

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 251**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12Q 1/6876** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 17169885 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3255146**

54 Título: **Composiciones y procedimientos que comprenden variantes de splicing de histidil-tarn sintetasa que tienen actividades biológicas no canónicas**

30 Prioridad:

**16.03.2009 US 160630 P**

**03.09.2009 US 239747 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2020**

73 Titular/es:

**PANGU BIOPHARMA LIMITED (50.0%)**  
**Edinburgh Tower, 18/F The Landmark 15 Queen's**  
**Road Central**  
**Hong Kong, CN y**  
**ATYR PHARMA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZHOU, JIE;**  
**LAU, CHING FUN;**  
**XU, ZHIWEN;**  
**LO, WING SZE;**  
**PIEHL, KRISTI HELEN y**  
**GREENE, LESLIE ANN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o**  
**Bemerkungen) en el folleto original publicado por**  
**la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 742 251 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

Composiciones y procedimientos que comprenden variantes de splicing de histidil-tARN sintetasa que tienen actividades biológicas no canónicas

5

## DECLARACIÓN SOBRE EL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias asociado a esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia impresa, y por la presente se incorpora por referencia a la especificación. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de secuencias es 120161\_415PC\_SEQUENCE\_LISTING.txt. El archivo de texto es de 20 KB, fue creado el 16 de marzo de 2010 y se enviará electrónicamente mediante EFS-Web.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a polinucleótidos y polipéptidos variantes de splicing de histidil-tARN sintetasa (HRS), composiciones que comprenden dichos polinucleótidos y polipéptidos, y procedimientos de uso de los mismos.

20

Descripción de la técnica relacionada

Las proteínas de aminoacil-tARN sintetasa (AARS), que catalizan la aminoacilación de moléculas de tARN, son esenciales para decodificar información genética durante el procedimiento de traducción. Cada una de las tARN sintetasa eucariotas consiste en una enzima principal, que está relacionada estrechamente con la tARN sintetasa procarionta, así como dominios adicionales que están añadidos al extremo amino-terminal, extremo carboxilo-terminal o insertados en una región interna a la enzima principal. La tirosil-tARN sintetasa (TyrRS), por ejemplo, tiene un dominio carboxilo-terminal que no es parte de las moléculas de TyrRS procariontas y eucariotas inferiores.

30 Varias aminoacil-tARN sintetasa han demostrado tener funciones no canónicas distintas de su implicación en la traducción. Por ejemplo, Mini-tirosil tARN sintetasa (mini-TyrRS), el dominio N-terminal de TyrRS que corresponde a los residuos de aminoácidos 1-364 y es escindido por elastasa y plasmina de células polimorfonucleares, es un miembro de las proteínas y péptidos similares a citoquina multifunción aminoacil tARN sintetasa "AARS". In vitro, la Mini-TyrRS ha demostrado estimular la activación y quimotaxis de neutrófilos, la proliferación y migración de células endoteliales, y es pro-angiogénica en membrana coriolantoidea de pollo (CAM) y en ensayos con matrigel en ratón. La Mini-TyrRS tiene un motivo ELR que, como CXC-quimioquinas tales como IL-8, confiere sus actividades de quimioquina y angiogénica. Como otras citoquinas que contienen ELR, la mutación de este motivo inhibe la unión y la estimulación por mini-TyrRS de leucocitos y la angiogénesis.

40 Además, formas truncadas de TrpRS han demostrado tener propiedades angiogénicas. En células humanas normales, hay dos formas de TrpRS que pueden ser detectadas: una forma fundamental que consiste en la molécula de longitud completa (residuos de aminoácidos 1-471) y una forma truncada secundaria. La forma secundaria se genera mediante la delección de un dominio amino-terminal a través de splicing alternativo del pre-mARN. Se ha determinado que el extremo amino de mini-TrpRS es el residuo metionina en la posición 48 de la molécula de TrpRS de longitud completa.

45 Como alternativa, TrpRS truncada puede generarse mediante proteólisis. Por ejemplo, la TrpRS bovina es altamente expresada en el páncreas y es secretada al jugo pancreático, dando como resultado de este modo la producción de una molécula de TrpRS truncada. Estudios adicionales indican que mini-TrpRS inhibe la proliferación y migración celular inducida por VEGF (Wakasugi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 173-177 (2002)). En particular, un ensayo de CAM de pollo muestra que mini-TrpRS bloquea la actividad angiogénica de VEGF. En contraste, la TrpRS de longitud completa no inhibe la angiogénesis. De este modo, la retirada de los primeros 48 residuos de aminoácidos expone la actividad anti-angiogénica de TrpRS. Por lo tanto, como con TyrRS, ciertas formas de TrpRS poseen actividades diferentes de la aminoacilación de tARN.

55 Dadas estas observaciones de actividades no canónicas y terapéuticamente relevantes asociadas con formas alternativas de TyrRS y TrpRS, existe una necesidad de identificar formas y/o actividades biológicamente relevantes de otras proteínas de aminoacil-tARN sintetasa con el fin de aprovechar el potencial terapéutico completo de esta familia de proteínas. Por consiguiente, la presente invención aborda estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

## 60 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, a polipéptidos variantes de splicing de HRS aislados que tienen actividades no canónicas; polinucleótidos variantes de splicing de HRS que codifican polipéptidos variantes de splicing de HRS; agentes de unión que se unen a polipéptidos de HRS; análogos, variantes y fragmentos de polipéptidos y polinucleótidos de HRS, así como composiciones y procedimientos de fabricación y uso de cualquiera de los anteriores.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos variantes de splicing de HRS aislados que tienen al menos una actividad biológica no canónica, así como fragmentos y variantes de los mismos bien activos.

10 Actividad "no canónica", tal como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a una actividad poseída por un polipéptido de HRS de la invención que es diferente de aminoacilación y, más específicamente, diferente de la adición de histidina sobre una molécula de tARN<sup>His</sup>. Tal como se describe en el presente documento, en ciertas realizaciones, una actividad no canónica mostrada por un polipéptido de HRS de la invención puede incluir, aunque no se limita a, modulación de la producción de citoquinas, modulación de la proliferación celular, modulación de la apoptosis, modulación de la señalización celular, modulación de la angiogénesis, modulación de la migración celular, modulación de la unión a células, modulación del metabolismo celular, y similares.

En una divulgación ilustrativa, el polipéptido variante de splicing de HRS de la invención es un fragmento de HRS que comprende al menos el dominio WHEP de HRS, por ejemplo, residuos de aminoácidos 3-43 de la proteína HRS de longitud completa humana. En otra realización, el polipéptido variante de splicing de HRS de la invención es un fragmento de HRS que comprende al menos el dominio de unión anticodón de HRS, por ejemplo, residuos de aminoácidos 406-501 de la proteína HRS humana de longitud completa. En otra realización más, el polipéptido variante de splicing de HRS es un fragmento de HRS que carece de un dominio de aminoacilación funcional, por ejemplo, residuos de aminoácidos 54-398 de la proteína HRS de longitud completa humana. En una realización más particular, el polipéptido variante de splicing de HRS comprende al menos el dominio WHEP y el dominio de unión anticodón pero carece de un dominio de aminoacilación funcional.

En una realización más específica, el polipéptido de HRS comprende una secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 6, 9 y 11, o es un fragmento contiguo de un polipéptido mostrado en las SEQ ID NO: 6, 9 y 11. De forma ilustrativa, los fragmentos pueden ser de esencialmente cualquier longitud, siempre que conserven al menos una actividad biológica no canónica de interés. Por ejemplo, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, dicho fragmento puede comprender al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 u 80, o más, residuos de aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 6, 9 u 11.

35 Se divulga, además, un polipéptido de HRS comprende una variante activa (es decir, conserva al menos una actividad biológica no canónica de interés) de una secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 6, 9 y 11. La variante activa es un polipéptido que tiene al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de identidad a lo largo de su longitud respecto a una secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 6, 9 u 11.

40 En otra divulgación, el polipéptido de HRS no es un polipéptido que consiste en los residuos 1-48 de la proteína HRS humana de longitud completa.

También se divulgan proteínas de fusión que comprenden al menos un polipéptido de HRS tal como se describe en el presente documento y un socio de fusión heterólogo.

45 Se divulgan, además, polinucleótidos que codifican los polipéptidos y proteínas de fusión tal como se describe en el presente documento, así como vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos, y una célula huésped que comprende dichos vectores de expresión. También se divulgan oligonucleótidos que hibridan específicamente con un polinucleótido de HRS, tal como los polinucleótidos de las SEQ ID NO: 5, 8 o 10. El oligonucleótido es un cebador, una sonda o un oligonucleótido antisentido. Otras realizaciones se refieren a agentes de ARNi que se dirigen a un polinucleótido de HRS. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos de agentes de ARNi hibridan específicamente con o se dirigen de otro modo a una unión de splicing que es exclusiva de la variante de splicing de HRS.

55 Según otro aspecto de la invención, se proporcionan agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los mismos) que tienen especificidad de unión por un polipéptido variante de splicing de HRS de la invención (por ejemplo, SEQ ID NO: 6, 9 y 11), o uno de sus socios de unión celulares. En ciertas realizaciones, el agente de unión es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígenos del mismo, un péptido, un peptidomimético, una molécula pequeña o un aptámero. En algunas realizaciones, el agente de unión antagoniza una actividad no canónica del polipéptido de HRS. En otras realizaciones, el agente de unión agoniza una actividad no canónica del polipéptido de HRS.

Según otro aspecto más de la invención, se proporcionan composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden transportadores fisiológicamente aceptables y al menos uno de los polipéptidos aislados, proteínas de fusión, anticuerpos, polinucleótidos aislados, vectores de expresión, células huésped, etc., de la invención, tal como se describe en el presente documento.

5 También se divulgan procedimientos de determinación de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótidos de una variante de splicing de HRS en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con uno o más oligonucleótidos que hibridan específicamente con una variante de splicing de HRS tal como se muestra en las SEQ ID NO: 5, 8 o 10, detectar la presencia o ausencia de los oligonucleótidos en la muestra, y determinar de  
10 este modo la presencia o los niveles de la secuencia de polinucleótidos de la variante de splicing de HRS.

También se divulgan procedimientos de determinación de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótidos de una variante de splicing de HRS en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos dos oligonucleótidos que amplifican específicamente una variante de splicing de HRS tal como se muestra  
15 en las SEQ ID NO: 5, 8 o 10, realizar una reacción de amplificación, detectar la presencia o ausencia de un producto amplificado, y determinar de este modo la presencia o los niveles de la secuencia de polinucleótidos de la variante de splicing de HRS. El uno o más oligonucleótidos hibridan específicamente con o amplifican específicamente una unión de splicing que es exclusiva de la variante de splicing de HRS. La divulgación incluye comparar la presencia o niveles de la variante de splicing de HRS con una muestra de control o un valor predeterminado. Divulgaciones específicas  
20 incluyen caracterizar el estado de la muestra para distinguirla del control. La muestra y el control comprende una célula o tejido, y el procedimiento comprende distinguir entre células o tejidos de diferentes especies, células de diferentes tejidos u órganos, células en diferentes estados del desarrollo celular, células en diferentes estados de diferenciación celular, o células sanas y enfermas.

También se divulgan procedimientos de identificación de un compuesto que se un específicamente a un polipéptido variante de splicing de HRS tal como se muestra en las SEQ ID NO: 6, 9 u 11, o uno o más de sus socios de unión celulares, que comprende a) combinar el polipéptido de HRS o su socio de unión celular o ambos con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas, y b) detectar la unión del polipéptido de HRS o su socio de unión celular o ambos al compuesto de ensayo, identificando de este modo un compuesto que se une específicamente al  
30 polipéptido de HRS o su socio de unión celular o ambos. El compuesto de ensayo es un polipéptido o péptido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo, un peptidomimético, o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo agoniza una actividad biológica no canónica del polipéptido de HRS o su socio de unión celular. En otras realizaciones, el compuesto de ensayo antagoniza una actividad biológica no canónica del polipéptido de HRS o su socio de unión celular. También están incluidos compuestos identificados mediante cualquiera  
35 de los procedimientos proporcionados en el presente documento.

También se divulgan procedimientos para modular la actividad celular poniendo en contacto una célula o tejido con una composición de la invención, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la actividad celular a modular se selecciona entre el grupo que consiste en producción de citoquinas, proliferación celular, apoptosis, señalización celular, metabolismo celular, angiogénesis, migración celular, unión celular, y similares. En una realización específica, el procedimiento es un procedimiento para modular la producción de citoquinas. En una realización más específica, el procedimiento es un procedimiento para modular la producción y/o secreción de IL-2. En algunas realizaciones, el procedimiento es un procedimiento para modular la producción y/o secreción de TNF- $\alpha$ . En otras realizaciones, el procedimiento es un procedimiento para modular la producción y/o  
45 secreción de MIP1- $\alpha$ .

La actividad celular es actividad de los receptores de citoquinas. En realizaciones específicas, el receptor de citoquinas es CCR1. En ciertas realizaciones, la actividad celular es migración celular. Algunas realizaciones incluyen reducir la migración celular de monocitos. En ciertas realizaciones, la actividad celular es señalización celular a través de  
50 receptores de tipo Toll (TLR).

En otros aspectos, la presente invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad, trastorno u otra afección en un sujeto que lo necesita, administrando una composición según la presente invención. A modo de ilustración, dichas enfermedades, trastornos o afecciones pueden incluir, aunque no se limitan a, cáncer, enfermedad  
55 inflamatoria, enfermedad inmunitaria (incluyendo enfermedad autoinmunitaria) y/o afecciones asociadas con angiogénesis anormal.

En ciertas realizaciones, la afección es una afección neurológica. En realizaciones específicas, la afección neurológica está asociada con muerte neuronal inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). En ciertas realizaciones, la afección es  
60 una enfermedad inflamatoria. En realizaciones específicas, la enfermedad inflamatoria es gota artrítica o enfermedad inflamatoria intestinal.

