cardiaca afectada por el compuesto. La función cardiaca se puede evaluar por la medición del tamaño del tabique interventricular, dimensión diastólica final ventricular izquierda (LVEDD), grosor de la pared posterior, dimensión sistólica final ventricular izquierda (LVESD), fracción de eyección (FE), acortamiento fraccional (AF), y ciclo cardiaco. En una realización, un compuesto puede tener una actividad agonista si el valor de LVEDD después de la administración del compuesto se reduce en al menos aproximadamente 2%, 5%, 10%, 15%, 20% o más. En otra realización, un compuesto puede tener una actividad agonista si el valor de LVESD después de la administración del compuesto se reduce en al menos aproximadamente 2%, 5%, 10%, 15%, 20% o más. En otra realización, un compuesto puede tener una actividad agonista si el valor de la FE del ventrículo izquierdo es potenciado en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o más. En otra realización, un compuesto puede tener una actividad agonista si el valor del AF del ventrículo izquierdo es potenciado en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o más.

La presente invención también proporciona métodos de identificación de compuestos que se unen específicamente a ácidos nucleicos o polipéptidos de neuquinasa y por lo tanto tienen uso potencial como agonistas o antagonistas de neuquinasa. En algunas realizaciones, dichos compuestos pueden afectar a la hipertrofia cardiaca, hipertrofia de células musculares ventriculares, etc. En una realización preferida, se llevan a cabo ensayos para cribar compuestos que tienen potencial utilidad como tratamientos para la insuficiencia cardiaca o compuestos candidatos para el desarrollo de fármacos. Por lo tanto, la invención proporciona ensayos para detectar compuestos que se unen específicamente a ácidos nucleicos o polipéptidos de neuquinasa. Por ejemplo, se pueden usar células recombinantes que expresan ácidos nucleicos de neuquinasa para producir recombinantemente polipéptidos de neuquinasa para usar en estos ensayos, p. ej. para cribar compuestos que se unen a polipéptidos de neuquinasa. Dichos compuestos (p. ej., parejas de unión putativas de neuquinasa) se ponen en contacto con un polipéptido de neuquinasa o un fragmento del mismo en condiciones que conducen a la unión, y se identifican los compuestos que se unen específicamente. Se pueden usar métodos similares para cribar compuestos que se unen a ácidos nucleicos de neuquinasa. Los métodos que se pueden usar para llevar a cabo lo anterior son habitualmente conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, se pueden llevar a cabo ensayos sin células que usan un polipéptido de neuquinasa purificado para identificar compuestos que modulan (1) la fosforilación de la cadena ligera de miosina cardiaca y/o fragmentos funcionales o variantes de la misma, (2) la actividad autoinhibidora de la neuquinasa en ausencia de Ca^{2+} /calmodulina, y/o (3) la unión de neuquinasa de, y activación por la calmodulina. Los ensayos de la quinasa de la cadena ligera de miosina son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Polak et al., *J. Neurosci.*, 11:534-54 (1991), Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (edición actual), y patente de EE.UU. n° 5.906.810, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Los moduladores putativos de la actividad biológica de neuquinasa se pueden identificar ensayando la actividad de neuquinasa en presencia de diferentes concentraciones del compuesto y examinando la extensión de la incorporación de fosfato en un sustrato adecuado. En algunas realizaciones, el sustrato es la cadena ligera de miosina. En algunas realizaciones, el sustrato es un fragmento funcional de la cadena ligera de miosina. En algunas realizaciones, el sustrato es una variante de la cadena ligera de miosina.

En algunas realizaciones, la modulación de la actividad de neuquinasa se puede medir mediante ensayos de actividad de calmodulina, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.840.697, Sharma et al., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 10:187-89 (1979), y Wallace et al., *Methods Enzymol.*, 102:39-47 (1983), cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Los compuestos que se unen e inhiben la actividad

de la calmodulina también pueden inhibir la activación de neuquinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. A modo de ejemplo y no de limitación, la actividad de la calmodulina en presencia y ausencia de potenciales moduladores de la actividad de neuquinasa, se puede medir usando un ensayo de fosfodiesterasa dependiente de calcio. La actividad de la calmodulina se mide por su capacidad para estimular la actividad de la fosfodiesterasa, determinada por un procedimiento de ensayo de dos etapas ilustrado por las reacciones (1) y (2) a continuación.



Durante la primera etapa del ensayo, el 3'5'-monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) se incuba con fosfodiesterasa activada con calcio (Cal-PDE), que hidroliza el enlace 3' produciendo 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP). Durante la segunda etapa, el 5'-AMP se convierte cuantitativamente en adenosina y fosfato inorgánico (Pi) por la acción de una 5-nucleotidasa. A la reacción le sigue la medición del Pi formado por lectura de la absorbancia a 660 nm después de reaccionar con molibdato amónico. La cantidad de Pi formado está directamente relacionada con la actividad de la fosfodiesterasa que depende del nivel de activación por la calmodulina.

En diferentes realizaciones, el compuesto modulador de neuquinasa es una proteína, por ejemplo, un anticuerpo; un ácido nucleico; o una molécula pequeña. Como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula pequeña" incluye, pero no se limita a compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular menor de 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de 500 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de 100 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos. También están abarcados sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

A modo de ejemplo, en diversidad de bibliotecas, tales como bibliotecas de péptidos o no péptidos aleatorias o combinatorias, se pueden cribar moléculas que se unan específicamente a la neuquinasa. Se conocen muchas bibliotecas en la técnica que se pueden usar, p. ej., bibliotecas sintetizadas químicamente, bibliotecas recombinantes (p. ej., bibliotecas de presentación en fagos), y basadas en traducción in vitro.

Se describen ejemplos de bibliotecas químicamente sintetizadas en Fodor et al., *Science* 251:767-773 (1991); Houghten et al., *Nature* 354:84-86 (1991); Lam et al., *Nature* 354:82-84 (1991); Medynski, *Bio/Technology* 12:709-710 (1994); Gallop et al., *J. Medicinal Chemistry* 37(9):1233-1251 (1994); Ohlmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10922-10926 (1993); Erb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:11422-11426 (1994); Houghten et al., *Biotechniques* 13:412 (1992); Jayawickreme et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:1614-1618 (1994); Salmon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11708-11712 (1993); publicación PCT n° WO 93/20242; y Brenner y Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5381-5383 (1992).

Se describen ejemplos de bibliotecas de presentación en fagos en Scott y Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Christian, R.B., et al., *J. Mol. Biol.* 227:711-718 (1992); Lenstra, *J. Immunol. Meth.* 152:149-157 (1992); Kay et al., *Gene* 128:59-65 (1993); y publicación PCT n° WO 94/18318, publicada el 18 de agosto, 1994. Las bibliotecas basadas en traducción in vitro incluyen, pero no se limitan a las descritas en la publicación PCT n° WO 91/05058, publicada el 18 de abril, 1991; y Mattheakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:9022-9026 (1994).

A modo de ejemplo de bibliotecas no peptídicas, se puede adaptar para usar una biblioteca de benzodiazepina (véase, p. ej., Bunin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:4708-4712 (1994)). También se pueden usar bibliotecas de peptoides (Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367-9371 (1992)). Otro ejemplo de una biblioteca que se puede usar, en la que los grupos funcionales amida en los péptidos se han permitilado para generar una biblioteca combinatoria químicamente transformada, es descrita por Ostresh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:11138-11142 (1994).

El cribado de bibliotecas se puede llevar a cabo por cualquiera de una variedad de métodos habitualmente conocidos. Véase, p. ej., las siguientes referencias, que describen el cribado de bibliotecas de péptidos: Parmley y Smith, *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:215-218 (1989); Scott y Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Fowlkes et al., *Bio/Techniques* 13:422-427 (1992); Oldenburg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5393-5397 (1992); Yu et al., *Cell* 76:933-945 (1994); Staudt et al., *Science* 241:577-580 (1988); Bock et al., *Nature* 355:564-566 (1992); Tuerk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6988-6992 (1992); Ellington et al., *Nature* 355:850-852 (1992); patente de EE.UU. n° 5.096.815, patente de EE.UU. n° 5.223.409 y patente de EE.UU. n° 5.198.346; Rebar y Pabo, *Science* 263:671-673 (1993); y publicación PCT n° WO 94/18318, publicada el 8 de agosto, 1994.

En una realización específica, el cribado se puede llevar a cabo poniendo en contacto los miembros de la biblioteca con el polipéptido de neuquinasa (o ácido nucleico) inmovilizado sobre una fase sólida y recogiendo aquellos

miembros de la biblioteca que se unen a la proteína (o ácido nucleico). Los ejemplos dichos métodos de cribado, denominados técnicas de "batea" se describen a modo de ejemplo en Parmley y Smith, *Gene* 73:305-318 (1988); Fowlkes et al., *Bio/Techniques* 13:422-427 (1992); publicación PCT nº WO 94/18318; y en referencias citadas en los documentos anteriores.

- 5 En otra realización, se puede usar el sistema de dos híbridos para seleccionar proteínas que interaccionan en levaduras (Fields y Song, *Nature* 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9578-9582 (1991)) para identificar moléculas que se unen específicamente a la proteína neuquinasa o un análogo de la misma.

10 En otra realización, el cribado se puede llevar a cabo creando una biblioteca de péptidos en una célula procariota o eucariota, de modo que las proteínas de la biblioteca son expresadas en la superficie de la célula, seguido de contacto de la superficie de la célula con neuquinasa y determinación de si se ha producido la unión. Alternativamente, las células se transforman con un ácido nucleico que codifica neuquinasa, de modo que la neuquinasa es expresada en la superficie de la célula. Después, las células se ponen en contacto con un agonista o antagonista potencial, y se determina la unión o falta de ella. En una realización específica de lo anterior, el potencial agonista o antagonista se puede expresar en la misma o diferente célula, de modo que el potencial agonista o antagonista sea expresado en la superficie de la célula.

15 Como entenderá claramente el experto en la técnica, cualquiera y/o todas las realizaciones descritas en la presente memoria para identificar un agente, fármaco o compuesto que pueda modular la actividad de neuquinasa, incluyendo los procedimientos que incorporan el diseño racional de fármacos, como se describe en la presente memoria, se pueden combinar para formar cribados y ensayos de fármacos adicionales, todos los cuales están contemplados por la presente invención.

20 5.7. Métodos de diagnóstico

La presente invención también se refiere al campo de la medicina predictiva en la que se usan ensayos de diagnóstico y pronóstico para fines de pronóstico (predictivos) para el tratamiento profiláctico de un individuo. Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a ensayos de diagnóstico para determinar la expresión del ácido nucleico de neuquinasa así como la actividad de neuquinasa en el contexto de una muestra biológica (p. ej., sangre, suero, células, tejido) para determinar si un individuo está afectado por una enfermedad o trastorno, o está en riesgo de desarrollar un trastorno. Dicho trastorno o enfermedad puede estar asociada con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa, y pueden incluir, pero no se limita a disfunción cardiaca. En realizaciones particulares, la disfunción cardiaca es la miocardiopatía hipertrófica. En otras realizaciones, la disfunción cardiaca es la insuficiencia cardiaca. La invención también proporciona ensayos de pronóstico para determinar si un individuo tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad del ácido nucleico de neuquinasa. Por ejemplo, se pueden ensayar mutaciones en la neuquinasa en una muestra biológica. Dichos ensayos se pueden usar para propósitos de pronóstico o predictivos para el tratamiento profiláctico de un individuo antes del inicio de un trastorno caracterizado por o asociado con la expresión del ácido nucleico o actividad biológica de la neuquinasa aberrantes.

35 5.7.1. Ensayos de diagnóstico

Un método de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de neuquinasa en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el ácido nucleico de neuquinasa (p. ej., ARNm, ADN genómico) de modo que se confirme la presencia de neuquinasa en la muestra. Un agente para detectar el ARNm o ADN genómico de neuquinasa es una sonda de ácido nucleico marcada que puede hibridar con el ARNm o ADN genómico de neuquinasa. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de neuquinasa de longitud completa, tal como el ácido nucleico de las SEQ ID NO: 3 o 4, o una parte de las mismas. En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico es un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y es suficiente para hibridar específicamente en condiciones restrictivas con el ARNm o ADN genómico de neuquinasa.

Un agente para detectar el polipéptido de neuquinasa puede ser un anticuerpo capaz de unirse a la neuquinasa, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo, p. ej., un fragmento Fab. Una sonda marcada o anticuerpo se puede acoplar (es decir, unir físicamente) con una sustancia detectable, o se puede usar un método de detección indirecto en donde la sonda o el anticuerpo se detecta por la reactividad con un reactivo secundario directamente marcado. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario con marcaje fluorescente, o marcaje en el extremo de una sonda de ADN con biotina, de modo que se pueda detectar con estreptavidina con marcaje fluorescente.