En aún otros aspectos, los polipéptidos, anticuerpos y/u otras composiciones de la presente invención pueden usarse en esencialmente cualquier tipo de ensayo de cribado conocido y disponible en la técnica. Por ejemplo, composiciones de la invención (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y/o anticuerpos) pueden usarse junto con esencialmente cualquier metodología de cribado conocida con el fin de identificar tipos celulares adecuados y/o patologías susceptibles al tratamiento según la presente invención. En otros ejemplos, pueden usarse composiciones de la invención (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y/o anticuerpos) junto con metodologías de cribado conocidas con el fin de identificar socios de unión, inhibidores competitivos y/o otros efectores celulares que median o modulan, directa o indirectamente, las actividades no canónicas de las composiciones en el presente documento. Por ejemplo, en una realización particular, se proporciona un procedimiento de cribado para identificar compuestos de ensayo como inhibidores, o como alternativa, potenciadores, de una interacción entre una composición de la invención y uno o más de sus socios de unión, efectores celulares y/o tipos celulares sujetos a modulación. Esto puede incluir, por ejemplo, etapas de formación de una mezcla de reacción, que incluye: (i) una composición de la invención, (ii) un socio de unión, efector celular y/o tipo celular que se sabe que es modulado por dicha composición, y (iii) un compuesto de ensayo; y detectar interacción del compuesto de ensayo con el socio de unión, efector celular y/o tipo celular. Un cambio estadísticamente significativo (potenciación o inhibición) en actividad o modulación en presencia del compuesto de ensayo, con respecto a la interacción en ausencia del compuesto de ensayo, indica un potencial agonista (mimético o potenciador) o antagonista (inhibidor) de la actividad.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE IDENTIFICADORES DE SECUENCIA

- 20 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de cebador (HRS-BPF).
- La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de cebador (HRS-P1R).
- 25 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ácido nucleico del gen de HRS (NM\_002109.3).
- La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HRS de longitud completa (NP\_002100.2)
- La SEQ ID NO: 5 es una secuencia codificante de ácido nucleico de la variante de splicing HRS-SV9.
- 30 La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de splicing HRS-SV9 codificado por la SEQ ID NO:5.
- La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de cebador (HRS-3'-UTR).
- 35 La SEQ ID NO: 8 es una secuencia codificante de ácido nucleico de la variante de splicing HRS-SV11.
- La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de splicing HRS-SV11 codificado por la SEQ ID NO:8.
- 40 La SEQ ID NO:10 es una secuencia codificante de ácido nucleico de la variante de splicing HRS-SV14.
- La SEQ ID NO:11 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de splicing HRS-SV14 codificado por la SEQ ID NO:10.
- 45 La SEQ ID NO:12 es una secuencia de cebador (hsH1-E2F1).
- La SEQ ID NO:13 es una secuencia de cebador (hsH1-E13R1).
- 50 La SEQ ID NO:14 es una secuencia de cebador (rnH1-E02F1).
- La SEQ ID NO:15 es una secuencia de cebador (rnH1-E12J13R2).
- La SEQ ID NO:16 son los aminoácidos 112-171 de HRS de *Pongo abelii* (orangután).
- 55 La SEQ ID NO:17 son los aminoácidos 112-171 de HRS bovina.
- La SEQ ID NO:18 son los aminoácidos 112-171 de HRS de ratón.
- 60 La SEQ ID NO:19 son los aminoácidos 112-171 de HRS de *Mesocricetus auratus* (hámster dorado).
- La SEQ ID NO:20 son los aminoácidos 112-166 de HRS de *Fugu rubripes* (pez globo japonés).

La SEQ ID NO:21 son los aminoácidos 112-167 de HRS de *Caenorhabditis elegans*.

La SEQ ID NO:22 son los aminoácidos 112-169 de HRS de *Dictyostelium discoideum*.

5

La SEQ ID NO:23 son los aminoácidos 112-167 de HRS de *Oryza sativa subsp. japonica* (arroz).

La SEQ ID NO:24 es una porción de la secuencia codificante de los exones 3 y 4 de HRS humana.

10 La SEQ ID NO:25 es una porción de la secuencia de aminoácidos de los exones 3 y 4 de HRS humana.

La SEQ ID NO:26 es una porción de la secuencia codificante de los exones 3 y 4 de HRS humana.

La SEQ ID NO:27 es una porción de la secuencia codificante de los exones 10 y 11 de HRS humana.

15

La SEQ ID NO:28 es una porción de la secuencia de aminoácidos de los exones 10 y 11 de HRS humana.

La SEQ ID NO:29 son los aminoácidos 112-171 de HRS-SV11.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-B muestran la identificación de la variante de splicing HRS-SV9 a partir de una biblioteca de músculo esquelético humano. La figura 1A muestra una ilustración de un transcrito de mRNA del gen de HRS y posiciones de cebadores para reacciones de PCR (BPF: cebador directo, P4R: cebador inverso). La figura 1B muestra una foto en gel de productos de reacción de PCR de músculo esquelético humano, células IMR32 y células HEK293T. La flecha superior apunta a un fragmento de ADN amplificado a partir del transcrito HRS-SV9. La flecha inferior apunta a un fragmento de ADN amplificado a partir de la secuencia de referencia de HRS.

Las figuras 2A-C muestran la identificación de la variante de splicing HRS-SV11 a partir de una biblioteca de células IMR32 y en muestras del cerebro humano. La figura 2A muestra una ilustración de un transcrito de mRNA del gen de HRS y posiciones de cebadores para reacciones de PCR (BPF: cebador directo, HRS-3'UTR: cebador inverso). La figura 2B muestra una foto en gel de productos de reacción de PCR de células IMR32. La flecha inferior apunta a un fragmento de ADN amplificado a partir del transcrito HRS-SV11. La flecha superior apunta a un fragmento de ADN amplificado a partir de la secuencia de referencia de HRS. La figura 2C muestra que el transcrito variante de splicing HRS-SV11 se identificó en tejido cerebral humano.

Las figuras 3A-D ilustran transcritos de mRNA y secuencias de proteínas de HRS de longitud completa de tipo silvestre (HRS ref), HRS-SV9, HRS-SV11 y HRS-SV14. La figura 3A muestra una ilustración de transcritos de mRNA que muestra que HRS-SV9 tiene una inserción desde el Intrón 2 y HRS-SV11 tiene una delección desde el Exón 3 al Exón 10. La figura 3B muestra información estructural de proteínas codificada por los transcritos de mRNA, que muestra que HRS-SV9 tiene solamente los primeros 60 aminoácidos de HRS, incluyendo el dominio WHEP intacto, mientras que HRS-SV11 tiene una delección de todo el dominio de aminoacilación, que dejan solamente los dominios WHEP y anticodón. Las figuras 3C y 3D muestran las secuencias codificantes de ácido nucleico (SEQ ID NO: 5, 8 y 10) y secuencias de proteínas codificadas (SEQ ID NO: 6, 9 y 11) para HRS-SV9, HRS-SV11 y HRS-SV14, respectivamente.

Las figuras 4A-B muestran resultados de inmunoblot usando anticuerpos anti-HRS en músculo tibial (Tib), músculo sóleo (Sol) de rata, miotubos C2C12 (C2), cerebro de rata adulta (Br) y células HEK293T (293T). La figura 4A muestra un inmunoblot con el anticuerpo para HRS N-terminal (contra los aminoácidos 1-97). La banda de referencia se muestra mediante la flecha superior de la figura 4A. La flecha inferior de la figura 4A apunta a una banda cuyo tamaño es consecuente con el tamaño predicho del polipéptido variante de splicing HRS-SV11. La figura 4B muestra un inmunoblot con el anticuerpo para HRS C-terminal (contra los aminoácidos 50-200 cerca del extremo C). La flecha superior apunta a la proteína de referencia, mientras que la flecha inferior apunta a una banda con tamaño similar tal como se ha visto con el anticuerpo N-terminal.

55

Las figuras 5A-C muestran resultados de experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal contra HRS N-terminal (generado contra los aminoácidos 1-97 de proteína HRS humana de tipo silvestre). La figura 5A muestra resultados para células HEK293T, mioblastos C2C12 (MB) y miotubos C2C12 (MT); la flecha inferior apunta a una banda que tiene un tamaño que es consecuente con el tamaño predicho del polipéptido variante de splicing HRS-SV9. Las figuras 5B-C muestran los resultados del lisado celular total de células IMR32 y HEK293T que sobre-expresan un HRS-SV11 marcado con myc; las células se sometieron a inmunoblot con el mAb para HRS N-terminal (figura 5B), o un anticuerpo para HRS policlonal (generado contra el extremo C de proteína HRS humana de tipo

60

silvestre) (figura 5C). Una banda de proteína, que migraba ligeramente más rápido que la proteína HRS-SV11 marcada con myc, fue detectada en el lisado de células IMR32 por ambos anticuerpos (flechas inferiores en B y C) y podría ser la proteína HRS-SV11.

5 Las figuras 6A-C demuestran la secreción de HRS, HRS-SV9 y HRS-SV11 después de la producción recombinante en células HEK293T. HRS de longitud completa de tipo silvestre (HRS-Ref), HRS-SV9 y HRS-SV11 se expresaron con fuerza en células HEK293T. La figura 6A, panel superior, muestra flechas que apuntan a proteínas sobreexpresadas en lisados celulares totales (TCL). La figura 6B, panel inferior, muestra que en fracciones de medios se detectaron las tres proteínas. HRS-Ref se sondeó con anticuerpo anti-Myc, mientras que HRS-SV9 y HRS-SV11  
10 se sondearon con anticuerpo anti-HRS (extremo N). Un blot de tubulina en TCL mostraba igual carga, mientras que un blot de tubulina en la fracción de medios demostró control con fugas. La figura 6C muestra que EGFP no se secretaba cuando se sobre-expresaba en células HEK293T, tal como se indica por la ausencia de una banda de EGFP (-35 kDa) en la fracción de medios.

15 La figura 7 muestra que los polipéptidos variantes de splicing HRS-SV9 y HRS-SV11 recombinantes intensifican la secreción de IL-2 en células T Jurkat activadas. Las células se trataron con PMA (25 ng/ml) más ionomicina (250 ng/ml) con o sin HRS-SV9 o HRS-SV11, y los medios se analizaron 48 horas más tarde mediante ELISA.

La figura 8 muestra que HRS-SV9 estimulaba las PBMC para liberar TNF $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo. Se usó LPS  
20 como control positivo.

La figura 9 muestra que HRS-SV11 protegía a neuronas corticales y células PC12 cultivadas contra la neurotoxina 6-OHDA. La figura 9A muestra que pre-tratar neuronas corticales de rata con HRS-SV11 reducía significativamente la muerte de neuronas corticales inducida por 25  $\mu$ M de 6-OHDA según la medición de la viabilidad celular mediante  
25 ensayo MTT. HRS-SV11 también protegía eficazmente a células PC12 de muerte celular inducida por 6-OHDA (200  $\mu$ M), tal como se muestra mediante ensayo MTT (figura 9B) y ensayo LDH (figura 9C). Tal como se muestra en la figura 9D, el efecto protector de HRS-SV11 era un efecto agudo, con pre-tratamiento durante poco tiempo conseguía un efecto protector similar a pre-tratamiento durante 24 h. Los datos son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Terc-butildihidroquinona (tBHQ) y Triton X-100 (abreviado Triton) (2%) servían como controles positivos  
30 para ensayos MTT y LDH, respectivamente (B, C). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

La figura 10 muestra que HRS-SV11 no protegía a las neuronas de toxicidad inducida por amiloide beta, glutamato monosódico (MSG) y MPP+.

35 La figura 10A muestra los resultados de la incubación con agregados de  $\beta$ -amiloide (1-42) ( $A\beta_{42}$ ) durante 24 h, que inducía muerte de neuronas corticales de manera dependiente de la dosis. La figura 10B muestra que pre-tratar neuronas corticales durante 24 h con HRS-SV11, de 1 nM a 1  $\mu$ M, no tenía efectos protectores según lo medido mediante ensayo MTT. La figura 10C muestra muerte de neuronas corticales inducida por glutamato monosódico (MSG) de manera dependiente de la dosis como medición de la liberación de LDH, y la figura 10D muestra que HRS-SV11 no tenía ningún efecto beneficioso contra la toxicidad inducida por glutamato monosódico; la memantina a 10  
40  $\mu$ M prevenía significativamente la muerte neuronal, sirviendo como un control positivo. La figura 10E muestra que MPP+ inducía muerte de células PC12 de manera dependiente de la dosis según lo medido mediante ensayo MTT, y la figura 10F muestra que HRS-SV11 no protegía a células PC12 del estrés por MPP+ después de pre-tratamiento durante 24 h. Los datos son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes.

45 La figura 11 muestra que HRS-SV11 no utiliza un mecanismo extracelular para proteger a las neuronas de 6-OHDA. Tal como se muestra en la figura 11A, la adición de HRS-SV11 no suprimía la acumulación de p-quinona, mientras que la vitamina C, un conocido anti-oxidante, suprimía su acumulación. La figura 11B muestra que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) inducía muerte de neuronas corticales de manera dependiente de la dosis, y la figura 11C muestra  
50 que el pre-tratamiento con HRS-SV11 no protegía a estas neuronas de la muerte. Tal como se muestra en la figura 11D, el pre-tratamiento de neuronas corticales con HRS-SV11 reducía la muerte neuronal tras la provocación con 6-OHDA, pero la co-aplicación de HRS-SV11 con 6-OHDA no tenía ningún efecto protector. Antes de la aplicación de 6-OHDA, medios de lavado y refresco después del pre-tratamiento con HRS-SV11 no afectaban al efecto protector de HRS-SV11 (véase la figura 11E). Los datos son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ,  
55 \*\* $p < 0,01$ .

La figura 12 muestra que HRS-SV11 prevenía la fragmentación de ADN inducida por 6-OHDA en células PC12. La apoptosis de células PC12 fue examinada mediante tinción de Hoechst 33258. La figura 12A muestra células PC12 tratadas con control de tampón en solitario; la figura 12B muestra que el tratamiento con 6-OHDA (200  $\mu$ M) durante 8  
60 h; y la figura 12C muestra pre-tratamiento con HRS-SV11 (500 nM) durante 24 h seguido por provocación durante 8 h con 6-OHDA (200  $\mu$ M). Tal como se muestra en la figura 12D, el número de células apoptóticas se contó (distinguidas por la presencia de núcleos fragmentados), demostrando que el pre-tratamiento con HRS-SV11 1  $\mu$ M reducía

enormemente el número de células apoptóticas.

La figura 13 muestra que la mutación de residuos de cisteína (Cys) en el extremo C de HRS-SV11 suprimía la función protectora. La figura 13A muestra que HRS-SV11 (SEQ ID NO:29) contiene tres residuos Cys (C117, C169 y C171).

5 Entre ellos, C117 y C171 (flechas, figura 13A) están altamente conservados entre especies, tal como se muestra mediante el alineamiento de los aminoácidos 112 a aproximadamente 171 de diversas secuencias de HRS (SEQ ID NO:16-24 y 29). Tal como se muestra en la figura 13B, los mutantes C2S (mutación de C169 y C171 a residuo de serina) y delC (delección de al menos tres aminoácidos, incluyendo C169 y C171) eran en su mayoría monómero, mientras que el mutante C117S era en su mayoría dímero. El HRS-SV11 de tipo silvestre tenía un pico entre el  
10 monómero y el dímero, lo que indica que había un cambio muy dinámico entre estas dos formas. Tal como se muestra en la figura 13C, mutaciones de C169 y C171 en residuo de serina (HRS-SV11\_C2S) o delección de los últimos tres aminoácidos, incluyendo C169 y C171 (HRS-SV11\_delC) suprimía la función neuroprotectora de HRS-SV11, lo que sugería el papel crítico de estas Cys. \*\*p<0,01.

15 La figura 14 muestra que la inhibición de JAK2, JNK y p38 suprimía el efecto neuroprotector de HRS-SV11. Tal como se muestra en las figuras 14A-B, el efecto neuroprotector de HRS-SV11 en células PC12 se suprimió mediante co-inhibición de JNK por SB202190 a 10  $\mu$ M y p38 por SP600125 a 10  $\mu$ M (figura 14A), y mediante inhibición de JAK2 por AG490 a 40  $\mu$ M (figura 14B). La figura 14B también muestra que el efecto neuroprotector de HRS-SV11 no fue suprimido por la inhibición de fosfolipasa C (PLC) por U73122, o MKK por arctigenina. Las figuras 14C-D muestran  
20 que se realizaron observaciones similares con neuronas corticales. Los datos son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

La figura 15 muestra que HRS-SV11 se unía a células HEK293T que expresan CCR5, pero no a células que expresan CCR1 o no transfectadas. Como en las figuras 15A-B, HRS-SV11 no se unía a células HEK293T (figura 15A), pero se  
25 unían a células HEK293T que expresan CCR5 (figura 15B). Tal como se muestra en la figura 15C, la unión a células que expresan CCR-5 no estaba afectada por el pre-tratamiento de células con Met-RANTES. La figura 15D muestra que la unión era específica de CCR5, dado que no se observó unión en células que expresaban CCR1. Se incubaron células de control con anticuerpo para FITC-His solamente.

30 La figura 16 muestra la identificación de la variante de splicing HRS-SV14 y la neuroprotección de HRS-SV14. La figura 16A muestra que la identificación de una nueva variante de splicing de HRS humana en cADN de cerebro fetal humano (flecha). Tal como se muestra en las figuras 16A-B, la clonación y la secuenciación reveló que esta variante de splicing de HRS resulta de saltarse del Exón 4 al Exón 10 en el transcrito de HRS de tipo silvestre (las SEQ ID NO:24-28 están en orden desde la parte superior a la inferior de la figura 16B). A nivel de proteínas, se predijo que la  
35 proteína HRS-SV14 contenía el dominio WHEP, dominio de unión anticodón, y el primer motivo del dominio de aminoacilación (véase la figura 16C). La figura 16D muestra que HRS-SV14, cuando se pre-trataba durante 24 h, protegía a células PC12 de la muerte neuronal inducida por 6-OHDA; y el efecto era comparable a HRS-SV11. Los datos son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. \*p<0,05.

40 La figura 17 muestra la detección de transcritos de HRS-SV11 y SV14 en diferentes tejidos y líneas celulares. Esta figura muestra la electroforesis de productos de PCR que flanquean al Exón 2 y al Exón 12 de *HARS* de cADN de tejidos de cerebro adulto humano, cerebro fetal, pulmón, músculo esquelético y células IMR32, Jurkat y THP-1. HRS-SV11, tal como se indicaba mediante la flecha horizontal, estaba presente en todas las muestras, excepto cerebro fetal. HRS-SV14, tal como se indicaba mediante flechas en ángulo, se detectó en cerebro fetal humano, pulmón,  
45 músculo esquelético, células Jurkat y THP-1.

La figura 18 muestra que el efecto protector de la proteína recombinante HRS-SV11 no era de contaminantes no proteicos. La figura 18A muestra la tinción con azul de coomassie de preparación de proteína HRS-SV11 recombinante con o sin digestión con proteinasa K; no se detectó ninguna banda de proteína visible en la preparación de HRS-SV11  
50 tratada con proteinasa K, en comparación con la preparación de HRS-SV11 no tratada (la punta de flecha indica proteína HRS-SV11 recombinante). Tal como se muestra en las figuras 18B-C, el pre-tratamiento de neuronas corticales (figura 18B) y células PC12 (figura 18C) con HRS-SV11 digerida con proteinasa K suprimía su efecto protector contra 6-OHDA. tBHQ servía como control positivo. NS significa no significación. Los datos son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

55 La figura 19 muestra que SV9 inhibe la migración de monocitos (células THP-1) hacia CCL5.

La figura 20 muestra que SV9 inhibe la migración mediada por CCR1 de células THP-1 hacia CCL-23.

60 la figura 21 muestra la activación de los TLR de macrófagos por SV9. LPS es un control positivo

Las figuras 22A y 22B muestran que SV9 activa tanto TLR2 (22A) como TLR4 (22B), pero preferentemente activa

TLR4.

La figura 23 muestra que SV9 estimula la secreción de MIP-1 $\alpha$  en monocitos (THP-1).

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, procedimientos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del alcance de la técnica, muchas de las cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, ed., 1984).

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento por la presente se incorporan en su totalidad por referencia.

### Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Un "agonista" se refiere a una molécula que se intensifica o imita la actividad biológica no canónica de una HRS. Los agonistas pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas pequeñas, o cualquier otro compuesto o composición que module la actividad de una HRS ya sea por interacción directa con las HRS o su socio de unión, o al actuar sobre componentes de la ruta biológica en la que la HRS participa. Están incluidos agonistas parciales y completos.

El término "antagonista" se refiere a una molécula que se inhibe o atenúa la actividad biológica no canónica de una HRS. Los antagonistas pueden incluir proteínas tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas pequeñas, o cualquier otro compuesto o composición que module la actividad de una HRS o su socio de unión ya sea por interacción directa con las HRS o su socio de unión, o al actuar sobre componentes de la ruta biológica en la que la HRS participa. Están incluidos antagonistas parciales y completos.

Por "secuencia codificante" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuye al código para el producto polipeptídico de un gen. En cambio, la expresión "secuencia no codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuye al código para el producto polipeptídico de un gen.

En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicado, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

Por "que consiste en" se entiende que incluye, y limitado a, lo que siga a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que ningún otro elemento puede estar presente. Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualesquiera elementos enumerados después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren en o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "función" y "funcional" y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

- 5 Por "gen" se entiende una unidad de herencia que ocupa un locus específico en un cromosoma y consiste en secuencias reguladoras transcripcionales y/o traduccionales y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3').

"Homología" se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología puede determinarse usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux y col., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395), que se incorpora al presente documento por referencia. De esta manera, secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento podrían compararse mediante inserción de huecos en el alineamiento, estando dichos huecos determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

15 La expresión "célula huésped" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de cualquier vector o vectores recombinantes o polinucleótido aislado de la invención. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula huésped incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la invención es una célula huésped recombinante.

25 Por "aislado" se entiende material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente le acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado", tal como se usa en el presente documento, incluye un polinucleótido que ha sido purificado de las secuencias que lo flanquean en su estado de origen natural, *por ejemplo*, un fragmento de ADN que ha sido retirado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento. Como alternativa, un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, tal como se usan en el presente documento, incluye el aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula peptídica o polipeptídica de su entorno celular natural, y de asociación con otros componentes de la célula; es decir, no está significativamente asociado con sustancias *in vivo*.

El término "mARN" o algunas veces mencionado como "transcritos de mARN" tal como se usan en el presente documento, incluyen, aunque no se limitan a un transcrito o transcritos pre-mARN, intermedios de procesamiento de transcritos, mARN maduros listos para traducción y transcritos del gen o genes, o ácidos nucleicos derivados del transcrito o transcritos de mARN. El procesamiento del transcrito puede incluir splicing, edición y degradación. Tal como se usa en el presente documento, un ácido nucleico derivado de un transcrito de mARN se refiere a un ácido nucleico para cuya síntesis el transcrito de mARN o una subsecuencia del mismo ha servido en última instancia como una plantilla. Un cADN transcrito de forma inversa a partir de un mARN, un ARN transcrito a partir de ese cADN, un ADN amplificado a partir del cADN, un ARN transcrito a partir del ADN amplificado, etc., son todos derivados del transcrito de mARN y la detección de dichos productos derivados es indicativo de la presencia y/o abundancia del transcrito original en una muestra. De este modo, muestras derivadas de mARN incluyen, aunque no se limitan a, transcritos de mARN del gen o genes, cADN transcrito de forma inversa a partir del mARN, cARN transcrito a partir del cADN, ADN amplificado a partir de los genes, ARN transcrito a partir del ADN amplificado, y similares.

45 Actividad "no canónica," tal como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a una actividad poseída por un polipéptido de HRS de la invención que es diferente de aminoacilación y, más específicamente, diferente de la adición de su aminoácido semejante sobre su molécula de tARN semejante. Los ejemplos no limitantes de actividades no canónicas incluyen unión a ARN, unión a aminoácidos, modulación de la proliferación celular, modulación de la migración celular, modulación de la diferenciación celular (por ejemplo, hematopoyesis), modulación de la apoptosis u otras formas de muerte celular, modulación de la señalización celular, modulación de la angiogénesis, modulación de la unión celular, modulación del metabolismo celular, modulación de la producción o la actividad de citoquinas, modulación de la actividad del receptor de citoquinas, modulación de la inflamación, y similares.

55 El término "modular" incluye "aumentar" o "estimular", así como "disminuir" o "reducir," normalmente en una cantidad estadísticamente significativa o fisiológicamente significativa en comparación con un control. Una cantidad "aumentada" o "intensificada" es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida sin composición (la ausencia de un agente o compuesto) o con una composición de control. Una cantidad "disminuida" o reducida es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%,

35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de la cantidad producida sin composición (ausencia de un agente o compuesto) o con una composición de control, incluyendo todos los números enteros entre medias. Otros ejemplos de cantidades "estadísticamente significativas" se describen en el presente documento.

5

Por "obtenida de" se entiende que una muestra tal como, por ejemplo, un extracto polinucleotídico o extracto polipeptídico se aísla de, o se deriva de, una fuente particular del sujeto. Por ejemplo, el extracto puede obtenerse de un tejido o un fluido biológico aislado directamente del sujeto. "Derivada" u "obtenida de" también puede referirse a la fuente de una secuencia polipeptídica o polinucleotídica. Por ejemplo, una secuencia de HRS de la presente invención puede "derivarse" de la información de secuencia de un fragmento proteolítico de HRS o variante de splicing de HRS, o una parte de la misma, ya sea de origen natural o generado artificialmente, y puede comprender, de este modo, consistir esencialmente en, o consistir en esa secuencia.

Las menciones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia un 50% idéntica a", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la medida en que esas secuencias son idénticas en nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido en una ventana de comparación. De este modo, un "porcentaje de identidad de secuencia" puede calcularse comparando dos secuencias alineadas de forma óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gin, Cys y Met) aparece en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Una "unión de splicing" tal como se usa en el presente documento incluye la región en un transcrito de mRNA maduro o el polipéptido codificado donde el extremo 3' de un primer exón se une con el extremo 5' de un segundo exón. El tamaño de la región puede variar, y puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más (incluyendo todos los números enteros entre medias) nucleótidos o residuos de aminoácidos a ambos lados de los residuos exactos donde el extremo 3' de un exón se une con el extremo 5' de otro exón. Un "exón" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está representada en la forma madura de una molécula de ARN después de que partes de un ARN precursor (intrones) han sido retiradas por splicing en cis o dos o más moléculas de ARN precursor han sido ligadas por splicing en trans. La molécula de ARN madura puede ser un ARN mensajero o una forma funcional de un ARN no codificante tal como rARN o tARN. Dependiendo del contexto, un exón puede referirse a la secuencia en el ADN o su transcrito de ARN. Un "intrón" se refiere a una región de ácido nucleico no codificante dentro de un gen, que no es traducida a una proteína. Las secciones intrónicas no codificantes se transcriben a mRNA precursor (pre-mRNA) y algunos otros ARN (tales como ARN no codificantes largos), y posteriormente se retiran por splicing durante el procesamiento a ARN maduro.

Una "variante de splicing" se refiere a un mRNA maduro y su proteína codificada que se producen mediante splicing alternativo, un procedimiento mediante el cual los exones del ARN (un transcrito de gen primario o pre-mRNA) se reconectan de múltiples maneras durante splicing de ARN. Los diferentes mRNA resultantes pueden traducirse en diferentes isoformas de proteínas, permitiendo de un único gen codifique múltiples proteínas.

Un "sujeto", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que exhibe un síntoma, o está en riesgo de exhibir un síntoma, que puede ser tratado o diagnosticado con un polinucleótido o polipéptido de HRS de la invención. Los sujetos (pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como, ratón, rata, conejo, o conejillo de indias), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o un perro). Los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos, están incluidos.

"Tratamiento" o "tratar", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección que puede ser efectuada por las actividades no canónicas de un polinucleótido o polipéptido de HRS, tal como se describe en el presente documento, y pueden incluir incluso cambios o mejoras mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que está siendo tratada. También se incluyen tratamientos que se refieren a terapias no HRS, en las que una secuencia de HRS descrita en el presente documento proporciona un marcador clínico de tratamiento. "Tratamiento" o "tratar" no indica necesariamente la erradicación completa o curación de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados a la misma. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto que lo necesita. Marcadores ejemplares de mejoría clínica serán evidentes para los expertos en la materia.

Por "vector" o "construcción de ácido nucleico" se entiende una molécula de polinucleótido, preferentemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en la que un polinucleótido se puede insertar o clonar. Un vector contiene preferentemente uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula huésped definida que incluye una célula o tejido diana o una célula

progenitora o tejido de la misma, o ser integrable con el genoma del huésped definido de tal manera que el clonado secuencia sea reproducible. Por consiguiente, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extra-cromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido lineal o circular cerrado, un elemento extracromosómico, un mini-cromosoma, 5 o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en que ha sido integrado.

Las expresiones "tipo silvestre" y "de origen natural" se usan de forma intercambiable para referirse a un gen o producto 10 génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla a partir de una fuente de origen natural. Un gen o producto génico de tipo silvestre (por ejemplo, un polipéptido) es aquel que se observa de forma más frecuente en una población y es designado, por lo tanto, de forma arbitraria la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen.

15 Polipéptidos variantes de splicing de HRS

Tal como se ha indicado anteriormente, según la divulgación, se proporcionan polipéptidos "variantes de splicing" de HRS que tienen actividades no canónicas de relevancia terapéutica, así como composiciones que las comprenden.

20 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. De este modo, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos no de origen natural sintéticos, tales como un análogo químico de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

25 Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica, pero, en el contexto de la presente invención, normalmente representan un fragmento de una proteína de longitud completa, y pueden incluir modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. Los polipéptidos y proteínas 30 de la invención se pueden preparar usando cualquiera de diversas técnicas recombinantes y/o de síntesis bien conocidas, ejemplos ilustrativos de las cuales se describen más adelante.

La mención "variante polipeptídica" se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido variante de splicing de HRS de referencia (por ejemplo, SEQ ID NO:6, 9, 11) mediante la adición, delección, y/o sustitución de al menos un 35 residuo de aminoácido, y que normalmente conservan la actividad no canónica del polipéptido variante de splicing de HRS de referencia. Una variante polipeptídica se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservativas o no conservativas, tal como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. La variante polipeptídica comprende sustituciones conservativas y, a este respecto, se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse a otras con propiedades similares en líneas generales sin cambiar 40 la naturaleza de la actividad del polipéptido.

Una variante polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad o similitud de 45 secuencia respecto a una secuencia correspondiente de un polipéptido de referencia de HRS, tal como se describe en el presente documento, y conserva la actividad no canónica de ese polipéptido de referencia. También se divulgan secuencias que difieren de las secuencias de HRS de referencia mediante la adición, delección o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o más aminoácidos pero que conservan las propiedades del polipéptido de HRS de referencia. Polipéptidos variantes difieren de las secuencias de referencia de HRS correspondientes en al menos el 1% pero menos del 20%, 15%, 10% 50 o 5% de los residuos. (Si esta comparación requiere alineamiento, las secuencias deben estar alineadas para similitud máxima. Las secuencias "en bucle" a partir de delecciones o inserciones, o emparejamientos erróneos, se consideran diferencias). Las diferencias son, adecuadamente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa.

55 También están incluidos "fragmentos" biológicamente activos de los polipéptidos de referencia de HRS. Los fragmentos biológicamente activos representativos generalmente participan en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o inter-molecular. Una interacción inter-molecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática. Una interacción inter-molecular puede ser entre un polipéptido de HRS y un socio de unión celular, tal como un receptor celular u otra molécula huésped que participa en la actividad no canónica 60 del polipéptido de HRS.

Normalmente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de

un polipéptido de referencia de HRS y pueden incluir uno o más (y en algunos casos todos) de los diversos dominios activos, e incluyen fragmentos que tienen una actividad no canónica. En algunos casos, los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de HRS tienen una actividad biológica que es exclusiva del fragmento truncado particular, de modo que el polipéptido de HRS de longitud completa puede no tener esa actividad. En ciertos casos, la actividad biológica puede revelarse separando el fragmento polipeptídico de HRS biológicamente activo de las otras secuencias polipeptídicas de HRS de longitud completa, o alterando ciertos residuos de la secuencia polipeptídica de tipo silvestre de HRS de longitud completa para desenmascarar los dominios biológicamente activos.