55 El método de detección de la invención se puede usar para detectar el ARNm, proteína o ADN genómico de neuquinasa en una muestra biológica in vitro así como in vivo. Por ejemplo, las técnicas in vitro para detectar ARNm de neuquinasa incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones in situ. Las técnicas in vitro para la detección de polipéptido de neuquinasa incluyen inmunoensayos absorbentes ligados a enzima (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas in vitro para la detección del ADN genómico de

neuquinasa incluyen hibridaciones Southern e hibridación in situ fluorescente (FISH). Además, las técnicas in vivo para detectar neuquinasa incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-neuquinasa 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 generación de imágenes.

- 5 En una realización, la muestra biológica del sujeto contiene moléculas de proteína y/o moléculas de ARNm y/o moléculas de ADN genómico. En algunas realizaciones, la muestra biológica es sangre.

En otra realización, los métodos implican además obtener una muestra biológica de un sujeto para proporcionar un control, poner en contacto la muestra con un compuesto o agente para detectar el ARNm o ADN genómico de neuquinasa, y comparar la presencia de ARNm o ADN genómico de neuquinasa en la muestra control con la presencia de ARNm o ADN genómico de neuquinasa en la muestra de ensayo.

- 10

5.7.2. Ensayos de pronóstico

Los ensayos de diagnóstico descritos en la presente memoria se pueden usar además para identificar sujetos que tienen o que tienen riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa. Dicha enfermedad o trastorno puede incluir, pero no se limita a la disfunción cardiaca, en particular miocardiopatía hipertrófica e insuficiencia cardiaca. La invención proporciona un método para identificar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa, en el que se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta el ácido nucleico de neuquinasa (p. ej., ARNm o ADN genómico). Una muestra de ensayo es una muestra biológica obtenida de un sujeto. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (p. ej., suero), muestra celular o tejido.

- 15

Los ensayos de pronóstico se pueden usar para determinar si se puede administrar una modalidad (p. ej., un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, alimento, etc.) para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa. Dichos métodos se pueden usar para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con un agente para un trastorno. La invención proporciona métodos para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con un agente para un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa, en los que se obtiene una muestra de ensayo y se detecta el ácido nucleico de neuquinasa (p. ej., donde la presencia del ácido nucleico de neuquinasa es diagnóstico para un sujeto al que se le puede administrar el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa).

- 20
- 25

Los métodos de la invención también se pueden usar para detectar lesiones genéticas en un gen de neuquinasa para determinar si un sujeto con la lesión genética tiene riesgo de tener un trastorno, incluyendo pero no limitado a la miocardiopatía hipertrófica o insuficiencia cardiaca. Los métodos incluyen detectar en una muestra de un sujeto, la presencia o ausencia de una lesión genética caracterizada por una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica un polipéptido de neuquinasa o la mala expresión de un gen de neuquinasa. Dichas lesiones genéticas se pueden detectar evaluando: (1) una eliminación de uno o más nucleótidos del gen de neuquinasa; (2) una adición de uno o más nucleótidos al gen de neuquinasa; (3) una sustitución de uno o más nucleótidos en el gen de neuquinasa; (4) una reordenación cromosómica en un gen de neuquinasa; (5) una alteración en el nivel de transcritos de ARNm de neuquinasa; (6) la modificación aberrante de un gen de neuquinasa, tal como un cambio en la metilación del ADN genómico; (7) la presencia de un patrón de corte y empalme que no es de tipo natural de un transcrito de ARNm de neuquinasa; (8) un nivel que no es de tipo natural de un polipéptido de neuquinasa; (9) pérdida alélica de neuquinasa; y/o (10) modificación postraducciona l inadecuada de un polipéptido de neuquinasa. Hay un gran número de técnicas de ensayo conocidas que se pueden usar para detectar lesiones en la neuquinasa. Se puede usar cualquier muestra biológica que contenga células nucleadas.

- 30
- 35
- 40

La detección de lesiones genéticas de neuquinasa puede usar cualquier técnica conocida en la materia. En algunas realizaciones, la detección de lesiones puede usar una sonda de ácido nucleico/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tal como PCR de anclaje o amplificación rápida por PCR de los extremos del ADNc (RACE). Este método puede incluir recoger una muestra de un paciente, aislar ácidos nucleicos de la muestra, poner en contacto los ácidos nucleicos con uno o más cebadores de ácidos nucleicos que hibridan específicamente con el ácido nucleico de neuquinasa en condiciones tales que se produce la hibridación y amplificación de la secuencia de neuquinasa (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto amplificado y comparar la longitud con una muestra de control. Se anticipa que la PCR puede ser conveniente usarla como una etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar mutaciones descritas en la presente memoria.

- 45
- 50

Las mutaciones en un gen de neuquinasa de una muestra también se pueden identificar por alteraciones en los patrones de escisión de enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de la muestra y del control se aíslan, amplifican (opcionalmente) digieren con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de longitud de los fragmentos por electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de las longitudes de los fragmentos entre el ADN de la muestra y el control indican mutaciones en el ADN de la muestra. Además, se pueden usar ribozimas específicos de secuencia para puntuar la presencia de mutaciones específicas por el desarrollo o pérdida de un sitio de escisión de ribozimas.

- 55

Además, la hibridación de ácidos nucleicos de la muestra y el control, p. ej., ADN o ARN, con matrices de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas de oligonucleótidos, puede identificar mutaciones genéticas en la neuquinasa (véase, Cronin et al., *Hum. Mutat.* 7:244-255 (1996); Kozal et al., *Nat. Med.* 2:753-759 (1996)). Por ejemplo, se pueden identificar mutaciones genéticas en la neuquinasa en matrices bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas con luz como describen Cronin et al., véase antes. Brevemente, se puede usar una primera matriz de hibridación para hacer un barrido por los tramos largos de ADN en una muestra y el control para identificar cambios de bases entre las secuencias, haciendo matrices lineales de sondas secuenciales que se solapan. Esta etapa permite la identificación de mutaciones puntuales. A esto le sigue una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas usando matrices de sondas especializadas, más pequeñas, complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutaciones está compuesta de conjuntos de sondas paralelas, una complementaria a los genes de tipo natural y la otra complementaria de los genes mutantes.

En otra realización más, se puede usar cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen de la neuquinasa y detectar mutaciones comparando la secuencia de la secuencia de neuquinasa de la muestra con la correspondiente secuencia de tipo natural (control). Los ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en técnicas clásicas (véase, Maxam y Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74:560-564 (1977); Sanger et al., *Natl. Acad. Sci USA* 74:5463-5367 (1977)). Se puede usar cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automáticos para realizar ensayos de diagnóstico de la presente invención (véase, Naeve et al., *Biotechniques* 19:448-453 (1995)) incluyendo la secuenciación por espectrometría de masas (Cohen et al., *Adv. Chromatogr.* 36:127-162 (1996); Griffin y Griffin, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159 (1993)).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero no se limitan a la hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión de cebador selectiva. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en los que la mutación conocida se coloca centralmente y después se hibrida con el ADN diana en condiciones que permiten la hibridación solo si se encuentra una correspondencia perfecta (véase, Saiki et al., *Nature* 324:163-166 (1986); Saiki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230-6234 (1989)). Dichos oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con ADN diana amplificado por PCR o una serie de mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos están unidos a la membrana de hibridación e hibridados con el ADN diana marcado.

5.8. Composiciones

La invención se refiere a métodos de tratamiento (y profilaxis) por la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un fármaco de la invención. En un aspecto preferido, el fármaco está sustancialmente purificado. El sujeto preferiblemente es un animal, incluyendo, pero no limitado a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc. y preferiblemente es un mamífero, y los más preferiblemente un ser humano. En una realización específica, el sujeto es un mamífero no humano. Las formulaciones y métodos de administración que se pueden usar se pueden seleccionar entre las descritas en la presente memoria más adelante.

Se conocen diferentes sistemas de suministro y se pueden usar para administrar un producto terapéutico de la invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el producto terapéutico, endocitosis mediada por receptor (véase, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico del producto terapéutico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser conveniente introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. También se puede usar la administración pulmonar, p. ej., usando un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosol.

En una realización específica, puede ser conveniente administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, p. ej., junto con un apósito para la herida después de cirugía, por inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras.

En otra realización, el producto terapéutico se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase, Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, págs. 317-372, 353-365 (1989)).

En otra realización más, el producto terapéutico se puede suministrar en un sistema de liberación controlado. En una realización, se puede usar una bomba (véase, Langer, véase antes, Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201

- (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability: Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Pewas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también, Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En otra realización más, se puede poner un sistema de liberación controlada en la cercanía del objetivo terapéutico, es decir, el timo, requiriendo por lo tanto una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, véase antes, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). Se describen otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).
- 5
- 10 En una realización específica donde el producto terapéutico es un ácido nucleico que codifica un producto terapéutico proteína (p. ej. SEQ ID NO: 25), el ácido nucleico se puede administrar in vivo para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, p. ej., mediante el uso de un vector retroviral (véase, la patente de EE.UU. n° 4.980.286) o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo con
- 15 micropartículas (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, DuPont) o por recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolos unidos a un péptido de tipo homeosecuencia que se sabe que entra en el núcleo (véase, p. ej., Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:1864-1868 (1991)), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico terapéutico de forma intracelular e incorporar dentro del ADN de la célula hospedante para la expresión, por recombinación homóloga.
- 20 Las composiciones farmacéuticas para los fines de la invención, comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden usar soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Dichos
- 25 excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche en polvo desnatada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tener forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición se puede formular en forma de supositorio, con
- 30 aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en *Remington's Pharmaceutical Sciences* de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de
- 35 vehículo, para así proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.
- Preferiblemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la
- 40 administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para suavizar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o juntos mezclados en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la
- 45 composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de modo que puedan mezclarse los ingredientes antes de la administración.
- Los productos terapéuticos de la invención se pueden formular como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos
- 50 clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.
- La cantidad del producto terapéutico de la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar por técnicas clínicas
- 55 convencionales. Además, se pueden usar opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimas. La dosis precisa que se va a usar en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados para la administración intravenosa en general son de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de
- 60 dosis adecuados para la administración intranasal en general son de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de dosis-respuesta obtenidas de sistemas de ensayo in vitro y de modelos animales.

Los supositorios en general contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10% en peso; las formulaciones orales preferiblemente contienen de 10% a 95% del ingrediente activo.

5.9. Kits

5 Las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un kit, recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración. Cuando la composición farmacéutica se suministra como un kit, los diferentes componentes de la composición se pueden envasar en recipientes separados y mezclar inmediatamente antes de usar. Dichos envasados de los componentes por separado pueden permitir el almacenamiento a largo plazo sin pérdida de las funciones de los componentes activos.

10 Los kits también pueden incluir reactivos en recipientes separados que facilitan la ejecución de un ensayo específico, tal como ensayos de diagnóstico o tipificación de tejido. Por ejemplo, se pueden suministrar moldes de ADN de neuquinasa y cebadores adecuados para controles internos.

5.9.1. Recipientes o contenedores

15 Los reactivos incluidos en los kits se pueden suministrar en recipientes de cualquier tipo de modo que se preserve la vida de los diferentes componentes, y no sean adsorbidos o alterados por los materiales del recipiente. Por ejemplo, ampollas de vidrio selladas pueden contener luciferasa liofilizada o tampón que se han envasado bajo un gas neutro, no reactivo, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir en cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc., material cerámico, metal o cualquier otro material usado típicamente para contener reactivos. Otros ejemplos de recipientes adecuados incluyen botellas sencillas que pueden estar fabricadas de sustancias similares a las ampollas, y sobres que pueden consistir en interiores revestidos de lámina metálica, tal como aluminio o una aleación. Otros recipientes incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringas, o similares. Los recipientes pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que se puede perforar mediante una aguja de inyección hipodérmica. Otros recipientes pueden tener dos compartimentos que están separados mediante una membrana fácilmente retirable, que tras la retirada permite que los componentes se mezclen. Las membranas retirables pueden ser de vidrio, plástico, caucho, etc.

5.9.2. Materiales de instrucciones

30 Los kits se pueden suministrar con materiales de instrucciones. Las instrucciones pueden estar impresas en papel u otro sustrato, y/o se pueden suministrar como un medio de lectura electrónica, tal como un disco flexible, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de vídeo, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar físicamente asociadas con el kit, en su lugar, se puede dirigir al usuario a un sitio web en internet especificado por el fabricante o distribuidor del kit, o suministrado en forma de correo electrónico.

5.10. Métodos de tratamiento

35 La invención proporciona tratamiento tanto profiláctico como terapéutico de un sujeto con riesgo de (o susceptible de) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa. Los trastornos de ejemplo se caracterizan por la función cardíaca anómala, incluyendo pero no limitado a insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmias, hipertrofia cardíaca familiar, enfermedad cardíaca isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares.

5.10.1. Enfermedades y trastornos

40 Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por los niveles o actividad biológica de neuquinasa aumentados, se pueden tratar con productos terapéuticos que antagonizan (es decir, reducen o inhiben) la actividad. Los antagonistas se pueden administrar de una forma terapéutica o profiláctica. Los productos terapéuticos que se pueden usar incluyen: (1) péptidos de neuquinasa, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos; (2) anticuerpos contra un péptido de neuquinasa; (3) ácidos nucleicos de neuquinasa; (4) administración de ácidos nucleicos de sentido contrario y ácidos nucleicos que son "disfuncionales" (es decir, debido a una inserción heteróloga dentro de las secuencias codificantes) que se usan para eliminar la función endógena de la neuquinasa por recombinación homóloga (Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989)); o (5) moduladores (es decir, inhibidores, agonistas y antagonistas, incluyendo miméticos de péptidos adicionales de la invención o anticuerpos específicos para neuquinasa) que alteran la interacción entre la neuquinasa y su pareja de unión.