El polipéptido de la variante de splicing de HRS es un fragmento de HRS que comprende al menos el dominio WHEP, o un fragmento o variante activa del mismo. El polipéptido es un fragmento de HRS que comprende al menos el dominio de unión anticodón de HRS, o un fragmento o variante activa del mismo. El polipéptido es un fragmento de HRS que comprende al menos el dominio WHEP y el dominio de unión anticodón de HRS. En aún otra realización ilustrativa, el polipéptido es un fragmento de HRS que carece del el dominio de aminoacilación y sustancialmente desprovisto de actividad de aminoacilación.

El polipéptido variante de splicing de HRS es un polipéptido que comprende una secuencia mostrada en las SEQ ID NO:6, 9 u 11. El polipéptido variante de splicing de HRS es un polipéptido que comprende un fragmento activo de las SEQ ID NO: 6, 9 u 11 (es decir, un fragmento de las SEQ ID NO: 6, 9 u 11 que conserva sustancialmente al menos una actividad no canónica exhibida por las SEQ ID NO: 6, 9 u 11). Por ejemplo, dicho fragmento puede comprender al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 50, o más, residuos de aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 6, 9 u 11, así como todas las longitudes intermedias. Las longitudes intermedias pretenden incluir todos los números enteros entre medias, por ejemplo, 6, 7, 8, etc., 51, 52, 53, etc. Además, dicho fragmento puede comprender al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125 o 150, o más, residuos de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 9, así como todas las longitudes intermedias.

Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de referencia de HRS de la presente divulgación puede ser un fragmento polipeptídico que es, por ejemplo, de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o más aminoácidos contiguos o no contiguos, incluyendo todos los números enteros entre medias, de las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO:6, 9 u 11. La región C-terminal o N-terminal de cualquier polipéptido de referencia de HRS puede estar truncada en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o más aminoácidos, incluyendo todos los números enteros entre medias (por ejemplo, 101, 102, 103, 104, 105), siempre que el polipéptido de HRS truncado conserve la actividad no canónica del polipéptido variante de splicing HRS de referencia. Adecuadamente, el fragmento biológicamente activo tiene no menos de aproximadamente el 1%, 10%, 25% o 50% de una actividad del polipéptido de referencia de HRS biológicamente activo (es decir, actividad no canónica) a partir del cual se deriva.

Un fragmento de HRS de la SEQ ID NO: 6, 9 u 11 puede variar en tamaño entre aproximadamente 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-125, 20-150 o 20-175 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones, el fragmento variará en tamaño entre aproximadamente 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 30-125, 30-150 o 30-175 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones, el fragmento variará en tamaño entre aproximadamente 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 40-125, 40-150 o 40-175 aminoácidos de longitud. En aún otras realizaciones ilustrativas, el fragmento variará en tamaño entre aproximadamente 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 50-125, 50-150 o 50-175 aminoácidos de longitud.

En aún otras realizaciones, la presente invención divulga variantes activas de un polipéptido variante de splicing de HRS (por ejemplo, SEQ ID NO: 6, 9 u 11) donde dichas variantes conservan sustancialmente al menos una actividad no canónica exhibida por las SEQ ID NO: 6, 9 u 11. Ciertas variantes ilustrativas de la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 6, 9 u 11 incluyen aquellas que tienen al menos aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad (determinada tal como se describe a continuación), a lo largo de sus longitudes, respecto a las SEQ ID NO: 6, 9 u 11.

Una variante de la presente divulgación puede diferir de las SEQ ID NO: 6, 9 u 11 en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse de forma sintética, por ejemplo, modificando las SEQ ID NO: 6, 9 u 11 (o un polinucleótido que codifica las SEQ ID NO: 6, 9 u 11) y evaluando su actividad biológica tal como se describe en el presente documento usando cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

Una variante contendrá sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la materia de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezca sustancialmente sin cambios. Se pueden hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos

de la presente invención y aún obtener una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante equivalente, o incluso mejorada, de un polipéptido variante de splicing de HRS de la invención, un experto en la materia, por ejemplo, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia de de ADN codificante según la 5 tabla 1.

Ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas sustrato. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína la que 10 define generalmente la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia de proteína, y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que se pueden hacer diversos cambios en las secuencias polipeptídicas de las composiciones divulgadas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad deseada.

15

TABLA 1

Aminoácidos		Codones						
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	Met	M	AUG					
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				

En la realización de dichos cambios, el índice hidropático de los aminoácidos también puede considerarse. La importancia del índice hidropático de aminoácidos en otorgar función biológica interactiva en una proteína se entiende 20 generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, que se incorpora al presente documento por referencia). Por ejemplo, se conocido que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que, a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático tomando como base su hidrofobicidad y características de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores 25 son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (0,4); treonina (0,7); serina (0,8); triptófano (0,9); tirosina (1,3); prolina (1,6); histidina (3,2); glutamato (3,5); glutamina (3,5); aspartato (3,5); asparagina (3,5); lisina (3,9); y arginina (4,5).

Es conocido en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice

o puntuación hidropática similar y aún dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir aún obtener una proteína biológica y funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , aquellos dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son aún más particularmente preferidos.

5

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente tomando como base la hidrofiliidad. Tal como se detalla en la patente de Estados Unidos 4.554.101, los siguientes valores de hidrofiliidad han sido asignados a residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido pueda ser sustituido por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y aún obtener una proteína biológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ , aquellos dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son aún más particularmente preferidos.

10

Tal como se ha perfilado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos pueden estar basadas en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen diversas de las características anteriores en consideración son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

20

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse además tomando como base similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante puede también, o como alternativa, contener cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes pueden también (o como alternativa) ser modificadas mediante, por ejemplo, la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

25

Los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que co-traduccionalmente o post-traduccionalmente dirige la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede estar conjugado a un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para intensificar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede estar conjugado a una región Fc de inmunoglobulina.

35

Cuando se comparan las secuencias polipeptídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de aminoácidos en las dos secuencias de la misma cuando se alinean para correspondencia máxima, tal como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente comparando las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

40

Una "ventana de comparación" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, 40 a aproximadamente 50, en las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas de forma óptima.

45

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando el programa Megalign en el paquete Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa materializa varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl.

50

3, págs. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis págs. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11: 105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Proc. Nat'l

55

Acad., Sci. USA 80:726-730.

60

Como alternativa, el alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede ser llevado a cabo por el algoritmo

de identidad local de Smith y Waterman (1981) *Add. APL. Math* 2:482, mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda de procedimientos de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics 5 Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Ejemplos de algoritmos que son adecuados par determinar la identidad de secuencia porcentual y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 pueden usarse, por 10 ejemplo con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. Software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Para las secuencias de aminoácidos, se puede usar una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae una cantidad X desde su valor 15 máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento.

En un enfoque ilustrativo, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias 20 alineadas óptimamente en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, donde la parte de la secuencia polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo de aminoácido idéntico en ambas 25 secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Dentro de la divulgación se encuentran los polipéptidos de fusión y los polinucleótidos que codifican los polipéptidos 30 de fusión. Los polipéptidos de fusión se refieren a polipéptidos variantes de splicing de HRS de la invención que se han enlazado covalentemente, ya sea directa o indirectamente a través de un enlazador de aminoácidos, a una o más secuencias de polipéptidos heterólogas (socios de fusión). Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están normalmente enlazados extremo C a extremo N, aunque también pueden estar enlazados extremo C a extremo C, extremo N a extremo N o extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier 35 orden.

El socio de fusión puede estar diseñado y incluido para esencialmente cualquier propósito deseado siempre que no afecte negativamente a la actividad deseada del polipéptido. Por ejemplo, en una realización, un socio de fusión 40 comprende una secuencia que ayuda en la expresión de la proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Otros socios de fusión pueden seleccionarse para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a compartimentos intracelulares deseados o que sea secretada fuera de la célula. Aún más socios de fusión pueden incluir marcas de afinidad, que facilitan la purificación de la proteína.

De forma más general, la fusión a secuencias heterólogas, tales como un fragmento Fc, puede utilizarse para eliminar 45 características no deseadas o para mejorar las características deseadas (por ejemplo, propiedades farmacocinéticas) de un polipéptido de HRS. Por ejemplo, la fusión a una secuencia heteróloga puede aumentar la estabilidad química, disminuir la inmunogenicidad, mejorar el direccionamiento *in vivo*, y/o aumentar la semi-vida en circulación de un polipéptido de HRS.

50 La fusión a secuencias heterólogas también puede usarse para crear proteínas de fusión bifuncionales, tales como proteínas bifuncionales que no solamente poseen una actividad no canónica seleccionada a través del polipéptido de HRS, sino que también son capaces de modificar (es decir, estimular o inhibir) otras rutas a través del polipéptido heterólogo. Los ejemplos de dichas rutas incluyen, aunque no se limitan a, diversas rutas relacionadas con el sistema 55 inmunitario, tales como rutas de activación inmunitaria innata o adaptativa, o rutas reguladoras del crecimiento celular, tales como angiogénesis. En ciertos aspectos, el polipéptido heterólogo puede actuar de forma sinérgica con el polipéptido de HRS para modular una ruta celular en un sujeto. Los ejemplos de polipéptidos heterólogos que pueden utilizarse para crear una proteína de fusión bifuncional incluyen, aunque no se limitan a, trombopoyetina, citoquinas (por ejemplo, IL-11), quimioquinas, y diversos factores de crecimiento hematopoyéticos, además de fragmentos 60 biológicamente activos y/o variantes de los mismos.

Los polipéptidos de fusión pueden prepararse en general usando técnicas estándar. Por ejemplo, secuencias de ADN

que codifican los componentes polipeptídicos de una fusión deseada pueden ensamblarse por separado, y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico está ligado, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico, de modo los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción a un único polipéptido de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Puede emplearse una secuencia enlazadora peptídica para separar los primer y segundo componentes polipeptídicos una distancia suficiente para garantizar que cada polipéptido se pliega a sus estructuras secundaria y terciaria, si se desea. Dicha secuencia enlazadora peptídica se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Ciertas secuencias enlazadoras peptídicas pueden seleccionarse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su capacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en los primer y segundo polipéptidos; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias preferidas de enlazadores de péptidos contienen residuos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, como Thr y Ala, también pueden usarse en la secuencia de enlazadores. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de forma útil como enlazadores incluyen las divulgadas en Maratea y col., Gene 40:39 46 (1985); Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); patente de Estados Unidos No. 4.935.233 y patente de Estados Unidos No. 4.751.180. La secuencia enlazadora puede ser generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras no se requieren cuando los primer y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y previenen la interferencia estérica.

Las secuencias de ADN ligadas se enlazan operativamente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN se encuentran a sólo 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De manera similar, los codones de detención requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción están presentes solamente 3' respecto a a la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

En general, los polipéptidos y polipéptidos de fusión (así como sus polinucleótidos codificantes) están aislados. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una proteína de origen natural está aislada si se separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferentemente, dichos polipéptidos son al menos aproximadamente el 90% puros, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% puros y de la forma más preferente al menos aproximadamente el 99% puros. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no es una parte del entorno natural.

Un polipéptido variante de splicing de HRS de la invención puede formar parte de un dímero. Los dímeros pueden incluir, por ejemplo, homodímeros entre dos polipéptidos de HRS idénticos, heterodímeros entre dos polipéptidos de HRS diferentes y/o heterodímeros entre un polipéptido de HRS y un polipéptido heterólogo. Los monómeros y/o dímeros pueden ser solubles y pueden aislarse o purificarse a homogeneidad. Ciertos heterodímeros, tales como aquellos entre un polipéptido de HRS y un polipéptido heterólogo, pueden ser bifuncionales.

También se divulgan monómeros de polipéptidos de HRS, que incluyen monómeros de HRS aislados que no dimerizan sustancialmente con sí mismos (homodimerizan) o con un segundo polipéptido de HRS (heterodimerizan), ya sea debido a una o más sustituciones, truncamientos, deleciones, adiciones, modificaciones químicas, o una combinación de estas alteraciones. En ciertas realizaciones, polipéptidos de HRS monoméricos poseen actividades biológicas, incluyendo actividades no canónicas, que no están poseídas por complejos de polipéptidos de HRS diméricos o multiméricos.

El polipéptido de HRS de la divulgación puede formar parte de un complejo multiunitario. Un complejo multiunitario de la presente divulgación puede incluir, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, o 5 o más monómeros. Los monómeros y/o complejos multiunitarios de la presente divulgación pueden ser solubles y pueden aislarse o purificarse a homogeneidad. Las unidades monoméricas de un complejo multiunitario pueden ser diferentes, homólogas, sustancialmente homólogas, o idénticas entre sí. Sin embargo, un complejo multiunitario de la divulgación incluye al menos un monómero que comprende un polipéptido de HRS tal como se describe en el presente documento o, en otras realizaciones, al menos dos o más polipéptidos de HRS tal como se describe en el presente documento.

Los monómeros enlazados covalentemente pueden estar enlazados directamente (por enlaces) o indirectamente (por ejemplo, mediante un enlazador). Para enlazar directamente el polipéptido descrito en el presente documento, puede ser beneficioso modificar los polipéptidos para mejorar la dimerización. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de un polipéptido de HRS puede modificarse mediante la adición o sustitución de una o más cisteínas. Procedimientos para crear sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de cisteína, u otras modificaciones para facilitar el enlazado, son bien conocidas por los expertos en la materia.

La divulgación también contempla el uso de polipéptidos de HRS modificados, que incluyen modificaciones que mejoran características deseadas de un polipéptido e HRS, tal como se describe en el presente documento. Modificaciones ilustrativas de polipéptidos de HRS de la invención incluyen, aunque no se limitan a, derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de las cadenas laterales, modificaciones de la cadena principal, y modificaciones N- y/o C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la fijación de restos de hidratos de carbono o lípidos, cofactores, y similares. Las modificaciones ejemplares también incluyen la pegilación de un polipéptido de HRS (véase, por ejemplo, Veronese y Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 453-456, 2002, que se incorpora al presente documento por referencia).

En ciertos aspectos, se puede utilizar tecnología de ligamiento quimioselectivo para modificar polipéptidos de HRS de la invención, tal como fijando polímeros de una manera específica de sitio y controlada. Dicha tecnología normalmente se basa en la incorporación de anclajes quimioselectivos en la cadena principal esqueleto de la proteína ya sea por medios químicos o recombinantes y la posterior modificación con un polímero que porta un enlazador complementario. Como resultado, el procedimiento de ensamblaje y la estructura covalente del conjugado de proteína-polímero resultante pueden estar controladas, lo que permite la optimización racional de propiedades de fármacos, tales como la eficacia y propiedades farmacocinéticas (véase, por ejemplo, Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9:555-560, 2005).

Los polipéptidos de HRS descritos en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia, tal como mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, los polipéptidos de HRS se pueden preparar mediante un procedimiento que incluye las etapas de: (a) preparar una construcción que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de HRS y que está enlazada operativamente a un elemento regulador; (b) introducir la construcción en una célula huésped; (c) cultivar la célula huésped para expresar el polipéptido de HRS; y (d) aislar el polipéptido de HRS de la célula huésped. Polipéptidos de HRS recombinantes se pueden preparar convenientemente utilizando protocolos estándar como se describe por ejemplo en Sambrook, *y col.*, (1989, *supra*), en particular secciones 16 y 17; Ausubel *y col.*, (1994, *supra*), en particular capítulos 10 y 16; y Coligan *y col.*, *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular capítulos 1, 5 y 6.