50 Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por niveles o actividad biológica de neuquinasa disminuidos, se pueden tratar con productos terapéuticos que aumentan (es decir, son agonistas) la actividad. Los productos terapéuticos que regulan por aumento la actividad se puede administrar de forma terapéutica o profiláctica. Los productos terapéuticos que se pueden usar incluyen péptidos, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos; o un agonista que aumenta la biodisponibilidad, o, en una realización específica, un agonista que aumenta la actividad de neuquinasa inhibiendo el dominio autoinhibidor de la neuquinasa.

55 Los niveles aumentados o reducidos se pueden detectar fácilmente cuantificando el péptido y/o ARN, obteniendo

una muestra de tejido del paciente (p. ej., de tejido de biopsia) y ensayando in vitro los niveles de ARN o péptido, estructura y/o actividad de los péptidos expresados (o los ARNm de neuquinasa). Los métodos incluyen, pero no se limitan a inmunoensayos (p. ej., por análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación seguido de electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico (SDS), inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión de ARNm (p. ej., ensayos Northern, transferencias en manchas, hibridación in situ, y similares).

5.10.2. Métodos profilácticos

La invención proporciona un método para prevenir en un sujeto una enfermedad o afección asociada con una expresión o actividad aberrante de la neuquinasa, administrando un agente que modula la expresión de la neuquinasa o al menos una actividad de neuquinasa. De acuerdo con la invención, dicho agente es el polipéptido aislado o ácido nucleico asilado de la invención. Los sujetos que tienen riesgo de una enfermedad que es causada por la expresión o actividad aberrante de la neuquinasa se pueden identificar, por ejemplo, por cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico. La administración de un agente profiláctico se puede producir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración de la neuquinasa, de modo que se previene una enfermedad o trastorno, o alternativamente, se retrasa su avance. En una realización específica de la invención, la hipertrofia de células musculares ventriculares se previene o retrasa por la administración de dicho agente profiláctico. Dependiendo del tipo de aberración de la neuquinasa, se puede usar, por ejemplo, un agonista de neuquinasa o antagonista de neuquinasa para tratar el sujeto. El agente adecuado se puede determinar basándose en ensayos de cribado.

5.10.3. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos de modulación de la expresión o actividad de la neuquinasa con propósitos terapéuticos. El método modulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de neuquinasa asociada con la célula. Un agente que modula la actividad de neuquinasa puede ser un ácido nucleico o una proteína, un ligando cognado de neuquinasa que se encuentra de forma natural, un péptido, un peptidomimético de neuquinasa, un aptámero, u otras moléculas pequeñas. El agente puede estimular la actividad de neuquinasa. Los ejemplos de dichos agentes estimuladores incluyen neuquinasa activa y una molécula de ácido nucleico de neuquinasa que se ha introducido en la célula. De acuerdo con la invención, dicho agente es el polipéptido aislado o ácido nucleico asilado de la invención. La estimulación de la actividad de neuquinasa es deseable en situaciones en las que la neuquinasa es anormalmente regulada por disminución y/o en las que es probable que la actividad aumentada de neuquinasa tenga un efecto beneficioso.

Alternativamente, el agente modulador de neuquinasa puede inhibir la actividad de neuquinasa. Los ejemplos de agentes inhibidores incluyen anticuerpos anti-neuquinasa, o una molécula de ácido nucleico inhibidora. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede comprender un oligonucleótido de sentido contrario, un aptámero, o un ARN inhibidor/interferente (p. ej., un ARN inhibidor/interferente pequeño). Los métodos para cribar para identificar y hacer estos moduladores de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, puede usar ARN interferente (ARNi) (véase, p. ej., Chuang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4985 (2000)) para inhibir la expresión de un gen que codifica la neuquinasa. Los fragmentos de ARN interferente, en particular los ARNi bicatenarios (bc), se pueden usar para generar la pérdida de función de neuquinasa. Se conocen métodos relacionados con el uso de ARNi para silenciar genes en organismos, incluyendo mamíferos, *C. elegans*, *Drosophila*, plantas, y seres humanos (véase, p. ej., Fire et al., *Nature* 391:806-811 (1998); Fire, *Trends Genet.* 15:358-363 (1999); Sharp, *Genes Dev.* 15:485-490 (2001); Hammond, et al., *Nature Rev. Genet.* 2:1110-1119 (2001); Tuschl, *Chem, Biochem.* 2:239-245 (2001); Hamilton et al., *Science* 286:950-952(1999); Hammond et al., *Nature* 404:293-296 (2000); Zamore et al., *Cell* 101:25-33 (2000); Bernstein et al., *Nature* 409: 363-366 (2001); Elbashir et al., *Genes Dev.* 15:188 200 (2001); Elbashir et al. *Nature* 411:494-498 (2001); solicitud internacional PCT n° WO 01/29058; y solicitud internacional PCT n° WO 99/32619), cuyos contenidos se incorporan por referencia. Las construcciones que expresan ARN bicatenario (ARNbc) se introducen en un hospedante usando un vector replicable que permanece episomal o se integra en el genoma. Seleccionando secuencias adecuadas, se puede interferir en la expresión de ARNbc con acumulación de ARNm endógeno que codifica neuquinasa.

Se pueden llevar a cabo métodos moduladores in vitro (p. ej., cultivando la célula con el agente), o alternativamente in vivo (p. ej., administrando el agente a un sujeto). Como tal, la invención proporciona el tratamiento de un individuo que padece una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión o actividad aberrante de una neuquinasa o molécula de ácido nucleico. En una realización, el método implica administrar un agente (p. ej., un agente identificado por un ensayo de cribado), o combinación de agentes que modulan (p. ej., regulan por aumento o regulan por disminución) la expresión o actividad de neuquinasa. En otra realización, el método implica administrar una neuquinasa o molécula de ácido nucleico como tratamiento para compensar la expresión o actividad de neuquinasa aberrante o reducida.

5.10.4. Determinación del efecto biológico del producto terapéutico

Se pueden llevar a cabo ensayos in vitro o in vivo adecuados para determinar el efecto de un producto terapéutico específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado.

En diferentes realizaciones específicas, se pueden llevar a cabo ensayos in vitro con células representativas del o de los tipos implicados en el trastorno del paciente, para determinar si un producto terapéutico dado ejerce el efecto deseado sobre el o los tipos de células. Se pueden ensayar modalidades para usar en el tratamiento en sistemas de modelos adecuados que incluyen, pero no se limitan a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos y similares, antes del ensayo en seres humanos.

Igualmente, para el ensayo in vivo, se puede usar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica, antes de la administración a sujetos humanos. En una realización, se puede ensayar la eficacia de un producto terapéutico candidato en un modelo in vivo para la hipertrofia cardiaca. La determinación in vivo de hipertrofia incluye la medición de parámetros cardiovasculares tales como la tensión arterial, frecuencia cardiaca, resistencia vascular sistémica, contractilidad, fuerza del latido cardiaco, hipertrofia concéntrica o dilatada, presión sistólica ventricular izquierda, presión media ventricular izquierda, presión diastólica final ventricular izquierda, gasto cardiaco, índice de accidente cerebrovascular, parámetros histológicos, y tamaño ventricular y espesor de la pared. Los modelos animales disponibles para determinar el desarrollo y la supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares in vivo, incluyen el modelo de ratón de presión-sobrecarga, modelo disfuncional murino de RV, modelo de ratón transgénico, y modelo de rata de postinfarto de miocardio. Se conocen métodos médicos para evaluar la presencia, desarrollo y supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares en pacientes humanos, e incluyen, por ejemplo, mediciones de parámetros diastólicos y sistólicos, cálculos de la masa ventricular y flujos de venas pulmonares.

5.10.5. Usos profiláctico y terapéutico de las composiciones de la invención

Los ácidos nucleicos y proteínas neuquinasa son útiles en potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas implicadas en una variedad de trastornos incluyendo, pero no limitado a insuficiencia cardiaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmias, hipertrofia cardiaca familiar, enfermedad cardiaca isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares.

Como un ejemplo, un ADNc que codifica una neuquinasa puede ser útil en tratamiento génico, y la proteína puede ser útil cuando se administra a un sujeto que lo necesite. A modo de ejemplo no limitante, las composiciones de la invención tendrán eficacia para el tratamiento de pacientes que padecen insuficiencia cardiaca.

Los ácidos nucleicos de neuquinasa, o fragmentos de los mismos, también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico, en donde se va a evaluar la presencia o cantidad del ácido nucleico o la proteína. Un uso adicional podría ser como una molécula antibacteriana (es decir, se ha encontrado que algunos péptidos tienen propiedades antibacterianas). Estos materiales son además útiles en la generación de anticuerpos que se unen inmunopecíficamente a las nuevas sustancias de la invención para el uso de métodos terapéuticos o de diagnóstico.

6. Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no se pretende que sean de ninguna forma limitantes.

6.1. Ejemplo 1: Regulación por aumento de la expresión del gen de neuquinasa después de aplicación de neuregulina en el ventrículo izquierdo de rata con infarto de miocardio.

Con el fin de identificar genes que pueden ser regulados por la neuregulina (NRG), se examinó la expresión génica en el ventrículo izquierdo tanto de ratas normales como con infarto de miocardio, después de infusión extensa de NRG por bomba osmótica.

Para cargar una bomba osmótica con NRG, se inyectaron 1 ml de agua estéril y 1 ml de solución salina estéril al 0,9% en un vial de NRG (993.1U, 62,5 µg) sucesivamente en la campana extractora. La solución de NRG se extrajo a una jeringa estéril. Se cambió una aguja de punta roma por la jeringa y se eliminó la burbuja de la jeringa. La bomba se mantuvo vertical y la aguja se insertó a través de la pequeña abertura en la parte superior de la bomba vertical hasta que no podía avanzar más. Se empujó el émbolo lentamente para añadir la solución de NRG a la bomba hasta que la solución empezó a rebosar la bomba. Se retiró la aguja y la bomba se limpió. Se quitó la tapa transparente del moderador de flujo para exponer un tubo de acero inoxidable corto. El tubo de acero después se insertó en un extremo de un tubo PE60 de 5 cm. La aguja de la jeringa se insertó en el otro extremo del tubo PE60. Se empujó el émbolo de la jeringa para añadir solución de NRG en el moderador de flujo hasta que estuvo lleno. Después se insertó el tubo largo del moderador de flujo en la bomba hasta que su reborde blanco se unió a la bomba. Se extrajo la aguja del moderador de flujo antes de sumergir la bomba en solución salina estéril al 0,9% a 37°C durante la noche.

Para instalar la bomba osmótica, ratas macho Wistar (Shanghai Animal Center of Chinese Academy of Science), que pesaba cada una 200 ± 20 g, se anestesiaron por inyección intraperitoneal de ketamina 100 mg/kg (fármaco/peso corporal). Se depiló y desinfectó la zona entre el cuello y hombro de las ratas. El cuerpo se cubrió con un trozo de tela húmeda estéril. Después se hizo una incisión con cuidado en la piel entre las escápulas para localizar y separar la vena yugular externa. El extremo distal de la vena del corazón se ligó. Se hizo un pequeño agujero mediante tijeras oculares en la pared de la vena yugular externa y se ensanchó mediante microforceps. El tubo PE60

5 conectado a la bomba osmótica se insertó 2 cm en la vena a través del agujero. Después el extremo proximal de la vena del corazón se unió con al tubo PE60 para fijar el tubo. El extremo distal de la vena que rodeaba el tubo PE60 se ató fuerte para fijar más el tubo. Usando un hemostato, se formó un túnel mediante separación roma de la piel de la incisión a la escápula. Finalmente se hizo un bolsillo en el lomo de la rata en la región escapular media extendiendo más la piel. La bomba se deslizó por el túnel al bolsillo con el moderador de flujo apuntando en dirección opuesta a la incisión. La incisión de la piel después se cerró con una sutura. Las ratas se devolvieron a la habitación de animales después de reanimación y se alimentaron de forma habitual.

10 Después de tratar las ratas con IM con NRG mediante una bomba osmótica durante 7 días, las ratas se sacrificaron y sus ventrículos izquierdos se sacaron y enviaron a Affymetrix, Inc. para el análisis de expresión de genes. Después, el ventrículo izquierdo de las ratas se homogeneizó y se extrajo el ARNm total del homogeneizado. Después, la muestra de ARNm se estudió mediante la matriz de expresión para rata de Affymetrix 230 2.0, y se examinó el nivel de ARNm de los genes usando una micromatriz. En la tabla 1 se citan los niveles calculados de ARNm correspondientes a las proteínas relacionadas con la quinasa de la cadena ligera de miosina. Cada dato puntual representa los niveles de expresión de 3 ratas.

15 Tabla 1

Niveles relativos de ARNm que codifican proteínas relacionadas con la quinasa de la cadena ligera de miosina del ventrículo izquierdo de ratas tratadas con NRG

ID conjunto sondas	Ratas normales con vehículo	Ratas con IM con vehículo	Ratas con IM con NRG	Gen
1371541	0,921±0,085	0,951±0,125	1,147±0,165	Quinasa de polipéptido ligero, miosina (predicho)
1376789	0,997±0,066	0,679±0,098	1,696±0,189	Similar a la quinasa 2 de la cadena ligera de miosina, músculo esquelético/cardiaco (predicho)
1382239	0,886±0,218	0,591±0,246	1,721±0,339	Similar a la quinasa 2 de la cadena ligera de miosina, músculo esquelético/cardiaco (predicho)
1384818	0,908±0,296	0,598±0,227	0,335±0,162	Quinasa de polipéptido ligero, miosina (predicho)
1386200	0,969±0,274	0,717±0,104	0,946±0,098	Similar a la quinasa 2 de la cadena ligera de miosina, músculo esquelético/cardiaco (predicho)
1398820	0,942±0,185	1,115±0,101	0,592±0,195	Quinasa 2 de la cadena ligera de miosina, músculo esquelético
1398821	0,700±0,254	1,287±0,375	0,738±0,217	Quinasa 2 de la cadena ligera de miosina, músculo esquelético

20 Para las secuencias de ARNm que hibridaban con los conjuntos de sondas 1376789 y 1382239, la expresión aumento al menos 2 veces en el ventrículo izquierdo de ratas con IM tratadas con NRG, comparado con las muestras tratadas con control (vehículo). Estos resultados demuestran que la NRG potencia significativamente el nivel de ARNm que se unen con el conjunto de sondas 1376789 y/o 1382239 en el ventrículo izquierdo de rata con IM. Por consiguiente, los ARNm que se unen al conjunto de sondas 1376789 o 1382239 probablemente codifican proteínas que son dianas corriente abajo de la neuregulina.

25 6.2. Ejemplo 2: Clonación de ADNc de neuquinasa a partir de ARN de ventrículo izquierdo de rata

30 Se extrajo el ARN total del ventrículo izquierdo de rata normal. Se añadieron ARN, cebador (GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO: 5)) y transcriptasa inversa de AMV (Promega) al sistema de transcripción inversa de Promega (cat. nº A3500), y se llevó a cabo la transcripción inversa de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la reacción, se añadieron una parte alícuota de la mezcla de reacción, el cebador inverso (GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO: 5)) y cebador directo (ATGTCAGGAGTTTCAGAGGA (SEQ ID NO: 6)) (basado en la similitud predicha con la quinasa 2 de la cadena ligera de miosina) a una mezcla primaria de PCR (Sinobio) para amplificar el ADNc diana por PCR. Después de la PCR, la muestra resultante se purificó por electroforesis y se ligó al plásmido pUCm-T (Promega). Después, el plásmido se secuenció con los dos cebadores mencionados antes (SEQ ID NO: 5 y 6). La secuencia de ADNc se cita como SEQ ID NO: 1, y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína se cita como SEQ ID NO: 2. Esta proteína se denominó neuquinasa, y su secuencia de ADNc se confirmó además por alineamiento con las secuencias del conjunto de sondas 1382239 (SEQ ID NO: 9) y el conjunto de sondas 1376789 (SEQ ID NO: 10) (véase el ejemplo 1 anterior). El alineamiento de estas tres secuencias con el genoma de rata puso de manifiesto que 325 bp del extremo 5' de la SEQ ID NO: 9 solapaban con el extremo 3' del gen de neuquinasa, y 77 bp del

extremo 5' de la SEQ ID NO: 10 solapaban con el 3' de la SEQ ID NO: 9.

6.3. Ejemplo 3: Expresión específica del gen de neuquinasa en corazón de rata

Usando el ADNc de neuquinasa como molde, se sintetizó una subsecuencia de neuquinasa (SEQ ID NO: 8) por PCR usando un cebador directo (ATGTCAGGAGTTTCAGAGGA (SEQ ID NO: 6)) y un cebador inverso (CTTGAATTCTCACAGTGACGTATCGATGAT (SEQ ID NO: 7)). Este fragmento (SEQ ID NO: 8) después se purificó y se usó como un molde para sintetizar la sonda de ADNc de neuquinasa radiomarcada. El fragmento de ADNc de neuquinasa y [α -³²P]dCTP se añadieron al sistema de marcaje Prime-a Gene[®] de Promega (que contiene el fragmento largo de la ADN polimerasa I y hexadesoxirribonucleótidos aleatorios) para sintetizar sondas marcadas. Los productos de reacción se cargaron en columnas de centrifugado Sephacryl[®] S-400 (Promega), y las columnas se centrifugaron para recoger sondas mayores de 270 bp. Las sondas después se usaron para el análisis de transferencia Northern de Rat MTN[™] Blot de Clontech, que incluye poli A⁺ ARN extraído de diferentes órganos de rata (corazón, cerebro, bazo, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y testículos). La figura 1 muestra que la sonda específica de neuquinasa hibrida solo con un ARNm de aproximadamente 4,4 kb del tejido cardíaco, sugiriendo que el gen de neuquinasa es un gen cardíaco específico. La transferencia también se hibridó con sonda específica de β -actina (Clontech) como control de carga.

6.4. Ejemplo 4: Clonación de ADNc de neuquinasa humana a partir de ARN de ventrículo izquierdo humano

Se extrajo el ARN total del ventrículo izquierdo humano. Se añadieron ARN, cebador Oligo-dT ((TTTTTTTTTTTTTTTT)) (SEQ ID NO: 29) y transcriptasa inversa de AMV (Promega) al sistema de transcripción inversa de Promega para la transcripción inversa. Después de la reacción, se añadieron una parte alícuota de la mezcla de reacción, cebador directo (GACACCACCGCCTGAGTGAGAAC (SEQ ID NO: 11)) y cebador inverso (CCATTGGAGCAGCAGAGTTGAAGA (SEQ ID NO: 12)) a una mezcla madre de PCR (Sinobio), y se llevó a cabo la PCR para amplificar el ADNc diana. Después de la reacción, las mezclas resultantes se purificaron por electroforesis y se ligaron al plásmido pUCm-T (Promega) y se secuenciaron. La secuencia de ADNc de neuquinasa humana se cita como SEQ ID NO: 4. Se identificaron sitios de inicio de traducción alternativa putativa en las posiciones 139 y 211 de la SEQ ID NO: 4, cuya traducción dio como resultado polipéptidos de 795 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) y 819 aminoácidos (SEQ ID NO: 25), respectivamente.

6.5. Ejemplo 5: Producción de anticuerpos para neuquinasa humana

Se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra una proteína de fusión de neuquinasa humana-GST. Brevemente, se añadieron, ADNc de neuquinasa humana, cebador directo (CGCGGATCCATGGACACAAAGCTGAACATG (SEQ ID NO: 13)) y cebador inverso (CCTTAAGTCACGTGGCCCCACCAAAGCGAT (SEQ ID NO: 14)) a una mezcla primaria de PCR (Sinobio), y se llevó a cabo la PCR. Después de la PCR, las mezclas resultantes se purificaron por electroforesis. Tanto el ADN purificado como el plásmido pGEX-2T (GE healthcare) se digirieron con BamHI y EcoRI respectivamente antes del ligado. La secuencia de ADNc del fragmento de neuquinasa humana se cita como SEQ ID NO: 15, y la secuencia de aminoácidos del fragmento se muestra como SEQ ID NO: 16.

La construcción ligada que contenía el fragmento de ADNc de neuquinasa humana se transformó en células BL21 antes de añadir IPTG al cultivo para inducir la expresión alta del fragmento de neuquinasa. Después, se recogieron las células por centrifugación del cultivo antes de tratamiento con ultrasonidos. La suspensión de células tratada con ultrasonidos después se centrifugó además para sedimentar los cuerpos de inclusión. Después de separar el líquido sobrenadante, se añadió urea 8 M para disolver los cuerpos de inclusión. Después la solución del fragmento de neuquinasa se dializó para separar la urea y simultáneamente volver a plegar el fragmento. Después, el fragmento se purificó por columna de afinidad de GST y se inyectó hipodérmicamente a conejos para producir anticuerpos. Después de 2 semanas, se extrajo el suero de los conejos para la purificación del anticuerpo.

6.6. Ejemplo 6: Expresión específica de neuquinasa en tejido cardíaco humano

Se homogeneizaron tejidos humanos de intestino, hígado, corazón, músculo esquelético, pulmón, riñón, útero, bazo y tiroides por separado y se dializaron con tampón de diálisis (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, vanadato sódico 2 mM, PMSF 2 mM, cóctel de inhibidor de proteasa (Roche, 1 trozo para 25 ml)). Las muestras de proteína de tejidos lisados se sometieron a SDS-PAGE, después se transfirieron a una membrana de PVDF para la transferencia Western. La expresión de la proteína neuquinasa en diferentes tejidos humanos se detectó mediante el anticuerpo producido en el ejemplo 5. La membrana se hibridó con un anticuerpo específico para GAPDH como un control de carga. Como se muestra en la figura 2, la neuquinasa solo se expresó en corazón humano. Este resultado complementa la expresión de ARNm de neuquinasa en tejido de corazón de rata, como se presenta en el ejemplo 3, y demuestra además que la expresión de neuquinasa es específica cardíaca.

6.7. Ejemplo 7: La actividad de neuquinasa humana depende de calcio y calmodulina

Expresión y purificación de la cadena ligera de miosina reguladora (RLC) humana

Se extrajo el ARN total de tejido del ventrículo izquierdo humano. Se añadieron ARN, cebador directo (GGGAATTCCATATGGCACCTAAGAAAGCAAAGAA (SEQ ID NO: 17)), cebador inverso (CCGCTCGAGGTCTTCTTCTTCTCCGTGGGTG (SEQ ID NO: 18)) y transcriptasa inversa de AMV al sistema de transcripción inversa de Promega para la transcripción inversa. Después de la reacción, se ligó ADNc bicatenario al plásmido pet22b. Después, la construcción ligada se transformó en células BL21 antes de añadir IPTG para inducir la expresión alta de esta RLC marcada con his. Las células se sedimentaron por centrifugación antes del tratamiento con ultrasonidos para liberar los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se recogieron por centrifugación adicional antes de disolverlos con urea 8 M. La RLC marcada con his desnaturalizada se purificó por columna de níquel y se replegó por diálisis para separar la urea. La secuencia de aminoácidos de la RLC se corresponde con la SEQ ID NO: 19.

Expresión recombinante y purificación de neuquinasa

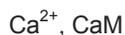
Se añadieron ADNc de neuquinasa, cebador directo (CATCATCTGGTTCCGCGTGGATCTATGTCAGGAACCTCCAAGGAGAGT (SEQ ID NO: 20)), cebador inverso (CGGAATTCCTATTGGAGCAGCAGAGTTGAAG (SEQ ID NO: 21)) y ADN polimerasa Pfu Turbo® (Stratagene) al sistema de reacción de PCR para la PCR. Después de varios ciclos de amplificación, se añadieron una parte alícuota de la mezcla de reacción, nuevo cebador directo (CGGGATCCATGCATCATCATCATCATCTGGTTCCGCGT (SEQ ID NO: 22)), cebador inverso (CGGAATTCCTATTGGAGCAGCAGAGTTGAAGA (SEQ ID NO: 24)) y ADN polimerasa PfuTurbo® (Stratagene) al sistema de reacción de PCR para ciclos adicionales de PCR. Se separó el ADN en la mezcla de reacción por electroforesis, y el ADN diana que codifica la neuquinasa se purificó y se ligó al plásmido pcDNA3. Los productos de la reacción de ligado se transformaron en células DH5α para la amplificación y secuenciación. Los clones que contenían la construcción correcta se amplificaron en cultivos de aumento gradual, y se extrajo el ADN plasmídico que contenía el ADNc de neuquinasa usando el kit Qiagen Plasmid Maxi Kit. El plásmido pcDNA3/neuquinasa purificado se transfeció en células COS7 usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Después de un cambio inicial de medio varias horas después de transfección, las células se incubaron durante 48 horas a 37°C. Después las células se lisaron y se recogieron usando tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, vanadato sódico 2 mM, PMSF 2 mM, cóctel de inhibidor de proteasa (Roche, 1 comprimido para 25 ml de tampón de lisis)). La suspensión celular se centrifugó a 12000g durante 20 minutos, y los sedimentos vueltos a suspender se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore). Después la muestra se mezcló con anticuerpo con marcador His (Beyotime) y Protein A Sepharose 4 Fast Flow al 50% en tampón de lisis y se incubó sobre hielo durante 3 horas con agitación suave. La mezcla se centrifugó a 12000g durante 20 segundos antes de separar el líquido sobrenadante. Después el sedimento se lavó tres veces con tampón de lisis. Después del último lavado, el sedimento se volvió a suspender en 1 ml de tampón de reacción (Tris 20 mM, pH 7,5, KCl 60 mM), se mezcló y se incubó sobre hielo durante 5 min. La mezcla después se centrifugó, se separó el líquido sobrenadante y se añadieron otros 300 μl de tampón de reacción.