Además de procedimientos de producción recombinante, los polipéptidos de la invención, y fragmentos de los mismos, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Como alternativa, diversos fragmentos pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir la molécula deseada.

#### Composiciones de polinucleótidos

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido variante de splicing de HRS que se describe en el presente documento, así como composiciones que comprenden dichos polinucleótidos. En ciertas realizaciones, normalmente debido a la naturaleza singular de una variante de splicing de HRS, que combina los exones de una manera nueva o excepcional, los polinucleótidos de HRS comprenden una unión de splicing única o excepcional. Polinucleótidos variantes de splicing de HRS de referencia ejemplares incluyen las SEQ ID NO: 5, 8 y 10, y las variantes y complementos de las mismas.

También se divulgan dentro de los polinucleótidos de HRS de la presente invención cebadores, sondas, oligonucleótidos antisentido y agentes de interferencia de ARN que comprenden todos o una parte de estos polinucleótidos de referencia, que son complementarios a todos o una parte de estos polinucleótidos de referencia, o que hibridan específicamente con estos polinucleótidos de referencia, tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificantes, aunque está aislada sustancialmente lejos de, o purificada libre de, ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el segmento de ADN. Se incluyen dentro de los términos "segmento de ADN" y "polinucleótido" segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus, y similares.

También se divulgan secuencias de polinucleótidos de esta invención que pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extra-genómicas y codificadas por plásmidos y segmentos de genes manipulados más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Dichos segmentos pueden

estar aislados de forma natural o modificados de forma sintética por la mano del hombre.

Tal como será reconocido por el experto en la materia, los polinucleótidos de la divulgación pueden ser monocatenarios (codificante o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser ADN (genómico, cADN o sintético) o moléculas de ARN.

5 Secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, aunque no es necesario, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, aunque no es necesario, estar enlazado a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido de HRS de la invención o una parte del mismo) o pueden comprender una variante, o un equivalente funcional biológico de dicha secuencia. Las variantes polinucleotídicas pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente más adelante, preferentemente, tales que la actividad no canónica deseada del polipéptido codificado no está sustancialmente disminuida con respecto al polipéptido sin modificar. El efecto sobre la actividad del polipéptido codificado puede valorar generalmente tal como se describe en el presente documento y tal como se reconocía en la técnica.

La presente divulgación proporciona además fragmentos aislados de polinucleótidos que comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica o complementaria a un polinucleótido variante de splicing de HRS (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 8 o 10), tal como se describe en el presente documento, donde el polinucleótido aislado codifica un polipéptido variante de splicing de HRS de la invención, o un fragmento activo o variante del mismo.

Por ejemplo, se divulgan polinucleótidos mediante que codifican al menos aproximadamente 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o más, residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de HRS de la invención, así como todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tal como 21, 22, 23, etc.; 31, 32, 33, etc.; 41, 42, 43, etc.

Los polinucleótidos de la presente divulgación, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de modo que su longitud global puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud; con la longitud total estando preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

Tal como se ha indicado anteriormente, ciertas realizaciones se refieren a polinucleótidos de HRS que codifican un polipéptido de HRS. Entre otros usos, estas realizaciones se pueden utilizar para producir de forma recombinante un polipéptido de HRS deseado o variante del mismo, o para expresar el polipéptido de HRS en una célula o sujeto seleccionado. Será apreciado por los expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que pueden codificar un polipéptido de HRS dado, tal como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos pueden portar solamente una homología limitada a la secuencia de nucleótidos de referencia. No obstante, se entendería que dichos polinucleótidos (es decir, polinucleótidos variantes degenerados) codifican el mismo polipéptido. Por consiguiente, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones están contemplados específicamente por la presente invención, por ejemplo los polinucleótidos que están optimizados para la selección de codones humanos y/o de primates.

Además, alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento están dentro de la presente divulgación. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El mRNA y la proteína resultantes pueden, aunque no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación con secuencias de una base de datos).

Los polinucleótidos y fusiones de los mismos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse usando cualquiera de diversas técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Por ejemplo, secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos de la divulgación, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de los mismos, pueden usarse en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido de HRS de la invención en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente pueden producirse y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado.

Tal como será entendido por los expertos en la materia, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias

de nucleótidos que codifican el polipéptido que poseen codones no de origen natural. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procarionta o eucarionta particular, pueden seleccionarse para aumentar la tasa de expresión de proteínas o para producir un transcrito de ARN recombinante que tenga propiedades deseables, tales como una semi-media que sea más larga que la de un transcrito generado a partir de la secuencia de origen natural.

5 Además, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención pueden genomanipularse usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificantes de polipéptidos por diversas razones, incluyendo aunque sin limitarse a, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento, la expresión y/o la actividad del producto génico.

10 Con el fin de expresar un polipéptido deseado, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, o un equivalente funcional, puede insertarse en el vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que  
15 contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y los elementos de control transcripcionales y traduccionales apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. Dichas técnicas se describen en Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989).

20 Diversos sistemas vector/huésped de expresión son conocidos y pueden usarse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, aunque no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo,  
25 virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales, incluyendo sistemas de expresión basados en virus.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no  
30 traducidas del vector-potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' - que interactúan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y el huésped utilizado, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido  
35 PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o el plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En los sistemas de células de mamíferos, generalmente se prefieren promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse ventajosamente vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

40 También pueden usarse señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficiente de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular particular que se usa, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf. y col., *Results Probl. Cell*  
45 *Differ.* 20:125-162 (1994)).

Además, una cepa de células huéspedes puede seleccionarse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la forma deseada. Tales modificaciones postraduccionales del polipéptido pueden incluir, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación,  
50 fosforilación, lipidación y acilación. También puede usarse procesamiento postraduccionales que escinde una forma "prepro" de la proteína para facilitar la inserción, plegamiento y/o función. Pueden seleccionarse diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña.

55 Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, generalmente se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable un polinucleótido de interés pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo o en un vector independiente. Tras la introducción  
60 del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es otorgar resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Los clones

resistentes de células transformadas de forma estable pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estos 5 incluyen, pero no se limitan a, timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler y col., Cell 11:223-232 (1977)) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22:817-823 (1990)) genes que pueden emplearse en células tk- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567-70 (1980)); npt, que otorga resistencia a la aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin y col., J. 10 Mol. Biol. 150:1-14 (1981)); y als o pat, que otorgan resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra).

Diversos protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto son conocidos en la técnica. Los ejemplos 15 incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton t col., Serological Methods, a Laboratory Manual (1990) y Maddox y col., J. Exp. Med. 158:1211-1216 (1983).

Las células huésped transformadas con una secuencia de polinucleótidos de interés pueden cultivarse en condiciones 20 adecuadas para la expresión y la recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede ser secretada o estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Tal como será entendido por los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procarionota o eucariota. Pueden usarse otras construcciones 25 recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles.

Además de procedimientos de producción recombinante, los polipéptidos de la invención, y fragmentos de los mismos, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 30 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Como alternativa, diversos fragmentos pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir la molécula de longitud completa.

Según otro aspecto de la invención, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención pueden 35 administrarse a un sujeto in vivo, por ejemplo, usando técnicas de terapia génica. Terapia génica se refiere, en general, a la transferencia de ácidos nucleicos heterólogos a las ciertas células, células diana, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para las que se busca dicha terapia. El ácido nucleico se introduce en las células diana seleccionadas de tal manera que el ADN heterólogo se expresa y se produce un producto terapéutico 40 codificado por él.

Diversos vectores virales que pueden utilizarse para la terapia génica tal como se enseña en el presente documento incluyen adenovirus, herpesvirus, vaccinia, virus adeno-asociado (AAV), o, preferentemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar o es un vector 45 lentiviral. El vector retroviral preferido es un vector lentiviral. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que un gen extraño se puede insertar incluyen, aunque no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), SIV, BIV, HIV y virus del sarcoma de Rous (RSV). Un número de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de forma que las células transducidas 50 se puedan identificar y generar. Insertando una secuencia polipeptídica de unión a ADN derivada de un dedo de cinc de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector puede hacerse específico de la diana. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana insertando, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína (dímero). El direccionamiento ilustrativo puede conseguirse mediante el uso de un anticuerpo para dirigir el vector retroviral. Los expertos en la materia 55 conocerán, o podrán determinar fácilmente sin excesiva experimentación, secuencias de polinucleótidos específicas que pueden insertarse en el genoma retroviral para permitir suministro específico de la diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido de proteína de unión nucleótidos del dedo de cinc.

Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, requieren ayuda con el fin de producir partículas de vector 60 infecciosas. Esta ayuda puede proporcionarse, por ejemplo, mediante el uso de líneas celulares auxiliares que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro de la LTR. Estos plásmidos carecen de una secuencia de nucleótidos que permita que el

mecanismo de empaquetamiento reconozca un transcrito de ARN para encapsulación. Las líneas celulares auxiliares que tienen delecciones de la señal de empaquetamiento incluyen, aunque no se limitan a PSI.2, PA317 y PA12, por ejemplo. Estas líneas celulares producen viriones vacíos, ya que no se empaqueta genoma. Si un vector retroviral se introduce en dichas células en las que la señal de empaquetamiento está intacta, pero los genes estructurales se sustituyen por otros genes de interés, el vector puede empaquetarse y el virión del vector producirse. Los viriones del vector producidos mediante este procedimiento pueden usarse entonces para infectar una línea celular de tejido, tal como células NIH 3T3, para producir grandes cantidades de viriones retrovirales quiméricos.

También pueden utilizarse técnicas de administración "no virales" para la terapia génica, incluidos, por ejemplo, complejos de ligandos de ADN, complejos de ligandos de adenovirus de ADN, inyección directa de ADN, precipitación de  $\text{CaPO}_4$ , técnicas de biolística, electroporación, liposomas, lipofección, y similares. Cualquiera de estos procedimientos está comúnmente disponible a un experto en la materia y sería adecuado para su uso en la presente invención. Otros procedimientos adecuados están disponibles para un experto en la materia, y debe entenderse que la presente invención puede realizarse usando cualquiera de los procedimientos de transfección disponibles. La lipofección puede realizarse encapsulando una molécula de ADN aislada dentro de una partícula liposómica y poniendo en contacto la partícula liposómica con la membrana celular de la célula diana. Los liposomas son partículas coloidales de auto-ensamblaje en las que una bicapa lipídica, compuesta por moléculas anfífilas tales como fosfatidil serina o fosfatidil colina, encapsula una parte del medio circundante de tal manera que la bicapa lipídica rodea un interior hidrófilo. Pueden construirse liposomas unilaminares multilaminares de modo que el interior contenga un producto químico, fármaco, o, como en la presente invención, una molécula de ADN aislada.

Ciertas realizaciones incluyen polinucleótidos que hibridan con una secuencia de polinucleótido de HRS referencia, o con sus complementos, en condiciones de astringencia descritas a continuación. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "hibrida en condiciones de baja astringencia, astringencia media, astringencia alta o astringencia muy alta" describe condiciones para hibridación y lavado. Orientación para la realización de las reacciones de hibridación puede encontrarse en Ausubel y col., (1998, *supra*), secciones 6.3.1-6.3.6. Procedimientos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y puede usarse cualquiera.

La referencia en el presente documento a condiciones de baja astringencia incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente el 1% v/v hasta al menos aproximadamente el 15% v/v de formamida y desde sal al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para hibridación a 42°C, y sal de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para el lavado a 42°C. Condiciones de baja astringencia también puede incluir albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, EDTA 1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) 2 × SSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavado a temperatura ambiente. Una realización de condiciones de baja astringencia incluye hibridación en 6 × cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida de dos lavados en 0,2 × SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados se puede aumentar a 55°C para condiciones de baja astringencia).

Las condiciones de astringencia media incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente el 16% v/v hasta al menos aproximadamente el 30% v/v de formamida y desde sal al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación a 42°C, y sal de al menos aproximadamente 0,1 M a al menos aproximadamente 0,2 M para el lavado a 55°C. Condiciones de astringencia media también puede incluir albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, EDTA 1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) 2 × SSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavado a 60-65°C. Una realización de condiciones de astringencia media incluye la hibridación en 6 × SSC a aproximadamente 45°C, seguida de uno o más lavados en 0,2 × SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Las condiciones de astringencia alta incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente el 31% v/v hasta al menos aproximadamente el 50% v/v de formamida y desde sal al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M para hibridación a 42°C, y sal de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,02 M para el lavado a 55°C.

Condiciones de astringencia alta también puede incluir BSA al 1%, EDTA 1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) 0,2 × SSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  40 mM (pH 7,2), SDS al 1% para lavado a más de 65°C. Una realización de condiciones de astringencia alta incluye la hibridación en 6 × SSC a aproximadamente 45°C, seguida de uno o más lavados en 0,2 × SSC, SDS al 0,1% a 65°C. Una realización de condiciones de astringencia muy alta incluye la hibridación en fosfato sódico 0,5 M SDS al 7% a 65°C, seguida de uno o más lavados en 0,2 × SSC, SDS al 1% a 65°C.

Otras condiciones de astringencia son bien conocidas en la técnica y un experto en la materia reconocerá que diversos factores pueden manipularse para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la astringencia de los lavados finales puede servir para garantizar un alto grado de hibridación. Para ejemplos detallados, véase Ausubel y col., *supra* en las páginas 2.10.1 a 2.10.16 y Sambrook y col. (1989, *supra*) en las secciones 1.101 a 1.104.

Aunque se llevan a cabo normalmente lavados astringentes a temperaturas de aproximadamente 42°C a 68°C, un experto en la materia apreciará que otras temperaturas pueden ser adecuadas para condiciones astringentes. La tasa de de hibridación máxima normalmente se produce a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la  $T_m$  para la formación de un híbrido ADN-ADN. Es bien conocido en la técnica que la  $T_m$  es la temperatura de fusión, o temperatura a la que dos secuencias de polinucleótidos complementarias se disocian. Los procedimientos para la estimación de  $T_m$  son bien conocidos en la técnica (véase Ausubel y col., *supra* en la página 2.10.8).

En general, la  $T_m$  de un dúplex perfectamente emparejado de ADN puede ser predicha como una aproximación mediante la fórmula:  $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\%G + C) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - (600/\text{longitud})$  donde: M es la concentración de  $\text{Na}^+$ , preferentemente en el intervalo de 0,01 molar a 0,4 molar; el %G+C es la suma de bases guanosina y citosina como un porcentaje del número total de bases, dentro del intervalo entre el 30% y el 75% de G+C; el % de formamida es la concentración porcentual de formamida en volumen; longitud es el número de pares de bases en el dúplex de ADN. La  $T_m$  de un dúplex de ADN disminuye en aproximadamente 1°C con cada incremento de un 1% en el número de pares de bases emparejada erróneamente al azar. El lavado se lleva a cabo generalmente a una  $T_m - 15^\circ\text{C}$  para alta astringencia, o  $T_m - 30^\circ\text{C}$  para astringencia moderada.

En un ejemplo de un procedimiento de hibridación, una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nylon) que contiene el ADN inmovilizado se hibrida durante la noche a 42°C en un tampón de hibridación (formamida desionizada al 50%, 5 × SSC, 5 × solución de Denhardt (Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1% y albúmina de suero bovino al 0,1%), SDS al 0,1% y 200 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado) que contenía una sonda etiquetada. La membrana se somete a continuación a dos lavados de astringencia media secuenciales (es decir, 2 × SSC, SDS 0,1% durante 15 min a 45°C, seguido por 2 × SSC, SDS 0,1% durante 15 min a 50°C), seguidos de dos lavados de astringencia más alta secuenciales (es decir, 0,2 × SSC, SDS al 0,1% durante 12 min a 55°C seguido de 0,2 × SSC y solución de SDS al 0,1% durante 12 minutos a 65-68°C).

Las realizaciones de la presente descripción también incluyen oligonucleótidos, ya sea para la detección, amplificación, terapias antisentido o para otros fines. Para estos y fines relacionados, el término "oligonucleótido" u "oligo" u "oligómero" pretende abarcar un "oligonucleótido" singular así como "oligonucleótidos" plurales, y se refiere a cualquier polímero de dos o más de los nucleótidos, nucleósidos, nucleobases o compuestos relacionados que se usan como reactivo en los procedimientos de amplificación de la presente invención, así como los procedimientos de detección posteriores. El oligonucleótido puede ser ADN y/o ARN y/o análogos de los mismos.

El término oligonucleótido no necesariamente indica cualquier función en particular para el reactivo, en su lugar, se usa genéricamente para abarcar todos dichos reactivos descritos en el presente documento. Un oligonucleótido puede cumplir diversas funciones diferentes, por ejemplo, puede funcionar como un cebador si es capaz de hibridar con una cadena complementaria y además puede extenderse en presencia de un ácido nucleico polimerasa, puede proporcionar un promotor si contiene una secuencia reconocida por una ARN polimerasa y permite la transcripción, y puede funcionar para prevenir la hibridación o impedir la extensión del cebador si está adecuadamente situado y/o modificado. Un oligonucleótido puede funcionar también como una sonda, o un agente antisentido. Un oligonucleótido puede ser virtualmente de cualquier longitud, limitada solamente por su función específica, por ejemplo, en una reacción de amplificación, en la detección de un producto de amplificación de la reacción de amplificación, o en una aplicación de interferencia o ARN antisentido. Cualquiera de los oligonucleótidos descritos en el presente documento puede usarse como un cebador, una sonda, un oligómero antisentido o un agente de interferencia de ARN.

El término "cebador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido monocatenario capaz de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de ADN dirigida por plantilla en condiciones adecuadas definidas, por ejemplo, por tampón y temperatura, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente para polimerización, tal como ADN o ARN polimerasa o transcriptasa inversa. La longitud del cebador, en cualquier caso dado, depende, por ejemplo, del uso pretendido del cebador, y generalmente varía de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, aunque se pueden usar cebadores más cortos y más largos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con la plantilla. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla pero debe ser suficientemente complementario para hibridar con dicha plantilla. El sitio del cebador es el área de la plantilla con la que hibrida un cebador. El par de cebadores es un conjunto de cebadores que incluyen un cebador aguas arriba 5' que hibrida con el extremo 5' de la secuencia a amplificar y un cebador aguas abajo 3' que hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia a amplificar.

El término "sonda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula inmovilizada en la superficie que puede ser reconocida por una diana particular. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.582.908 para un ejemplo de matrices que tienen todas las posibles combinaciones de sondas con 10, 12 y más bases. Las sondas y cebadores tal como se usan en el presente documento normalmente comprenden al menos 10-15 nucleótidos contiguos de una secuencia conocida. Con el fin de potenciar la especificidad, también pueden emplearse

sondas y cebadores más largos, tales como sondas y cebadores que comprenden al menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o al menos 150 nucleótidos de una secuencia de referencia de HRS o su complemento. Las sondas y cebadores pueden ser considerablemente más largos que estos ejemplos, y se entiende que puede usarse cualquier longitud apoyado por el conocimiento de la técnica y de la memoria descriptiva, incluyendo las tablas, figuras y lista de secuencias.

Procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores se describe en las referencias, por ejemplo Sambrook, J. y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; Ausubel, F. M. y col. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, Nueva York N.Y.; Innis, M. y col. (1990) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego Calif. Pares de cebadores de PCR pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas informáticos destinados a este fin, tales como Primer (Versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge Mass.).

Los oligonucleótidos para uso como cebadores o sondas pueden seleccionarse usando un software conocido en la técnica. Por ejemplo, el software OLIGO 4.06 es útil para la selección de pares de cebadores de PCR de hasta 100 nucleótidos cada uno, y para el análisis de los oligonucleótidos y polinucleótidos más grandes de hasta 5.000 nucleótidos a partir de una secuencia de polinucleótido de entrada de hasta 32 kilobases. El programa de selección de cebadores Primer3 (a disposición del público del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge Mass.) permite al usuario introducir una "biblioteca de cebado defectuoso", en la que las secuencias a evitar como sitios de unión al cebador son especificadas por el usuario. Los fragmentos de oligonucleótidos y polinucleótidos identificados mediante cualquiera de los procedimientos de selección anteriores son útiles en tecnologías de hibridación, por ejemplo, como PCR o cebadores de secuenciación, elementos de micromatrices, o sondas específicas para identificar total o parcialmente polinucleótidos complementarios en una muestra de ácidos nucleicos. Los procedimientos de selección de oligonucleótidos no se limitan a los descritos en el presente documento.

Las expresiones "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" u "oligonucleótido antisentido" se usan de forma intercambiable y se refieren a una secuencia de subunidades cíclicas, que portan cada una un resto de apareamiento de bases, enlazadas mediante enlaces entre subunidades que permiten que los restos de apareamiento de bases hibriden con una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) mediante apareamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana, y normalmente de ese modo prevenir la traducción de ese ARN. También se incluyen procedimientos de uso de los mismos para modular la expresión de un transcrito de HRS seleccionado, tal como una variante de splicing o un fragmento proteolítico, y/o su polipéptido correspondiente.

Los oligonucleótidos antisentido pueden contener entre aproximadamente 8 y 40 subunidades, normalmente aproximadamente 8-25 subunidades, y preferentemente de aproximadamente 12 a 25 subunidades. Los oligonucleótidos pueden tener complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana o casi complementariedad, tal como se define a continuación. En ciertas realizaciones, el grado de complementariedad entre la diana y la secuencia antisentido de direccionamiento es suficiente para formar un dúplex estable. La región de complementariedad de los oligómeros antisentido con la secuencia de ARN diana puede ser de tan solo 8-11 bases, pero es preferentemente 12-15 bases o más, por ejemplo, de 12-20 bases, o 12-25 bases, incluyendo todos los números enteros en entre estos intervalos. Un oligómero antisentido de aproximadamente 14-15 bases es generalmente suficiente para tener una secuencia complementaria única en el direccionamiento al HRS seleccionado.

Oligómeros antisentido siempre que 40 bases pueden ser adecuados, en los que al menos un número mínimo de bases, por ejemplo, 10-12 bases, son complementarias a la secuencia diana. En general, sin embargo, la captación facilitada o activa en las células se optimiza en longitudes de oligómeros de menos de aproximadamente 30. Para ciertos oligómeros, descritos más adelante, un equilibrio óptimo de estabilidad de unión y captación se produce generalmente en longitudes de 18-25 bases. Están incluidos oligómeros antisentido (por ejemplo, PNA, LNA, 2'-OMe, MOE, morfolinos) que consisten en aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases, en los que al menos aproximadamente 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases contiguas o no contiguas son complementarias a su secuencia diana de HRS, o variantes de la misma.

Los oligómeros antisentido pueden ser 100% complementarios a la secuencia diana de ácido nucleico de HRS, o pueden incluir emparejamientos erróneos, por ejemplo, para acomodar variantes, siempre que un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia diana de ácido nucleico de HRS sea suficientemente estable para resistir la acción de nucleasas celulares y otros modos de degradación que pueden ocurrir in vivo. A continuación se describen cadenas principales de oligómeros que son menos susceptibles a escisión por nucleasas. Los emparejamientos erróneos, si están presentes, son menos desestabilizadores hacia las regiones de extremo del dúplex híbrido que en el medio. El número de emparejamientos erróneos permitidos dependerá de la longitud del oligómero, el porcentaje

de G:C de pares de bases en el dúplex, y la posición del emparejamiento o emparejamientos erróneos en el dúplex, según principios bien entendidos de la estabilidad del dúplex. Aunque dicho oligómero antisentido no es necesariamente 100% complementario a la secuencia diana de ácido nucleico de HRS, es eficaz para unirse de forma estable y específica a la secuencia diana, de tal manera que una actividad biológica de la diana de ácido nucleico, por ejemplo, expresión de la proteína o proteínas de HRS, es modulada.

La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y una secuencia diana está en función de la  $T_m$  de unión y la susceptibilidad del dúplex a la escisión enzimática celular. La  $T_m$  de un oligonucleótido antisentido con respecto al RNA de secuencia complementaria se puede medir mediante procedimientos convencionales, tales como los descritos Hames y col., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, págs. 107-108 o como se describe en Miyada C.G. y Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154, págs. 94-107. En ciertas realizaciones, el oligómero antisentido puede tener una  $T_m$  de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, mayor que la temperatura corporal y preferentemente mayor que 50°C. Se prefieren  $T_m$  de en el intervalo de 60-80°C o mayor. Según principios bien conocidos, la  $T_m$  de un compuesto oligómero, con respecto a un híbrido de ARN con bases complementarias, se puede aumentar mediante el aumento de la relación de bases apareadas C:G en el dúplex, y/o mediante el aumento de la longitud (en pares de bases) del heterodúplex.

Pueden diseñarse oligómeros antisentido para bloquear o inhibir la traducción de mRNA o para inhibir el procesamiento natural pre-splicing de mRNA, o inducir la degradación de mRNA diana, y puede decirse que es "dirigido a" o "dirigido contra" una secuencia diana con la que hibrida. En ciertas realizaciones, la secuencia diana puede incluir cualquier secuencia codificante o no codificante de un transcrito de mRNA de HRS y puede estar, por lo tanto, dentro de un exón o dentro de un intrón. En ciertas realizaciones, la secuencia diana es relativamente única o excepcional entre las HRS y es selectiva para la reducción de la expresión de un fragmento proteolítico o variante de splicing de HRS seleccionada. En ciertas realizaciones, el sitio diana incluye un sitio de splicing 3' o 5' de un mRNA pre-procesado, o un punto de ramificación. La secuencia diana para un sitio de splicing puede incluir una secuencia de mRNA que tiene su extremo 5' de 1 a aproximadamente 25 a aproximadamente 50 pares de bases aguas abajo de una unión aceptora de splicing o aguas arriba de una unión donadora de splicing en un mRNA preprocesado. En ciertas realizaciones, una secuencia diana puede incluir una unión de splicing de un mRNA de HRS splicing alternativo, tal como una unión de splicing que no se produce en la HRS de longitud completa, o es única o excepcional a ese transcrito, dado que bien no se produce o solamente se produce rara vez en otras variantes de splicing de HRS. Se dice se forma más general dice que un oligómero está "dirigido contra" una diana biológicamente relevante, tal como un polinucleótido de HRS de referencia, cuando está dirigido contra el ácido nucleico de la diana de la manera descrita en el presente documento.

Una "subunidad" de un oligonucleótido se refiere a una unidad de nucleótido (o análogo de nucleótido). La expresión puede referirse a la unidad de nucleótido con o sin el enlace entre subunidades adjunto, aunque, cuando se hace referencia a una "subunidad cargada", la carga reside normalmente dentro de la unión entre subunidades (por ejemplo, un enlace fosfato o fosforotioato o un enlace catiónico).

Las subunidades cíclicas de un oligonucleótido pueden estar basadas en ribosa o otro azúcar de pentosa o, en ciertas realizaciones, grupos alternativos o modificados. Ejemplos de cadenas principales de oligonucleótidos modificadas incluyen, aunque no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida, donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se contemplan ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos de 2'-O-metilo (2'OMe), oligonucleótidos de 2'-metoxietoxi (MOE), morfolinis, entre otros oligonucleótidos conocidos en la técnica.

El resto de apareamiento de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. También se incluyen bases como piridina-4-ona, piridina-2-ona, fenil, pseudouracil, 2,4,6-trime115toxi benceno, 3-metil-uracil, dihidrouridina, naftil, aminofenil, 5-alquilcitolinas (por ejemplo, 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (por ejemplo, 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wybutosina, wybutoxosina, 4-acetilidina, 5-(carbohidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina,  $\beta$ -D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitolina, 2-metildenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiouridina, 5-metilcarbonina-etiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina,  $\beta$ -D-mannosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético, 2-tiocitolina, derivados de treonina y otros (Burgin y col., 1996, *Biochemistry*, 35, 14090; Uhlman y Peyman, *supra*). Por "bases modificadas" en este aspecto se entiende bases de nucleótidos distintas de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), como se ha ilustra anteriormente;

dichas bases pueden usarse en cualquier posición en la molécula antisentido. Los expertos en la materia apreciarán que, dependiendo de los usos de los oligómeros, las T y U son intercambiables. Por ejemplo, con otras químicas antisentido como oligonucleótidos antisentido 2'-O-metilo que son más similares a ARN, las bases T pueden mostrarse como U.