Fosforilación de RLC por neuquinasa dependiente de calcio y calmodulina

Se llevaron a cabo ensayos de fosforilación in vitro usando neuquinasa purificada, RLC, y calmodulina (Calbiochem) para determinar si la fosforilación por neuquinasa de la RLC es dependiente tanto de calcio como de calmodulina. La actividad de neuquinasa se evaluó in vitro, tanto en presencia como en ausencia de Ca²⁺ y calmodulina, vigilando la cantidad de fosforilación de RLC, determinada por transferencia Western para RLC fosforilada (RLC-P). Se llevaron a cabo tres experimentos simultáneos. En el experimento I, los componentes de la reacción incluían neuquinasa, ATP, RLC, Ca²⁺, CaM. En el experimento II, los componentes de la reacción incluían neuquinasa, ATP, RLC, CaM, pero no calcio, y se añadió EGTA para quelar el calcio en el tampón de reacción. En el experimento III, los componentes de la reacción incluían neuquinasa, ATP, RLC y Ca²⁺, pero no calmodulina. La concentración de los reaccionantes, cuando se incluían en la reacción, era la siguiente: ATP 2 mM, RLC 2,5 μM, Ca²⁺ 0,3 μM, CaM 1 μM, con o sin EGTA 2 mM. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Se separó una parte alícuota de 20 μl de cada reacción, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida, y se transfirió a una membrana de PVDF para el análisis de transferencia Western. Se usó anticuerpo contra RLC-P (Cell Signaling) para detectar la RLC-P; los resultados se presentan en la figura 3.

La RLC es altamente fosforilada cuando la neuquinasa se combina con RLC en presencia tanto de Ca²⁺ como de calmodulina (banda 1). En cambio, la fosforilación de la RLC apenas es detectable en ausencia de Ca²⁺ combinado con la adición de EGTA a la solución de reacción (banda 2). Igualmente, la fosforilación de la RLC es indetectable en ausencia de calmodulina (banda 3). Considerados juntos, estos resultados indican que la fosforilación por la neuquinasa de la RLC es altamente dependiente de la presencia de Ca²⁺ y calmodulina. Por lo tanto, se cree que la fosforilación por la neuquinasa de la RLC se produce de la siguiente forma:

ES 2 625 316 T3



En la fórmula CaM significa calmodulina, RLC significa la cadena ligera reguladora de miosina, y RLC-P significa la RLC fosforilada.

5 6.8. Ejemplo 8: Actividad de neuquinasa humana expresada en células de insecto

Preparación de báculo que contiene ADNc de neuquinasa humana

El ADN plasmídico pcDNA3/neuquinasa del ejemplo 7 se digirió con BamHI y EcoRI para escindir el fragmento de ADNc de neuquinasa. Los productos de digestión se separaron por electroforesis, y el fragmento de ADNc de neuquinasa humana se purificó del gel y posteriormente se ligó al ADN plasmídico pFastBac y se digirió con EcoRI BamHI. Células DH5 α competentes se transformaron con los productos de ligación, se pusieron en placa y se incubaron durante la noche. ADN mini-prep aislados de varias colonias de la noche se enviaron a Invitrogen para la secuenciación e identificación de los clones positivos de neuquinasa. Las colonias que albergaban los plásmidos de pFastBac/neuquinasa que contenían la secuencia de ADNc de neuquinasa correcta se amplificaron más, y el ADN plasmídico se purificó usando un kit Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Después, el ADN plasmídico pFastBac/neuquinasa se transformó en células DH10Bac, y las células se inocularon en una placa de agarosa que contenía kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 7 $\mu\text{g/ml}$, tetraciclina 10 $\mu\text{g/ml}$, X-gal 200 $\mu\text{g/ml}$ e IPTG 40 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C durante 48 horas. Se recogió una colonia blanca y se inoculó de nuevo en una placa de agarosa nueva que contenía kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 7 $\mu\text{g/ml}$, tetraciclina 10 $\mu\text{g/ml}$, X-gal 200 $\mu\text{g/ml}$ e IPTG 40 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C durante la noche. Después, se inoculó una colonia blanca en medio líquido que contenía kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 7 $\mu\text{g/ml}$ y tetraciclina 10 $\mu\text{g/ml}$, y se agitó ligeramente durante la noche a 37°C. Se recogieron 6 ml de cultivo líquido y se centrifugó a 14000 g durante 1 min. Se separó el líquido sobrenadante, y se añadieron 1,2 ml de solución 1 (Tris-HCl 15 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, RNasa A 100 $\mu\text{g/ml}$) y se mezcló suavemente para resuspender las células. Después se añadieron 1,2 ml de solución 2 (NaOH 0,2 N, SDS al 1%) y se mezcló suavemente a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron lentamente mientras se agitaba 1,2 ml de acetato potásico 3 M, pH 5,5, y la mezcla se centrifugó a 14000g durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 3,2 ml de isopropanol. El tubo se invirtió varias veces y se dejó sobre hielo durante 6 min antes de centrifugación a 14000g durante 15 min. El líquido sobrenadante se separó con cuidado sin alterar el sedimento. Se añadieron 2 ml de etanol al 70% al sedimento antes de invertir el tubo varias veces y se centrifugó a 14000g durante 5 min. El tubo se dejó abierto a temperatura ambiente durante 5-10 min y se dejó el sedimento para separar el líquido sobrenadante residual. Se añadieron 40 μl de tampón de TE, pH 8,0, para disolver el ADN de báculo purificado.

El ADN de báculo purificado, cebador directo (GTTTTCCCAGTCACGAC (SEQ ID NO: 23), (también M13+) y cebador inverso (CGGAATTCCCATTGGAGCAGCAGAGTTGAAGA (SEQ ID NO: 24)) se añadieron a una mezcla primaria de PCR (Sinobio) para la PCR. Después, se realizó la electroforesis de la mezcla de reacción para detectar el clon positivo.

Expresión y purificación de neuquinasa humana

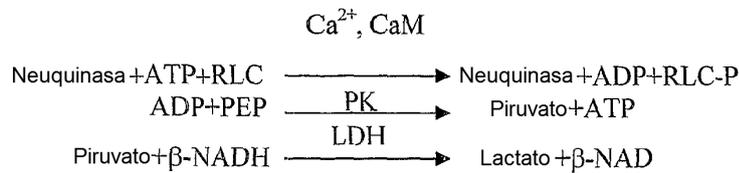
Se sembraron $5,4 \times 10^6$ células de insecto sf9 en una placa de 10 cm en medio de Grace para insecto (Invitrogen) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante este tiempo, se añadieron 24 μg de báculo que contenía el ADNc de neuquinasa humana (Báculo/neuquinasa) a 1,5 ml de medio de Grace (sin antibióticos ni FBS) y se mezcló. Se mezclaron 60 μl de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) con 1,5 ml de medio de Grace (sin antibióticos ni FBS) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La solución que contenía báculo/neuquinasa se mezcló con la Lipofectamine™ 2000 diluida y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadieron 2 ml de medio de Grace (sin antibióticos ni FBS), y la solución entera se añadió a células sf9 después de sustitución del medio. Después de 5 horas de incubación, se separó el medio a 27°C y se sustituyó por 10 ml de medio de Grace (con 100 U de estreptomina, 100 U de ampicilina y FBS al 10%). El medio se recogió después de 72 horas de incubación a 27°C. El medio se centrifugó durante 5 min a 500g, y el líquido sobrenadante que contenía virus se almacenó a 4°C en la oscuridad para un almacenamiento a corto plazo y a -80°C para almacenamiento a largo plazo.

La solución que contenía virus se añadió a células Sf9 que se dejó que se unieran al plástico del cultivo tisular durante 1 hora. Después las células se incubaron en medio que contenía virus a 27°C durante 72 horas, el medio se recogió, y se añadió una pequeña cantidad a 100 ml de una suspensión de células Sf9 en una botella (2×10^6 células/ml). La suspensión se incubó a 27°C durante 84 horas con agitación (velocidad de agitación: 130 rpm). Después de incubación, la suspensión celular se recogió y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min, y se separó el líquido sobrenadante. Después se añadió tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, vanadato sódico 2 mM, PMSF 2 mM, cóctel de inhibidor de proteasa (Roche, 1 trozo para 25 ml)) al sedimento celular y la suspensión celular se trató con ultrasonidos antes de la centrifugación a 12000 rpm durante 20 min. Después el líquido sobrenadante se filtró antes de cargar en una columna de níquel (Ni sefarosa, de alto rendimiento, GE) para purificar la neuquinasa humana. La solución de proteína se cargó en una columna de

filtración en gel (columna de desalación HiTrap, GE) para purificar más la proteína, y la proteína se lavó de la columna con tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 al 0,02%, DTT 2 mM, glicerol al 20%. La solución de neuquinasa humana se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80°C.

5 Evaluación de la actividad de neuquinasa humana

A continuación se proporciona un método de ejemplo para determinar la actividad de neuquinasa in vitro. La fosforilación de la RLC por la neuquinasa implica las siguientes reacciones y productos de reacción:



10 En la fórmula, PEP significa fosfoenolpiruvato; PK significa piruvato quinasa; β -NADH significa dinucleótido de β -nicotinamida y adenina (forma reducida); LDH significa láctico deshidrogenasa; y β -NAD significa dinucleótido de β -nicotinamida y adenina (forma oxidada).

15 Por lo tanto, la actividad de neuquinasa se puede determinar midiendo la tasa de disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm, que es proporcional a la tasa de hidrólisis de ATP en estado de equilibrio por la neuquinasa. Este ensayo también se puede usar para detectar agentes que potencian o inhiben la actividad de neuquinasa. En el ensayo, una reacción de 800 μ l comprende: Tris 20 mM, pH 7,5, KCl 60 mM, DTT 1 mM, MgCl_2 3,75 mM, ATP 1 mM, CaCl_2 0,3 μ M, PEP 1,5 mM, PK 20 U/ml, LDH 20 U/ml, RLC 90 μ M, β -NADH 250 μ M, CaM 1 μ M y neuquinasa 100 nM, $\Delta\text{DO}/\text{min}/\text{nmol}$ de neuquinasa = 0,0152/min/nmol de neuquinasa.

Listado de secuencias

- <110> Zensun (Shanghai) Science & Technology LTD.
- 20 <120> Neuquinasa, una proteína corriente abajo de neuregulina
- <130> 102051PCEPT1T1
- <140> Solicitud divisional basada en EP 12154752.5
- <141> 2007-08-21
- <150> US 60/839,388
- 25 <151> 2006-08-21
- <150> US 60/921,655
- <151> 2007-04-02
- <160> 25
- <170> PatentIn version 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 786
- <212> PRT
- <213> Rattus rattus
- <400> 1

ES 2 625 316 T3

Met Ser Gly Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu Gly Leu Gly Pro Gln Gly
 1 5 10 15

Leu Pro Ala Leu Gly Gly Ala Cys Leu Val Thr Val Asp Lys Lys Leu
 20 25 30

Asn Val Leu Thr Glu Lys Val Asp Arg Leu Leu His Phe Gln Glu Asp
 35 40 45

Val Thr Glu Lys Leu Gln Cys Val Cys Gln Gly Met Asp His Leu Glu
 50 55 60

Gln Gly Leu His Arg Leu Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Pro Gly Ser Thr Ser Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ala Trp Pro Glu Val
 85 90 95

Leu Glu Leu Val Arg Ala Val Arg Gln Glu Gly Ala Gln His Gly Ala
 100 105 110

Arg Leu Glu Ala Leu Phe Lys Met Val Val Ala Val Asp Arg Ala Ile
 115 120 125

Thr Leu Val Gly Ser Thr Ile Gln Asn Ser Lys Val Asp Asp Phe Ile
 130 135 140

ES 2 625 316 T3

Leu Gln Gly Thr Val Pro Trp Arg Lys Gly Ser Leu Ala Asp Gly Pro
 145 150 155 160
 Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala Glu Val Ala Gly Val Lys Pro Lys His
 165 170 175
 Val Leu Asn Thr Gly Ser Val Gln Ala Ala Thr Ser Arg Ala Leu Trp
 180 185 190
 Glu Glu Ser Gln Lys Gln Asp Thr Pro Val Gly Thr Val Glu Gly Leu
 195 200 205
 Pro Leu Ile Ile Asp Thr Ser Leu Lys Gly Ala Asp Leu Thr Gln Ala
 210 215 220
 Gly Ala Ser Leu Arg Gln Gly Val Glu Ala Leu Asp Pro Gly Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Pro Pro Thr Glu Ala Glu Ser Arg Leu Pro Ala Leu Ala Ser Glu
 245 250 255
 Asp Thr Gly Thr Thr Leu Glu Leu Ser Val Ala Ile Asp Arg Ile Ser
 260 265 270
 Glu Val Leu Thr Ser Leu Arg Met Ser Gln Ser Ala Gly Glu Gly Thr
 275 280 285
 Ser Ser Ser Lys Pro Asp Cys Ser Glu Pro Gly Pro Gln Pro Leu Gly
 290 295 300
 Pro Leu Thr Thr Asp Ser Asp Ile His Ser Asp Glu Gly Leu Pro Arg
 305 310 315 320
 Ile Ser Val Arg Met Arg Glu Met Thr Thr Pro Glu Glu Leu Phe Glu
 325 330 335
 Thr Gln Gly Gly Ser Pro Ile Gly Ser Ala Glu Ala Pro Gly Pro Gly
 340 345 350
 Thr Val Leu Glu Asp Gln Ile Pro Lys Gly Ala Arg Pro Phe Pro Pro
 355 360 365
 Leu Pro Lys Arg Ser Cys Asn Asn Gly Gly Ala Ser Ala Glu Glu Ala
 370 375 380
 Thr Gly Pro Gly Ala Glu Pro Ile Arg Gly Pro Ser Leu Val Thr Arg
 385 390 395 400

ES 2 625 316 T3

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

ES 2 625 316 T3

645 650 655

Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met Leu
660 665 670

Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr Met
675 680 685

Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe Lys
690 695 700

Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val Lys
705 710 715 720

Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu Trp
725 730 735

Leu Asn His Leu Ile Ala Lys Ala Ser Gly Ser Asn Val Arg Leu Arg
740 745 750

Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys Tyr Met Ala Gln Arg Lys Trp Lys Lys
755 760 765

His Phe His Val Val Thr Ala Val Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro Thr
770 775 780

Cys Pro
785

<210> 2
<211> 795
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 2
Met Asp Thr Lys Leu Asn Met Leu Asn Glu Lys Val Asp Gln Leu Leu
1 5 10 15

His Phe Gln Glu Asp Val Thr Glu Lys Leu Gln Ser Met Cys Arg Asp
20 25 30

Met Gly His Leu Glu Arg Gly Leu His Arg Leu Glu Ala Ser Arg Ala
35 40 45

Pro Gly Pro Gly Gly Ala Asp Gly Val Pro His Ile Asp Thr Gln Ala
50 55 60

Gly Trp Pro Glu Val Leu Glu Leu Val Arg Ala Met Gln Gln Asp Ala

ES 2 625 316 T3

Pro Gly Glu Met Leu Met Thr Gly Arg Gly Ser Leu Gly Pro Thr Leu
 325 330 335

Thr Thr Glu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Pro Gly Lys Gln Gly Pro Pro
 340 345 350

Gly Thr Gly Arg Cys Leu Gln Ala Pro Gly Thr Glu Pro Gly Glu Gln
 355 360 365

Thr Pro Glu Gly Ala Arg Glu Leu Ser Pro Leu Gln Glu Ser Ser Ser
 370 375 380

Pro Gly Gly Val Lys Ala Glu Glu Glu Gln Arg Ala Gly Ala Glu Pro
 385 390 395 400

Gly Thr Arg Pro Ser Leu Ala Arg Ser Asp Asp Asn Asp His Glu Val
 405 410 415

Gly Ala Leu Gly Leu Gln Gln Gly Lys Ser Pro Gly Ala Gly Asn Pro
 420 425 430

Glu Pro Glu Gln Asp Cys Ala Ala Arg Ala Pro Val Arg Ala Glu Ala
 435 440 445

Val Arg Arg Met Pro Pro Gly Ala Glu Ala Gly Ser Val Val Leu Asp
 450 455 460

Asp Ser Pro Ala Pro Pro Ala Pro Phe Glu His Arg Val Val Ser Val
 465 470 475 480

Lys Glu Thr Ser Ile Ser Ala Gly Tyr Glu Val Cys Gln His Glu Val
 485 490 495

Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln Val His Arg Cys Thr Glu Lys Ser
 500 505 510

Thr Gly Leu Pro Leu Ala Ala Lys Ile Ile Lys Val Lys Ser Ala Lys
 515 520 525

Asp Arg Glu Asp Val Lys Asn Glu Ile Asn Ile Met Asn Gln Leu Ser
 530 535 540

His Val Asn Leu Ile Gln Leu Tyr Asp Ala Phe Glu Ser Lys His Ser
 545 550 555 560

Cys Thr Leu Val Met Glu Tyr Val Asp Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg
 565 570 575

ES 2 625 316 T3

Ile Thr Asp Glu Lys Tyr His Leu Thr Glu Leu Asp Val Val Leu Phe
 580 585 590

Thr Arg Gln Ile Cys Glu Gly Val His Tyr Leu His Gln His Tyr Ile
 595 600 605

Leu His Leu Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Val Asn Gln Thr
 610 615 620

Gly His Gln Ile Lys Ile Ile Asp Phe Gly Leu Ala Arg Arg Tyr Lys
 625 630 635 640

Pro Arg Glu Lys Leu Lys Val Asn Phe Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala
 645 650 655

Pro Glu Val Val Asn Tyr Glu Phe Val Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp
 660 665 670

Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met Leu Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe
 675 680 685

Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr Met Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser
 690 695 700

Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys
 705 710 715 720

Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val Lys Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser
 725 730 735

Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu Trp Leu Asn Asn Leu Pro Ala Lys
 740 745 750

Ala Ser Arg Ser Lys Thr Arg Leu Lys Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys
 755 760 765

Tyr Ile Ala Gln Arg Lys Trp Lys Lys His Phe Tyr Val Val Thr Ala
 770 775 780

Ala Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro Thr Ser Pro
 785 790 795

- <210> 3
- <211> 2728
- <212> DNA
- 5 <213> Rattus rattus

<400> 3

ES 2 625 316 T3

caagggcctg ggccaaactc agcctgtcgc tctctcagtg gttgagtggg agatagacac 60
 agagaacttg gccctctccg tccccacac agttcagtca ggaggacagg ttggttcctt 120
 gcagcaaggc tcttagcagc ggaggacaat ggccttccag acgttaccac caaagtgaga 180
 agcagaccct tcgtgctcca gtttccttgt ctttgccctt accaaaccag aattgggatg 240
 tcaggagttt cagaggagga tccagagggg ctggggcccc agggctctgcc agcgttgggc 300
 ggagcctgct tagtcaccgt ggacaaaaa cttaatgtgc tgactgagaa ggtcgacaga 360
 ctcttgcatc tccaagaaga tgtcacagag aagctacagt gtgtgtgcca aggcattggat 420
 cacctggaac aaggtctgca tcggctggag gcctcccagg agttgggtct gccagggccc 480
 ggcagcactt ccccagccgc tgctcaggcc gcattggcctg aggtcctgga gctggtgagg 540
 gccgtgcggc aggagggtgc ccagcacggt gccaggctcg aagccctctt caagatggtg 600
 gtggtgtggt acagggtctat tactttggtg ggggccacaa tccagaactc caaagtggat 660
 gatttcatcc tgcaaggagc cgtgccctgg aggaaaggca gtctggctga tggccctgag 720
 gagaacaagg agcaagcaga agtggtgga gtgaagccaa agcatgtgct gaatacagga 780
 agtgtgcaag ctgccacttc tagggcgtcg tgggaagaga gccagaagca ggacacaccc 840
 gtggggacag tggaggggct gcctctcact atcgatacgt cactgaaggg agctgacctc 900
 acccaggctg gagcctcact gaggcagga gttgaagctc ttgaccagg ccaagaaccc 960
 ccaccacag aggcagaatc caggcttctt gcactagcca gcgaggacac tgggaccacc 1020
 ctggaattgt ctgtagcaat tgacagaatc agtgaggtcc tcaactagcct caggatgtcc 1080
 caaagtgctg gcgaaggaac ctcatccagc aagcctgact gttcagagcc tggccctcag 1140
 cccctagggc cactaactac agacagtgac attcacagtg atgaaggact tcccaggatc 1200
 tctgtccgta tgcgagagat gactactcct gaggagctgt ttgagaccca aggtggcagc 1260
 cccattggct cggcagaagc tccaggccct ggaactgtgt tagaagacca gatccctaaa 1320
 ggagccagac catttccacc cctgccaaaag aggagctgca acaatggtgg cgcgagtgca 1380
 gaggaggcaa cagggcctgg ggctgagccc atcagaggac caagcttggg cacaaggagc 1440
 tggagagatg aacctgttgg gaccacagac ctgcagcaag gcagagaccc aggagcgggtg 1500
 agccctgaac ctgggaagga ccatgcagcc cagggcccag ggagaaccga agctggaagg 1560
 aggggtgtctt ctgctgcaga ggctgccatc gtagttctag gtgacagcgc agcaccacca 1620
 gcccttttg aacaccgggt agtgagcacc aaagacaccc tcatctcgac aagttacaca 1680
 gtgtcccaac acgaagtctt gggagggggc cggtttgccc aggtgcacag gtgtacagag 1740
 cggccacag gccttgcaact ggcagccaag atcatcaaag tgaagaacat aaaggaccgg 1800
 gaggatgtga agaattgagat caacatcatg aaccagctca gccacgtaa cttgatccaa 1860
 ctttatgatg cttttgagag caagaacagc ttcaccctga tcatggagta tgtggatgga 1920

ES 2 625 316 T3

ggtgaactct tcgaccggat cacggatgag aagtaccacc tgaccgagct ggatgtggtc 1980
 ttgttcacaa ggcagatctg tgaggggtg cttacctgc accagcacta cattctgcac 2040
 ctggacctca agccagagaa catactgtgt gtcagccaga ctgggcatca aattaagatt 2100
 attgactttg ggtggctag aagatataaa cctcgggaga agctaaaggt taactttggt 2160
 actccagagt tcctggctcc agaagttgtt aactatgagt ttgtctcatt cccaacagac 2220
 atgtggagtg tgggagttat cacctacatg ctactcagtg gtttgtcccc atttctaggg 2280
 gaaacagatg cagagacat gaattttatt gtgaactgca gctgggattt cgatgctgat 2340
 acctcaaaag gctgtcaga ggaagccaag gactttgttt cacggttgct ggtcaaagag 2400
 aagagttgta ggatgagcgc cacacagtgc ctgaacatg agtgggttaa tcacctgatt 2460
 gccaaagcct caggctcaa cgttcgctc agatcccaac tactgctgca gaaatatatg 2520
 gctcagcgta aatggaagaa acatttccat gtggtgactg cagtcaacag gctaagaaaa 2580
 tttccaacgt gtccctaata tacaactggg cctgggagtt cctgaggcga cacgcagtgg 2640
 taatgtgaag agatgactca ggattttatg gagtccaggag cttggctggt attgatotta 2700
 ttttgcaaag aatggtggaa ggaagaaa 2728

<210> 4

<211> 2648

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ctatagggcg acatatgatc gatgatatac catgggcggc cgctgcaga ccaggtctga 60
 caccaccgcc tgagtgagaa ccaggggtct gtgcctctcc tcattccccg ctcttgccct 120
 tgtcaagcct gcaccagcat gtcaggaacc tccaaggaga gtctggggca tggggggctg 180
 ccagggttgg gcaagacctg cttacaacc atggacacaa agctgaacat gctgaacgag 240
 aaggtggacc agctcctgca cttccaagaa gatgtcacag agaagttgca gagcatgtgc 300
 cgagacatgg gccacctgga gggggcctg cacaggctgg aggcctcccg ggcaccgggc 360
 ccgggcgggg ctgatggggg tccccacatt gacaccagc ctgggtggcc cgaggtcctg 420
 gagctggtga gggccatgca gcaggatgcg gccagcacg gtgccaggct ggaggccctc 480
 ttcaggatgg tggctgcggt ggacagggcc atcgctttgg tgggggccac gttccagaaa 540
 tcaaaggtgg cggatttctt catgcagggg cgtgtgccct ggaggagagg cagcccaggt 600
 gacagccctg aggagaataa agagcgagtg gaagaagagg gaggaaaacc aaagcatgtg 660
 ctgagcacca gtgggggtgca gtctgatgcc agggagcctg ggaagagag ccagaaggcg 720
 gacgtgctgg aggggacagc ggagaggctg cccccatca gagcgtcagg gctgggagct 780
 gaccccgccc aggcagtggt ctcaccgggc caggagatg gtgttcctgg cccagcccag 840