- 5 Un oligonucleótido es normalmente complementario a una secuencia diana, tal como un ADN o ARN diana. Los términos "complementarios" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados mediante las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T," es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las
- 10 bases de los ácidos nucleicos están emparejadas según las reglas de apareamiento de bases. O, puede haber complementariedad "completa" o "total" (100%) entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Aunque a menudo se desea complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más, pero preferentemente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 emparejamientos erróneos
- 15 con respecto a la secuencia diana. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En ciertas realizaciones, variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero son generalmente preferibles a las variaciones en el interior, y si están presentes están normalmente dentro de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos del extremo 3' y/o 5'.
- 20 La expresión "secuencia diana" se refiere a una parte del ARN diana contra la que se dirige el oligonucleótido, es decir, la secuencia con la que el oligonucleótido hibridará por apareamiento de bases de Watson-Crick de una secuencia complementaria. En ciertas realizaciones, la secuencia diana puede ser una región contigua de un mARN de HRS (por ejemplo, una unión de splicing exclusiva de un mARN de HRS), o puede estar compuesta por regiones no contiguas del mARN.
- 25 La expresión "secuencia de direccionamiento" o, en ciertas realizaciones, "secuencia de direccionamiento antisentido" se refiere a la secuencia en un oligonucleótido que es complementaria (es decir, además, sustancialmente complementaria) a la secuencia diana en la molécula diana de ADN o ARN. La secuencia entera, o sólo una parte, del compuesto antisentido puede ser complementaria a la secuencia diana. Por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene
- 30 20-30 bases, aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 pueden ser secuencias de direccionamiento que son complementarias a la región diana. Normalmente, la secuencia de direccionamiento está formada por bases contiguas, pero, como alternativa, puede estar formada por secuencias no contiguas que, cuando se colocan juntas, por ejemplo, a partir de extremos opuestos del oligonucleótido, constituyen una secuencia que abarca la secuencia diana.
- 35 Las secuencias diana y de direccionamiento se describen como "complementarias" entre sí cuando se produce la hibridación en una configuración antiparalela. Una secuencia de direccionamiento puede tener "casi" complementariedad o complementariedad "sustancial" con la secuencia diana y aún funcionar para el fin de la presente invención, es decir, que aún puede ser funcionalmente "complementaria".
- 40 Un oligonucleótido "hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligómero hibrida con una diana (por ejemplo, un polinucleótido de HRS de referencia o su complemento) en condiciones fisiológicas, con una  $T_m$  sustancialmente mayor que 45°C, preferentemente al menos 50°C, y normalmente 60°C-80°C o superior. Dicha hibridación corresponde preferentemente a condiciones de hibridación astringentes. A una fuerza iónica y pH dados,
- 45 la  $T_m$  es la temperatura a la cual el 50% de una secuencia diana hibrida con un polinucleótido complementario. Una vez más, dicha hibridación puede producirse "casi" complementariedad o complementariedad "sustancial" del oligómero antisentido respecto a la secuencia diana, así como con complementariedad exacta.
- Las expresiones se unen específicamente o hibrida específicamente se refieren en general a una sonda de
- 50 oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos que no sólo se une a su secuencia de genes diana prevista en una muestra en condiciones de hibridación seleccionadas, pero no se une significativamente a otras secuencias diana en la muestra, y de este modo discrimina entre su diana prevista y todos las demás dianas en la reserva diana. Una sonda que hibrida específicamente con su secuencia diana pretendida también puede detectar diferencias de concentración en las condiciones de hibridación seleccionadas, tal como se describe en el presente documento.
- 55 Tal como se indicó anteriormente, ciertos oligonucleótidos proporcionados en el presente documento incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA). También se incluyen subunidades de "ácido nucleico bloqueado" (LNA). Las estructuras de LNA son conocidas en la técnica: por ejemplo, Wengel, y col., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54, 3607 y Accounts of Chem. Research (1999) 32, 301; Obika, y col., Tetrahedron Letters (1997) 38, 8735;
- 60 (1998) 39, 5401 y Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16, 9230. Ciertos oligonucleótidos pueden comprender subunidades basadas en morfolino que portan restos de apareamiento de bases, unidos por enlaces no cargados o sustancialmente no cargados. Las expresiones "oligómero de morfolino" o "PMO" (oligómero de morfolino

fosforamidato o fosforodiamidato) se refieren a un análogo de oligonucleótido compuesto por estructuras de subunidad de morfolino, donde (i) las estructuras están unidas entre sí mediante enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferentemente dos átomos de longitud, y preferentemente no cargados o catiónicos, que unen el nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono 5' exocíclico de una subunidad adyacente, y (ii) cada anillo morfolino porta una purina o pirimidina o un resto de apareamiento de bases equivalente eficaz para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de base, a una base en un polinucleótido.

Los oligonucleótidos pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida por etapas, empleando procedimientos detallados en las referencias citadas anteriormente, y a continuación con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla de enlaces de la cadena principal no cargados y catiónicos. En algunos casos, puede ser deseable añadir restos químicos adicionales al oligonucleótido, por ejemplo, para mejorar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Dicho resto puede estar unido covalentemente, normalmente a un extremo del oligómero, según procedimientos sintéticos estándar. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol o de otro polímero hidrófilo, por ejemplo, uno que tiene 10-100 subunidades monoméricas, puede ser útil para potenciar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, por ejemplo, grupos cargados aniónicos tales como un ácido orgánico, pueden potenciar la captación celular.

Pueden usarse diversas moléculas detectables para hacer a un oligonucleótido detectable, tal como radioisótopos, fluorocromos, colorantes, enzimas, nanopartículas, marcadores quimioluminiscentes, biotina, u otro monómero conocido en la técnica que puede ser detectado directamente (por ejemplo, por la emisión de luz) o indirectamente (por ejemplo, mediante la unión de un anticuerpo etiquetado fluorescentemente).

Ciertas realizaciones se refieren a agentes de interferencia de ARN (ARNi) que se dirigen a uno o más transcritos de mRNA de un polinucleótido de referencia de HRS, incluyendo fragmentos y variantes de los mismos. También se incluyen procedimientos de uso de los mismos para modular los niveles de un transcrito de HRS seleccionado, tal como una variante de splicing o fragmento proteolítico de HRS.

El término "bicatenario" significa dos cadenas de ácido nucleico independientes que comprenden una región en la que al menos una parte de las cadenas son suficientemente complementarias para unirse mediante puentes de hidrógeno y formar una estructura dúplex. El término "dúplex" o "estructura dúplex" se refiere a la región de una molécula bicatenaria en la que las dos cadenas independientes son sustancialmente complementarias, y por lo tanto hibridan entre sí. "dsARN" se refiere a una molécula de ácido ribonucleico que tiene una estructura dúplex que comprende dos cadenas de ácido nucleico complementarias y anti-paralelas (es decir, las cadenas sentido y antisentido). No todos los nucleótidos de un dsARN deben exhibir los pares de bases de Watson-Crick; las dos cadenas de ARN pueden ser sustancialmente complementarias. Las cadenas de ARN pueden tener el mismo o un número diferente de nucleótidos.

Las cadenas de un dsARN son suficientemente complementarias para hibridarse para formar una estructura dúplex. En ciertas realizaciones, la cadena de ARN complementaria puede ser de menos de 30 nucleótidos, de menos de 25 nucleótidos de longitud, o incluso de 19 a 24 nucleótidos de longitud. En ciertos aspectos, la secuencia de nucleótidos complementaria puede ser 20-23 nucleótidos de longitud, o 22 nucleótidos de longitud.

Al menos una de las cadenas de ARN comprende un nucleótido sobresaliente de 1 a 4 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, uno o ambos de las cadenas son de extremos romos. En ciertas realizaciones, el dsARN puede comprender además al menos un nucleótido modificado químicamente.

La divulgación puede comprender microARNs. Los micro-ARN representan un gran grupo de pequeños ARN producidos de forma natural en los organismos, algunos de los cuales regulan la expresión de genes diana. Los micro-ARN se forman a partir de un transcrito del precursor de la horquilla de nucleótido simple de aproximadamente 70 nucleótidos realizado por Dicer. (V. Ambros y col. *Current Biology* 13:807, 2003).

Ciertas realizaciones también pueden emplear ARN interferentes pequeños (siRNA). Cada cadena de un agente de siRNA puede ser igual a o menor de 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16 o 15 nucleótidos de longitud. La cadena es preferentemente de al menos 19 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena puede ser de entre 21 y 25 nucleótidos de longitud. Los agentes preferidos de siRNA tienen una región dúplex de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 pares de nucleótidos, y uno o más salientes, preferentemente uno o dos salientes 3', de 2-3 nucleótidos.

Un "agente de ARNi monocatenario" tal como se usa en el presente documento, es un agente de ARNi que se compone de una sola molécula. Éste puede incluir una región dúplex, formada por apareamiento intra-catenario, por ejemplo, puede ser, o incluir, una horquilla o estructura de sartén-mango. Un agente de ARNi monocatenario es de al menos 14, y más preferentemente de al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40 o 50 nucleótidos de longitud. Es preferentemente de menos de 200, 100 o 60 nucleótidos de longitud.

Los agentes moduladores de ARNi de horquilla pueden tener una región dúplex igual a o de al menos 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región dúplex preferentemente puede ser igual o inferior a 200, 100 o 50 de longitud. Ciertos intervalos para la región dúplex son 15-30, 17 a 23, 19 a 23, y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud. La horquilla puede tener un saliente monocatenario o región no apareada terminal, preferentemente 3', y 5 preferentemente del lado antisentido de la horquilla. En ciertas realizaciones, los salientes son de 2-3 nucleótidos de longitud.

La presente divulgación abarca además oligonucleótidos que emplean ribozimas. También se incluyen sistemas de administración de vectores que son capaces de expresar las secuencias de direccionamiento a HRS descritas en el 10 presente documento. Se incluyen los vectores que expresan siRNA u otras moléculas de interferencia de ARN que forman dúplex. Sistemas de suministro ejemplares pueden incluir sistemas de vector viral (es decir, transducción mediada por virus), incluyendo, aunque sin limitarse a, vectores retrovirales (por ejemplo, lentivirus), vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, y vectores virales de herpes, entre otros conocidos en la técnica.

15 Los oligonucleótidos y agentes de ARNi que se dirigen a una o más partes de una secuencia de referencia de polinucleótido de HRS o su complemento se pueden usar en cualquiera de procedimientos terapéuticos, de diagnóstico, o cribado de fármacos descritos en el presente documento y evidentes para los expertos en la materia.

#### Composiciones de anticuerpos, fragmentos de los mismos y otros agentes de unión

20 Según otro aspecto, la presente invención proporciona además el uso de agentes de unión, tales como anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, receptores solubles, aptámeros, moléculas pequeñas, etc., que exhiben especificidad de unión para un polipéptido variante de splicing de HRS o su socio de unión celular tal como se divulga en el presente documento, o a una parte, variante o derivado de los mismos, y los procedimientos de uso 25 de los mismos.

En algunas realizaciones, dichos agentes de unión serán eficaces para modular una o más de las actividades no canónicas mediadas por un polipéptido de HRS de la invención. En ciertas otras realizaciones, por ejemplo, el agente de unión es uno que se une a un polipéptido de HRS de la invención e inhibe su capacidad para unirse a uno o más 30 de sus socios de unión celulares. Por consiguiente, dichos agentes de unión pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades, trastornos u otras afecciones que están mediadas por, o moduladas por, un polipéptido de HRS de la invención antagonizando su actividad. En ciertas realizaciones, por ejemplo, el agente de unión se une al socio de unión celular de un polipéptido de HRS, e imita la actividad del polipéptido de HRS, tal como mediante aumentando o agonizando la actividad no canónica mediada por el polipéptido de HRS. Por consiguiente, dichos agentes de unión 35 pueden usarse para diagnosticar, tratar, o prevenir enfermedades, trastornos u otras afecciones que están mediadas por un polipéptido de HRS de la invención, tal como antagonizando o agonizando su actividad parcial o totalmente.

Se dice que un agente de unión tal como un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, "se unen específicamente", "se unen inmunológicamente" y/o es "inmunológicamente reactivo" a un polipéptido de la invención 40 si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ensayo ELISA) con el polipéptido, y no reacciona de forma detectable con polipéptidos no relacionados en condiciones similares.

La unión inmunológica, tal como se usa en este contexto, se refiere en general a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es 45 específica. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se pueden expresar en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en la que una  $K_d$  más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Uno dicho procedimiento implica la medición de las velocidades de formación y disociación de complejos antígeno/sitio de unión al antígeno, donde dichas velocidades dependen de las concentraciones de los 50 socios del complejo, la afinidad de la interacción, y de parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Así, tanto la "constante de asociación" ( $K_{on}$ ) como la "constante disociación" ( $K_{off}$ ) pueden determinarse mediante cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. La relación de  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con afinidad, y es así igual a la constante de disociación  $K_d$ . Véase, por ejemplo, Davies y col. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473.

55 Un "sitio de unión al antígeno" o "parte de unión" de un anticuerpo, se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones hipervariables" 60 que están interpuestos entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". De este modo, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de forma natural entre y adyacentes a regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de

una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen una respecto a otra en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesadas y ligeras se denominan "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR".

5

Un agente de unión puede ser, por ejemplo, un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido. En una realización preferida, un agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés se pueden preparar, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, y mejoras de la misma. Los polipéptidos de esta invención pueden usarse en el procedimiento de purificación en, por ejemplo, una etapa de cromatografía de afinidad.

10

15 Un fragmento "Fv" puede producirse mediante escisión proteolítica preferencial de una IgM y, en raras ocasiones, molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Los fragmentos Fv, sin embargo, se obtienen más comúnmente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero  $V_H:V_L$  no covalente que incluye un sitio de unión al antígeno que conserva gran parte de las capacidades de reconocimiento y unión al antígeno de la molécula de anticuerpo nativa. Inbar y col. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2659-2662; Hochman y col. 20 (1976) *Biochem* 15:2706-2710; y Ehrlich y col. (1980) *Biochem* 19:4091-4096.

Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("sFv") es un heterodímero  $V_H:V_L$  unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican  $V_H$  y  $V_L$  unidos por un enlazador que codifica el péptido. Huston y col. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5879-5883. Se han descrito una serie de procedimientos para discernir 25 estructuras químicas para convertir las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas de forma natural--pero separadas químicamente--de una región V del anticuerpo en una molécula sFv que se plegará a una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos No. 5.091.513 y 5.132.405, de Huston y col.; y la patente de Estados Unidos No. 4.946.778, de Ladner y col.

30

Cada una de las moléculas descritas anteriormente incluye un conjunto de CDR de cadena pesada y de cadena ligera, interpuesto, respectivamente, entre un conjunto FR de cadena pesada y de cadena ligera que proporcionan soporte a las CDR y definen la relación espacial de las CDR unas respecto a otras. Tal como se usa en el presente documento, el término "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. 35 Partiendo del extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denotan como "CDR1," "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Un sitio de unión al antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprende el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) se denomina en el presente documento una "unidad de reconocimiento molecular". El análisis cristalográfico de una serie de complejos antígeno-anticuerpo ha demostrado que los residuos de aminoácidos 40 de las CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, donde el contacto más extenso con el antígeno es con la CDR3 de cadena pesada. Por lo tanto, las unidades de reconocimiento moleculares son principalmente responsables de la especificidad de un sitio de unión al antígeno.

40

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de 45 aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos residuos de FR pueden contactar con antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables de plegar la región V en el sitio de unión al antígeno, particularmente los residuos de FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, ciertos residuos de aminoácidos y ciertas características estructurales están muy altamente conservadas. A este respecto, todas las secuencias de la región V contienen un bucle disulfuro interno de 50 aproximadamente 90 residuos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se muestran como motivos de bucle que se proyectan que forman una superficie de unión al antígeno. En general se reconoce que están conservadas regiones estructurales de las FR que influyen en la forma plegada de los bucles de CDR en ciertas estructuras "canónicas", independientemente de la secuencia de aminoácidos CDR precisa. Además, se sabe que ciertos residuos de FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción 55 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpos.

55

Se han descrito una serie de moléculas de anticuerpos "humanizados" que comprende un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor y sus CDR asociadas fusionadas a dominios constantes humanos (Winter y col. (1991) *Nature* 349:293-299; Lobuglio y col. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224; Shaw y col. (1987) *J Immunol.* 138:4534-4538; y Brown y col. (1987) *Cancer Res.* 47:3577-3583), CDR de roedor injertadas en una FR de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y

60

col. (1988) Science 239:1534-1536; y Jones y col. (1986) Nature 321:522-525), y CDR de roedor soportadas por FR de roedor revestidas de forma recombinante (publicación de patente europea No. 519.596, publicada el 23 de diciembre de 1992). Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo antihumano de roedor, lo que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos.

Tal como se indicó anteriormente, "péptidos" se incluyen como agentes de unión. El término péptido se refiere normalmente a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. En ciertas realizaciones, el término "péptido" se refiere a polipéptidos relativamente cortos, incluyendo péptidos que consisten en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos (por ejemplo, 5-10, 8-12, 10-15) entre medias, e interactuar con un polipéptido de HRS, su socio de unión celular, o ambos. Los péptidos pueden estar compuestos por aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos no de origen natural, tal como se describe en el presente documento.