ES 2 625 316 T3

gcattccctg gccacctgcc cctgccaca aaggtggaag ccaaggctcc tgagacaccc 900
 agcgagaacc tcaggactgg cctggaattg gctccagcac ccggcagggc caatgtggtc 960
 tccccgagcc tggagggtgc accaggtgca ggacaaggag catcgtccag caggcctgac 1020
 cctgagccct tagaggaagg cacgaggctg actccagggc ctggccctca gtgcccaggg 1080
 cctccagggc tgccagccca ggccagggca acccacagtg gtggagaaac acctccaagg 1140
 atctccatcc acatacaaga gatggatact cctggggaga tgctgatgac aggcaggggc 1200
 agccttgac ccaccctcac cacagaggct ccagcagctg cccagccagg caagcagggc 1260
 ccacctggga ccgggcgctg cctccaagcc cctgggactg agcccggaga acagaccct 1320
 gaaggagcca gagagctctc cccgctgcag gagagcagca gccccggggg agtgaaggca 1380
 gaggaggagc aaagggctgg ggccgagcct ggcacgagac caagcttggc caggagtgac 1440
 gacaatgacc acgaggttgg ggccctgggc ctgcagcagg gcaaaagccc aggggcggga 1500
 aaccctgagc ctgagcagga ctgtgcagcc agggctccgg tgagagctga agcagtaagg 1560
 aggatgcccc caggcgccga ggctggcagc gtggttctgg atgacagtcc ggccccacca 1620
 gctccttttg aacaccgggt agtgagcgtc aaggagacct ccatctctgc gggttacgag 1680
 gtgtgccagc acgaagtctt gggagggggg cggtttgcc aggtccacag gtgcacagag 1740
 aagtccacag gcctcccact ggctccaag atcatcaaag tgaagagcgc caaggaccgg 1800
 gaggagctga agaacgagat caacatcatg aaccagctca gccacgtgaa cctgatccag 1860
 ctctatgacg ccttcgagag caagcacagc tgcacccttg tcatggagta cgtggacggg 1920
 ggtgagctct tcgaccgat cacagatgag aagtaccacc tgactgagct ggatgtggtc 1980
 ctgttcacca ggcagatctg tgagggtgtg cttacctgc accagcacta catcctgcac 2040
 ctggacctca agccggagaa catattgtgc gtcaatcaga caggacatca aattaagatc 2100
 attgactttg ggctggccag aaggtacaag cctcgagaga agctgaagg gaacttcggc 2160
 actcctgagt tcttgcccc agaagtcgtc aattatgagt ttgtctcatt cccacagac 2220
 atgtggagtg tgggagtcac cacctacatg ctactcagtg gcttgtcccc atttctaggg 2280
 gaaacagatg cagagacat gaatttcatt gtaaactgta gctgggattt tgatgctgac 2340
 accttgaag ggctctcga ggagccaag gactttgtt cccggttgct ggtcaaagag 2400
 aagagctgca gaatgagtgc cacacagtgc ctgaaacacg agtggctgaa taattgcct 2460
 gccaaagctt caagatccaa aactcgtctc aatcccaac tactgctgca gaaatacata 2520
 gctcaaagaa aatggaagaa acatttctat gtggtgactg ctgccaacag gtaagaaa 2580
 tttccaactt ctccctaate ttcaactctg ctaagactgg agatctggat ccctcgagtc 2640
 tagagtcg 2648

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 5
 gactcgagtc gacatogatt tttttttt ttttt 36

ES 2 625 316 T3

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 6
 atgtcaggag tttcagagga 20

10 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 7
 ctggaattct cacagtgacg tatcgatgat 30

<210> 8
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Molde para sondas

<400> 8
 atgtcaggag tttcagagga ggatccagag ggtctgggccc cccagggctct gccagcgttg 60
 ggcggagcct gcttagtcac cgtggacaaa aaacttaatg tgctgactga gaaggtcgac 120
 agactcttgc atttccaaga agatgtcaca gagaagctac agtgtgtgtg ccaaggcatg 180
 gatcacctgg aacaaggctct gcatcggctg gaggcctccc aggagttggg tctggcaggg 240
 cccggcagca cttccccagc cgctgctcag gccgcatggc ctgaggtcct ggagctggtg 300
 agggccgtgc ggcaggaggg tgcccagcac ggtgccaggc tcgaagccct cttcaagatg 360
 gtggtggctg tggacagggc tattactttg gtagggtcca caatccagaa ctccaaagtg 420
 gatgatttca tcctgcaagg gaccgtgcc tggaggaaag gcagtctggc tgatggccct 480
 gaggagaaca aggagcaagc agaagtggct ggagtgaagc caaagcatgt gctgaataca 540
 ggaagtgtgc aagctgccac ttctagggcg ctgtgggaag agagccagaa gcaggacaca 600
 cccgtgggga cagtggaggg gctgcctctc atcatogata cgtcactgtg agaattcaag 660

25

<210> 9
 <211> 743
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia diana para conjunto de sondas 1382239 in Affymetrix Rat expression array 230 2.0

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (125)..(125)
 <223> n is a, c, g, or t

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (333)..(333)
 <223> n is a, c, g, or t

40

ES 2 625 316 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (377)..(377)
 <223> n is a, c, g, or t

5 <400> 9
 agttgtagga tgagcgccac acagtgcctg aaacatgagt ggttaaatca cctgattgcc 60
 aaagcctcag gtcoccaagt tcgcctcaga tccaactac tgctgcagaa atatatggct 120
 cagcntaaat ggaagaaaca tttccatgtg gtgactgcag tcaacaggct aagaaaattt 180
 ccaacgtgtc cctaactctac aactgggcct gggagtctct gaggcgacac gcagtggtaa 240
 tgtgaagaga tgactcagga ttttatggag tcaggagctt ggctgttatt gatcttattt 300
 tgcaaagaat ggtggaagga agaaagagag aangaaagaa gaaaaggaa aaggaaagaa 360
 gatggctacg ttgctgncct ccttgtggat gaaagtgtgt ttttttaaag ccctaggaag 420
 gtcaccaggt ctaatgctgc ctccctccca gagccctctc ttctggtaat gagagtaggc 480
 acgctcagga agggcagga aatcctactt gccctttggt caaattcaat tctaaactcg 540
 tcatgattaa agaagccagt agggagggaa gcatgggaca gggaggaatt aggtctgaca 600
 gtgggaagga acatgatcga aacatactgt ataacattct taaagaatta ataaaatgta 660
 tttttaaagg agtcagtagg ttcgagctgc ttgctatatt agtgaaagaa gctccttttt 720
 ttttcagtga gtaatagtgc aaa 743

<210> 10
 <211> 635
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para conjunto de sondas 1376789 en el Rat expression array 230 2.0 Affymetrix

<220>
 <221> característica_misc
 15 <222> (29)..(29)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (143)..(143)
 20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (337)..(337)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 10

ES 2 625 316 T3

```

ggagtcagta ggttcgagct gcttgctant ttagtgaaag aagctccttt tttttttca      60
gtgagtaata gtgcaaagat tcagaattga tcaaaatgca aactgcactc aactctgggt      120
gagtcaatcc tcccccatcc aangctcagg gagcgtctca gaacagggga cagaaagaac      180
gtaagagttg gtagatgagg aggagtccta ggggatgtct ttgagacatg acatgacttg      240
tgttggcatc aatttacaat atctttggct acctgcacaa gatcaagtcg gccaaaattc      300
cagtgaggat gggaggaaac tcctgaggcc caccctntac tggaggagct actggcaatt      360
gttggctgat gaggcagga gaattgttct tctttaacct ctagcagtag ttgtttatgc      420
cccagtagat gctacatacc catgtgcaga tgggcagtac caattagact ggggaggtta      480
ctgatggcaa aaaataaat aaaaggagta cctgtaggta ggaaggagat ggagtggaaac      540
attagggaga attgggagca ggtagatgga tatgatcgat atgcattgta ctaatgtatg      600
gagtgttcaa agaataaaaa agtcatttaa aacag                                     635

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 11
gacaccaccg cctgagtgag aac          23

10 <210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Cebador

<400> 12
ccattggagc agcagagttg aaga        24

<210> 13
<211> 30
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13
25 cgcggatcca tggacacaaa gctgaacatg      30

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 14
ccttaagtca cgtggccccc accaaagcga t      31

35 <210> 15
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

ES 2 625 316 T3

<220>

<223> Fragmento de cDNA de neuquinasa humana

<400> 15

```

atggacacaa agctgaacat gctgaacgag aaggtggacc agctcctgca cttccaagaa      60
gatgtcacag agaagttgca gagcatgtgc cgagacatgg gccacctgga gcggggcctg      120
cacaggctgg aggcctcccg ggcaccgggc cggggcgggg ctgatggggt tccccacatt      180
gacaccccagg ctgggtggcc cgaggtcctg gagctggtga gggccatgca gcaggatgca      240
gcccagcacg gtgccaggct ggaggccctc ttcaggatgg tggctgcggt ggacagggcc      300
atcgctttgg tgggggccac g                                             321
  
```

5

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

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

15

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 17

20 ggggaattcca tatggcacct aagaagcaaa agaa 34

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador

<400> 18

ccgctcgagg tccttctctt ctccgtgggt g 31

<210> 19

ES 2 625 316 T3

<211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Met Ala Pro Lys Lys Ala Lys Lys Arg Ala Gly Gly Ala Asn Ser Asn
 1 5 10 15
 Val Phe Ser Met Phe Glu Gln Thr Gln Ile Gln Glu Phe Lys Glu Ala
 5 20 25 30
 Phe Thr Ile Met Asp Gln Asn Arg Asp Gly Phe Ile Asp Lys Asn Asp
 35 40 45
 Leu Arg Asp Thr Phe Ala Ala Leu Gly Arg Val Asn Val Lys Asn Glu
 50 55 60
 Glu Ile Asp Glu Met Ile Lys Glu Ala Pro Gly Pro Ile Asn Phe Thr
 65 70 75 80
 Val Phe Leu Thr Met Phe Gly Glu Lys Leu Lys Gly Ala Asp Pro Glu
 85 90 95
 Glu Thr Ile Leu Asn Ala Phe Lys Val Phe Asp Pro Glu Gly Lys Gly
 100 105 110
 Val Leu Lys Ala Asp Tyr Val Arg Glu Met Leu Thr Thr Gln Ala Glu
 115 120 125
 Arg Phe Ser Lys Glu Glu Val Asp Gln Met Phe Ala Ala Phe Pro Pro
 130 135 140
 Asp Val Thr Gly Asn Leu Asp Tyr Lys Asn Leu Val His Ile Ile Thr
 145 150 155 160
 His Gly Glu Glu Lys Asp
 165

<210> 20
 <211> 48
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 20
 15 catcatctgg tccgcgtgg atctatgtca ggaacctcca aggagagt 48

<210> 21
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 21
 cggaattccc attggagcag cagagttgaa g 31

<210> 22
 25 <211> 41

ES 2 625 316 T3

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 22
 cgggatccat gcatcatcat catcatcatc tgggtccgcg t 41

<210> 23
 <211> 17
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 23
 gttttcccag tcacgac 17

15 <210> 24
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Cebador

<400> 24
 cggaattccc attggagcag cagagttgaa ga 32

<210> 25
 <211> 819
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Met Ser Gly Thr Ser Lys Glu Ser Leu Gly His Gly Gly Leu Pro Gly
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Thr Cys Leu Thr Thr Met Asp Thr Lys Leu Asn Met Leu
 20 25 30

Asn Glu Lys Val Asp Gln Leu Leu His Phe Gln Glu Asp Val Thr Glu
 35 40 45

Lys Leu Gln Ser Met Cys Arg Asp Met Gly His Leu Glu Arg Gly Leu
 50 55 60

His Arg Leu Glu Ala Ser Arg Ala Pro Gly Pro Gly Gly Ala Asp Gly
 65 70 75 80

Val Pro His Ile Asp Thr Gln Ala Gly Trp Pro Glu Val Leu Glu Leu
 85 90 95

ES 2 625 316 T3

Val Arg Ala Met Gln Gln Asp Ala Ala Gln His Gly Ala Arg Leu Glu
 100 105 110

Ala Leu Phe Arg Met Val Ala Ala Val Asp Arg Ala Ile Ala Leu Val
 115 120 125

Gly Ala Thr Phe Gln Lys Ser Lys Val Ala Asp Phe Leu Met Gln Gly
 130 135 140

Arg Val Pro Trp Arg Arg Gly Ser Pro Gly Asp Ser Pro Glu Glu Asn
 145 150 155 160

Lys Glu Arg Val Glu Glu Glu Gly Gly Lys Pro Lys His Val Leu Ser
 165 170 175

Thr Ser Gly Leu Gln Ser Asp Ala Arg Glu Pro Gly Glu Glu Ser Gln
 180 185 190

Lys Ala Asp Val Leu Glu Gly Thr Ala Glu Arg Leu Pro Pro Ile Arg
 195 200 205

Ala Ser Gly Leu Gly Ala Asp Pro Ala Gln Ala Val Val Ser Pro Gly
 210 215 220

Gln Gly Asp Gly Val Pro Gly Pro Ala Gln Ala Phe Pro Gly His Leu
 225 230 235 240

Pro Leu Pro Thr Lys Val Glu Ala Lys Ala Pro Glu Thr Pro Ser Glu
 245 250 255

Asn Leu Arg Thr Gly Leu Glu Leu Ala Pro Ala Pro Gly Arg Val Asn
 260 265 270

Val Val Ser Pro Ser Leu Glu Val Ala Pro Gly Ala Gly Gln Gly Ala
 275 280 285

Ser Ser Ser Arg Pro Asp Pro Glu Pro Leu Glu Glu Gly Thr Arg Leu
 290 295 300

Thr Pro Gly Pro Gly Pro Gln Cys Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ala
 305 310 315 320

Gln Ala Arg Ala Thr His Ser Gly Gly Glu Thr Pro Pro Arg Ile Ser
 325 330 335

Ile His Ile Gln Glu Met Asp Thr Pro Gly Glu Met Leu Met Thr Gly
 340 345 350

ES 2 625 316 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado de un agente que afecta a la actividad de neuquinasa, que comprende:
 - (a) poner en contacto in vitro dicho agente con una célula que expresa un polipéptido de neuquinasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y
 - 5 (b) evaluar la actividad biológica de dicha neuquinasa en la célula, en donde la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en autoinhibición, fosforilación de la cadena ligera de la miosina cardíaca y expresión de dicha neuquinasa.
2. Un método de cribado de un agente que afecta a la actividad de neuquinasa, que comprende:
 - (a) administrar dicho agente a un animal transgénico no humano, en donde dicho animal expresa de forma recombicante un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neuquinasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o en donde dicho animal comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4; y
 - 10 (b) evaluar en dicho animal una alteración en la función cardíaca afectada por dicho agente.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha función cardíaca se selecciona del grupo que consiste en el tamaño del tabique interventricular, dimensión diastólica final ventricular izquierda, grosor de la pared posterior, dimensión sistólica final ventricular izquierda, fracción de eyección, acortamiento fraccional y ciclo cardíaco.
- 15 4. Un método de detección de la presencia de un ácido nucleico en una muestra, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; o en donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, en donde el método comprende:
 - 20 (a) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico que hibrida con dicho ácido nucleico; y
 - (b) determinar si dicho ácido nucleico se une a un ácido nucleico en la muestra.
5. Un método in vitro de modulación de la actividad de neuquinasa en una célula que comprende inhibir el dominio autoinhibidor del polipéptido neuquinasa, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
- 25 6. Un método in vitro de aumento de la expresión del gen de neuquinasa en la célula cardíaca de un mamífero, que comprende administrar a la célula un ácido nucleico aislado, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido de neuquinasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; o en donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4.
- 30 7. Un ácido nucleico aislado para usar en un método para tratar, prevenir o retrasar un trastorno de la función cardíaca, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido neuquinasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; o en donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4.
- 35 8. El ácido nucleico aislado para usar de la reivindicación 7, en donde el trastorno de la función cardíaca se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmias, miocardiopatía hipertrófica familiar, enfermedad cardíaca isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, miocarditis e hipertrofia de células musculares ventriculares.
9. Un polipéptido aislado para usar en un método para tratar, prevenir o retrasar un trastorno de la función cardíaca, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
- 40 10. El polipéptido aislado para usar de la reivindicación 9, en donde el trastorno de la función cardíaca se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmias, miocardiopatía hipertrófica familiar, enfermedad cardíaca isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, miocarditis e hipertrofia de células musculares ventriculares.

FIGURA 1

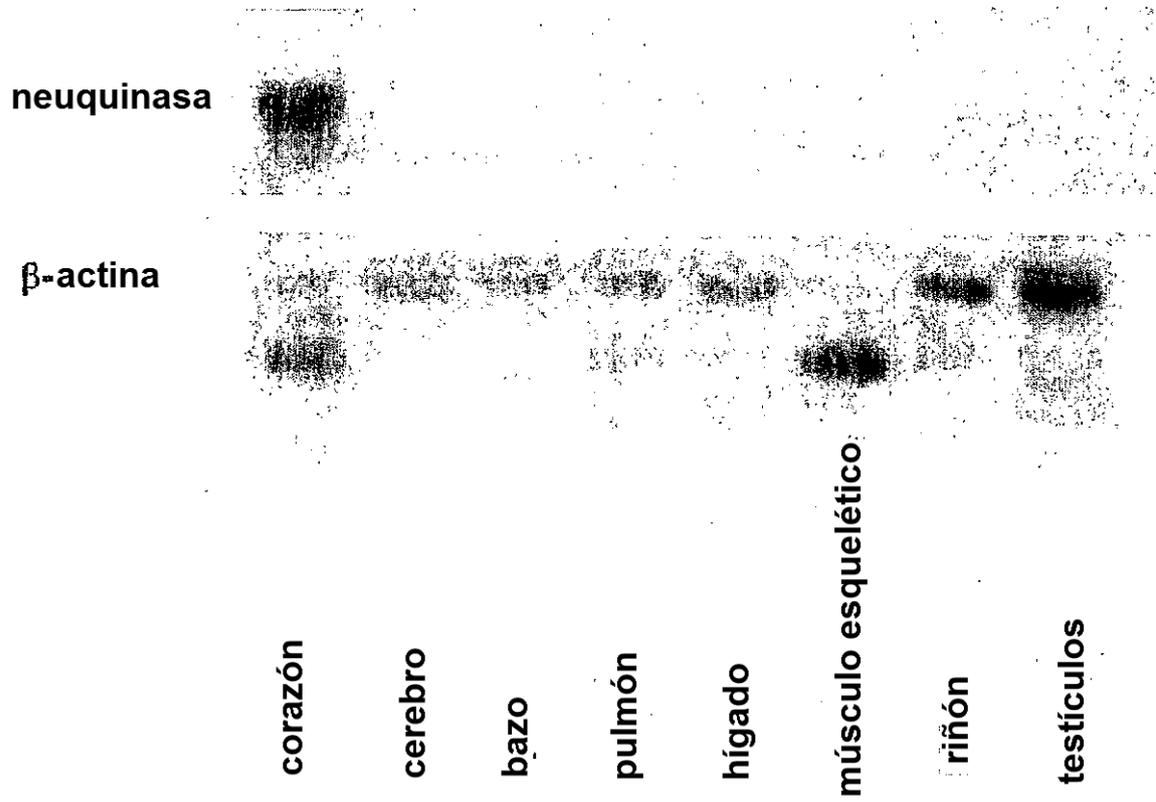


FIGURA 2

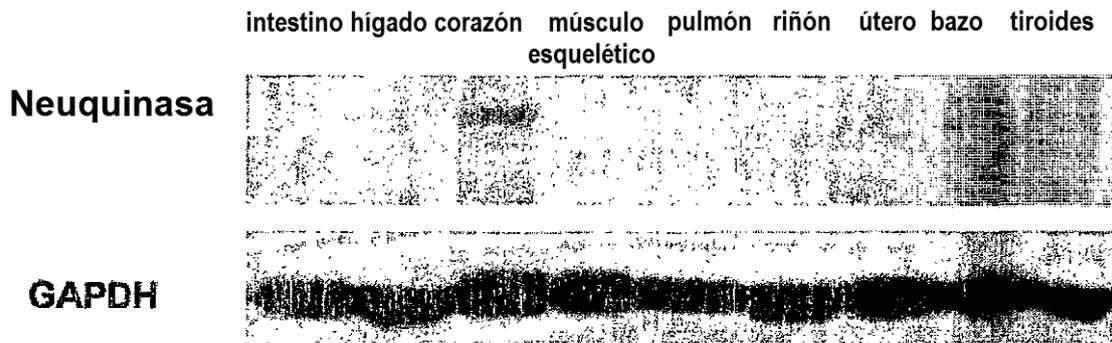
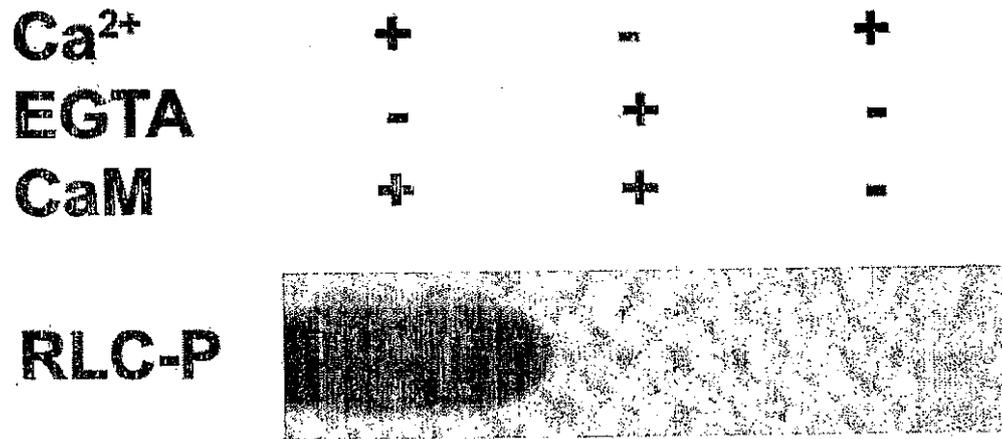


FIGURA 3



r.NK MSGVSEEDPEGLGPQGLPALGGACLVYK... CVVQG
h.NK -----MT... N... Q... S... MRD
s.MLCK -----A... NGAVE... GI... NPS... D... AP...
consenso -----vd-kinmltEkvd-iLhfQedvTeKlq-vc--m

r.NK D... Q... QEL... LA... GSTSPAA... A... Y... EG... K...
h.NK G... R... A... A... P... K... A... G... ADGVPHID... G... W... Q... D... A... R...
s.MLCK -KGPT... ERP... A... G... K... D... P... D... -KKA... DPPT... K... DAKAP... SEK... D...
consenso -hle-GlhrLeAsrepGpaggp-qaawFeviaLvravrqeaaghGarlealfkm

r.NK V... T... S... I... N... D... T... K... L... L... QA... VA... V... N...
h.NK A... A... A... A... P... K... A... L... M... R... P... S... R... V... E... E... G... S...
s.MLCK -TLA... P... TSS... -KGE... DR... G... A... GS...
consenso v-avdrai-lvGst-Q-Skv-dfilQG-vPwrkGs-gdgpEenke--e-g-kpkhvl-t

r.NK GSV... AATS... ALW... Q... V... G... G... L... IDTS... KG... LT... LR... VEAL... E...
h.NK SGL... SD... E... G... A... VL... RA... R... P... RA... G... G... P... VV... PG... ADGVFG... A... A...
s.MLCK -GP... AALP... QTA... TR... K... K... K... EQ... GS...
consenso --vq--ar-pgeesQk-dtpe-tve-lp-i--t-l--ad-aqagaS--Qg---dPgg-

r.NK P... EA... SRL... ALA... DTG... T... SV... ID... ISE... LT... NSQS... T... K... -
h.NK F... GHLPL... KV... AKA... ETP... NL... R... G... AP... PG... VNV... SP... E... APG... Q... A... P...
s.MLCK -----GKK... A... QAAA... RG...
consenso -p-----pt--e-r-p--ss--t-lel--a--ri--v--slrva--AgeG-ssbrpd-

r.NK -----CSK... PL... -LT... DSDI... D... GL... VRMR... T... FE... QG...
h.NK EPLEEGTRLTPG... CP... PGLPAQARAT... GG... TP... IHTQ... D... G... M... GR...
s.MLCK -----SPAF... -P... C... A... -IBS... K... AKK...
consenso -----pqpq--gp-----t--iS--et-FxIsv-m-emptpeell-t--gg

r.NK P... IGS... EA... VLED... I... K... PFP... PKR... CNN... S...
h.NK LGPTLTTEAPA... AQ... KQGPPGTGRCLQA... PG... ELS... QE... SS... V...
s.MLCK -----P... EAS... L... F... V... -NTHSPED... R... P...
consenso -----a--pg-----Pgte--eqtpeGar--Pi--ss-pggaka

r.NK ATGP... IRG... V... R... WR... EP... TTD... RD... VS... GK... H... Q... G... T... G...
h.NK EQRA... GTR... ARS... DN... HE... ALG... GN... EQ... C... RA... VA... V...
s.MLCK -GKNIL... SQ... EV... G... EK... PG... -QA... QAKM... GDT... R... IEFQAVP... SE... K... EV... QALCL... T...
consenso EEa--gAEP-r-psl-t-d--d--vg--lQqgrpGa--pep--d--aa-gpgr-eagr

r.NK ...
h.NK ...
s.MLCK ...
consenso ...

r.NK ... NI ...
h.NK ... SA ...
s.MLCK ... KQTP ... K ... M ... LL ... EV ... N ... R ... A ... I ... TP ... EIV ... F ... LE ...
consenso ksTGL-LAAKiIKvks-KDrEdVknEInimNQLsEvNLIQLYdAfEskhs-tLiMEYvdG

r.NK ... S ...
h.NK ... V ... D ... V ... TMV ... V ... D ... ILEM ... KMRV ... T ... LV ...
s.MLCK ...
consenso GELFdrItDEkYHLTEIdvvlFtRQICeGvhyIHqhyiLHLDLEPENILCVaqtGHqiKI

r.NK ... N ... N ... S ... DQT ... DR ... M ...
h.NK ...
s.MLCK ...
consenso IDFG LARRY)PrEKLVNFGTPEFLaPEVVNYefvSfpTDMWSvGVITYMLLGLSPFLG

r.NK ... K ... H ... I ...
h.NK ...
s.MLCK ... DD ... T ... E ... NVLSGN ... Y ... EE ... LAV ... D ... N ... R ... DQRA ... N ... A ... A ... P ... A ... A ...
consenso etDaEtMnfivncsWdFDadTFglSeEAKDFVSrLlVKeKscRMaAtQCLkHeWLNal-

r.NK ...
h.NK ...
s.MLCK ...
consenso ...