Un agente de unión puede incluir un peptidomimético u otra molécula pequeña. Una "molécula pequeña" se refiere a un compuesto orgánico que es de origen sintético o biológico (biomolécula), pero no es normalmente un polímero. Los compuestos orgánicos se refieren a una amplia clase de compuestos químicos cuyas moléculas contienen carbono, normalmente excluyendo aquellos que contienen sólo carbonatos, óxidos simples de carbono o cianuros. Una "biomolécula" generalmente se refiere a una molécula orgánica que es producida por un organismo vivo, incluyendo moléculas poliméricas grandes (biopolímeros) tales como péptidos, polisacáridos y ácidos nucleicos también, y moléculas pequeñas tales como metabolitos primarios o secundarios, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, glicerolípidos, vitaminas y hormonas. Un "polímero" se refiere en general a una molécula grande o macromolécula compuesta por unidades estructurales repetitivas, que normalmente están conectadas por un enlace químico covalente.

En ciertas realizaciones, una molécula pequeña tiene un peso molecular de menos de 1000 Daltons, normalmente entre aproximadamente 300 y 700 Daltons, e incluyendo aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 Daltons.

Los aptámeros también están incluidos como agentes de unión. Los ejemplos de aptámeros incluyen aptámeros de ácido nucleico (por ejemplo, aptámeros de ADN, aptámeros de ARN) y aptámeros peptídicos. Aptámeros de ácido nucleico se refieren en general a especies de ácido nucleico que han sido genomanipuladas a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o un procedimiento equivalente, tales como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), para unirse a diversas dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, e incluso células, tejidos y organismos. Por lo tanto, están incluidos aptámeros de ácidos nucleicos que se unen a los polipéptidos de HRS descritos en el presente documento y/o sus socios de unión celular.

Los aptámeros peptídicos incluyen normalmente un bucle peptídico variable fijado en ambos extremos a una estructura de soporte de proteínas, una restricción estructural doble que normalmente aumenta la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables a la de un anticuerpo (por ejemplo, en el intervalo nanomolar). En ciertas realizaciones, la longitud del bucle variable puede estar compuesta por aproximadamente 10-20 aminoácidos (incluyendo todos los números enteros entre medias), y la estructura de soporte puede incluir cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad y compacidad. Ciertas realizaciones ejemplares pueden utilizar la proteína bacteriana tiorredoxina-A como proteína de estructura de soporte, siendo el bucle variable insertado dentro del sitio activo reductor (bucle Cys-Gly-Pro-Cys en la proteína salvaje), con las dos cadenas laterales de cisteína siendo capaces de formar un puente disulfuro. Por lo tanto, están incluidos aptámeros peptídicos que se unen a los polipéptidos de HRS descritos en el presente documento y/o sus socios de unión celular. La selección del aptámero peptídico se puede realizar usando diferentes sistemas conocidos en la técnica, incluyendo el sistema de dos híbridos de levadura.

Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos de HRS y los agentes de unión de la presente invención pueden usarse en cualquiera de los procedimientos de diagnóstico, de descubrimiento de fármacos, o terapéuticos descritos en el presente documento.

En otra realización de la invención, los agentes de unión tales como anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden acoplarse a uno o más agentes de interés. Por ejemplo, un agente terapéutico puede acoplarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un grupo enlazador). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Como alternativa, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo mediante un grupo enlazador. Un grupo enlazador puede funcionar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente con el fin de evitar la interferencia con las capacidades de unión. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo, y por lo tanto aumentar la eficiencia de acoplamiento. Un aumento de la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales en agentes, que de otro modo no sería posible.

Será evidente para los expertos en la materia que diversos reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como hetero-funcional (tales como los descritos en el catálogo de la Pierce Chemical Co., Rockford, IL), pueden emplearse como el grupo enlazador. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos carbohidrato oxidados. Hay numerosas referencias que describen dicha metodología, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.671.958, de Rodwell y col.

Donde un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la parte de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable usar un grupo enlazador que es escindible durante o tras la internalización en una célula. Se han descrito una serie de diferentes grupos enlazadores escindibles. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos enlazadores incluyen escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.489.710, de Spitzer), mediante irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.625.014, de Senter y col.), mediante hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizados (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.638.045, de Kohn y col.), mediante hidrólisis mediada por el complemento sérico (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.671.958, de Rodwell y col.), e hidrólisis catalizada por ácido (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.569.789, de Blattler y col.).

Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización, múltiples moléculas de un agente se acoplan a una molécula de anticuerpo. En otra realización, más de un tipo de agente puede acoplarse a un anticuerpo. Independientemente de la realización particular, los inmunoconjugados con más de un agente pueden prepararse de diversas maneras. Por ejemplo, más de un agente puede acoplarse directamente a una molécula de anticuerpo, o pueden usarse enlazadores que proporcionan múltiples sitios para la fijación.

### 30 Formulación y administración

Las composiciones de la invención (por ejemplo, los polipéptidos variantes de splicing de HRS, polinucleótidos, agentes de unión, anticuerpos, etc.) se formulan generalmente en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula, tejido o animal, ya sea en solitario, o en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. No hay virtualmente ningún límite a otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente a los efectos que se desea conseguir con una composición de HRS de la invención.

En las composiciones farmacéuticas de la invención, la formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocido por los expertos en la materia, como es el desarrollo de enfoques de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, intracraneal e intramuscular.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden administrarse mediante administración oral a un sujeto. Por lo tanto, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un transportador comestible asimilable, o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

En ciertas circunstancias será deseable administrar las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, o incluso intraperitoneal tal como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos CAS 5.543.158; patente de Estados Unidos CAS 5.641.515 y patente de Estados Unidos CAS 5.399.363 (cada una de las cuales se incorpora específicamente y en su totalidad al presente documento por referencia). Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y

5 polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de Estados Unidos No. 5.466.468, que se incorpora específicamente y en su totalidad al presente documento por referencia). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la  
10 acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de  
15 microorganismos se puede facilitar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido hacerse primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede ser empleado será conocido por los  
20 expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclinis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Edición, págs. 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para  
25 el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir esterilidad, pirogenicidad y los estándares generales de seguridad y pureza requeridos por la Oficina de la FDA de estándares biológicos.

30 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los diversos otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un  
35 polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones desveladas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la  
40 proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una  
45 cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "transportador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y  
50 retardantes de la absorción, tampones, soluciones transportadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que un medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas está contemplado. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

55 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano u otro mamífero. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien entendida en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; pueden  
60 prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección también. La preparación también se puede emulsionar.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante pulverizaciones intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración en aerosol. Los procedimientos para administrar genes, polinucleótidos y composiciones peptídicas directamente a los pulmones a través de aerosoles nasales se ha descrito por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.756.353 y patente de Estados Unidos No. 5.804.212 (cada una de las cuales se incorpora específicamente y en su totalidad al presente documento por referencia). Del mismo modo, la administración de fármacos usando resinas en micropartículas intranasales (Takenaga y col., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente de Estados Unidos No. 5.725.871, que se incorpora específicamente y en su totalidad al presente documento por referencia) también son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Del mismo modo, la administración de fármacos transmucosal en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.780.045 (que se incorpora específicamente y en su totalidad al presente documento por referencia).

En ciertas realizaciones, la administración puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y uso de dichos vehículos de administración se pueden llevar a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

#### 20 Kits de la presente divulgación

La divulgación, en otros aspectos, proporciona kits que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los polipéptidos variantes de splicing de HRS, polinucleótidos, anticuerpos, composiciones de los mismos, etc., tal como se describe en el presente documento. Los kits pueden incluir instrucciones por escrito sobre el uso de dichas composiciones (por ejemplo, para modular la señalización celular, la angiogénesis, el cáncer, las afecciones inflamatorias, etc.).

Los kits en el presente documento también pueden incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales u otros componentes adecuados o deseados para la indicación que está siendo tratada. Un agente terapéutico adicional puede estar contenido en un segundo recipiente, si se desea. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, aunque no se limitan a, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes angiogénicos, etc.

Los kits en la presente documento también pueden incluir una o más jeringas u otros componentes necesarios o deseados para facilitar un modo previsto de administración (por ejemplo, endoprótesis vasculares, depósitos implantables, etc.).

#### Procedimientos de uso

Las realizaciones de la presente invención también incluyen procedimientos de uso de las composiciones o "agentes" de HRS descritos en el presente documento para diagnóstico, descubrimiento de fármacos y/o con fines terapéuticos, tal como se definen en las reivindicaciones. El término "agentes" de HRS se refiere en general a los polinucleótidos de HRS, polipéptidos de HRS, agentes de unión, y otros compuestos descritos en el presente documento. Para fines de diagnóstico, los agentes de HRS pueden usarse de diversas maneras no limitativas, tales como para distinguir entre diferentes tipos de células o diferentes estados celulares, o para identificar sujetos que tienen una enfermedad o afección relevante. Para fines de descubrimiento de fármacos, los agentes de HRS pueden usarse para identificar uno o más "socios de unión" celular de un polipéptido de HRS, caracterizar una o más actividades "no canónicas" de un polipéptido de HRS, identificar agentes que agonizan o antagonizan selectiva o no selectivamente la interacción de un polipéptido de HRS con su socio o socios de unión, y/o identificar agentes que agonizan o antagonizan selectiva o no selectivamente una o más actividades "no canónicas" de un polipéptido de HRS. Para fines terapéuticos, los agentes o composiciones de HRS proporcionados en el presente documento pueden usarse para tratar diversas enfermedades o afecciones, detalladas a continuación.

#### *A. Diagnósticos*

Tal como se ha indicado anteriormente, los agentes de HRS descritos en el presente documento pueden usarse en ensayos de diagnóstico. Estas realizaciones divulgan la detección de la secuencia o secuencias de polinucleótido de HRS o secuencia o secuencias polipeptídicas correspondientes o partes de las mismas de uno o más variantes de splicing HRS identificadas recientemente, y/o una o más uniones de splicing de estas variantes de splicing. La secuencia o secuencias de polinucleótidos o polipeptídicas correspondiente de al menos una de las uniones de splicing es exclusiva para esa variante de splicing de HRS particular. La presencia o los niveles de una o más variantes de splicing de HRS recientemente identificadas, como se caracterizan normalmente mediante la secuencia de

polinucleótidos o polipeptídica correspondiente de sus uniones de splicing, se asocia o se correlaciona con uno o más tipos celulares o estados celulares. Por lo tanto, tal como se indicó anteriormente, la presencia o los niveles de una variante de splicing de HRS o su unión de splicing pueden usarse para distinguir entre diferentes tipos celulares o diferentes estados celulares. La presencia o niveles de variantes de splicing de HRS o de sus uniones de splicing  
5 pueden detectarse según técnicas de diagnóstico basadas en polinucleótidos y/o polipéptidos.

Ciertos de los procedimientos proporcionados en el presente documento se basan en la expresión diferencial de una variante de splicing de HRS para caracterizar la condición o estado de una célula, tejido, o sujeto, y para distinguirla de otra célula, tejido o sujeto. Los ejemplos no limitantes incluyen procedimientos para detectar la presencia o los  
10 niveles de una variante de splicing de HRS o su unión de splicing en una muestra biológica para distinguir entre células o tejidos de diferentes especies, células de diferentes tejidos u órganos, estados de desarrollo celulares tales como neonatal y adulto, estados de diferenciación celular, condiciones tales como fracciones intracelulares y extracelulares sanas, enfermas y tratadas, además de cultivos de células primarias y otros cultivos celulares, tales como cultivos de células inmortalizadas.

15 La expresión diferencial se refiere en general a una diferencia estadísticamente significativa en uno o más niveles de expresión génica de una secuencia de polinucleótido o polipeptídica de HRS en comparación con los niveles de expresión de la misma secuencia en un control apropiado. La diferencia estadísticamente significativa puede referirse a un aumento o una disminución de los niveles de expresión, según lo medido mediante los niveles de ARN, niveles  
20 de proteína, función de proteínas, o cualquier otra medida relevante de la expresión génica tales como los descritos en el presente documento.

Un resultado normalmente se denomina estadísticamente significativo si es poco probable que se haya producido por casualidad. El nivel de significación de un ensayo o resultado se refiere tradicionalmente a un concepto de ensayo de  
25 hipótesis estadístico frecuentista. En casos sencillos, la significación estadística puede definirse como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es verdadera (una decisión conocida como error de tipo I, o "determinación de falsos positivos"). Esta decisión se toma a menudo mediante el valor p: si el valor p es menor que el nivel de significación, entonces se rechaza la hipótesis nula. Cuanto menor sea el valor p, más significativo es el resultado. También pueden utilizarse factores de Bayes para determinar la significación estadística  
30 (véase, por ejemplo, Goodman S., Ann Intern Med 130:1005-13, 1999).

En casos más complicados, aunque importantes en la práctica, el nivel de significación de un ensayo o resultado puede reflejar un análisis en el que la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es realmente verdad no es mayor que la probabilidad establecida. Este tipo de análisis permite aquellas  
35 aplicaciones en las que la probabilidad de la decisión de rechazar puede ser mucho menor que el nivel de significación para algunos conjuntos de suposiciones abarcados dentro de la hipótesis nula.

En ciertas realizaciones ejemplares, la expresión diferencial estadísticamente significativa puede incluir situaciones en las que el nivel de expresión de una secuencia de HRS dada proporciona al menos aproximadamente 1.2X, 1.3X,  
40 1.4X, 1.5X, 1.6X, 1.7X, 1.8X, 1.9X, 2.0X, 2.2X, 2.4X, 2.6X, 2.8X, 3.0X, 4.0X, 5.0X, 6.0X, 7.0X, 8.0X, 9.0X, 10.0X, 15.0X, 20.0X, 50.0X, 100.0X, o mayor diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con un control apropiado, incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre medias (es decir, 1.24X, 1.25X, 2.1X, 2.5X, 60.0X, 75.0X, etc.). En ciertas realizaciones, la expresión diferencial estadísticamente significativa puede incluir situaciones en las que el nivel  
45 de expresión de una secuencia de HRS dada proporciona al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 por ciento (%) o mayor diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con un control apropiado, incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre medias.

50 Como un ejemplo adicional, la expresión diferencial también puede determinarse mediante la realización de ensayos Z, es decir, el cálculo de una puntuación Z absoluta, tal como se describe en el presente documento y conocidos en la técnica (véase el ejemplo 1). Los ensayos Z se usan normalmente para identificar diferencias significativas entre la media de una muestra y la media de una población. Por ejemplo, en comparación con una tabla normal estándar (por  
55 ejemplo, un tejido de control), en un intervalo de confianza del 95% (es decir, al nivel de significación del 5%), una puntuación Z con un valor absoluto mayor que 1,96 indica no aleatoriedad. Para un intervalo de confianza del 99%, si la Z absoluta es mayor que 2,58, significa que  $p < 0,01$ , y la diferencia es aún más significativa - la hipótesis nula se puede rechazar con mayor confianza. En estas y otras realizaciones relacionadas, una puntuación Z absoluta de 1,96, 2, 2,58, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, incluyendo todos los puntos decimales entre  
60 medias (por ejemplo, 10,1, 10,6, 11,2, etc.), puede proporcionar una fuerte medida de significación estadística. En ciertas realizaciones, una puntuación Z absoluta de más de 6 puede proporcionar significación estadística excepcionalmente alta.

Sustancial se refiere de manera similar en general a la falta de una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre la muestra biológica y el control de referencia. Ejemplos de niveles de expresión sustancialmente similares pueden incluir situaciones en las que el nivel de expresión de un SSCIGS dado proporciona menos de aproximadamente 0,05X, 0,1X, 0,2X, 0,3X, 0,4X, 0,5X, 0,6X, 0,7X, 0,8X, 0,9X, 1,0X., 1,1X, 1,2X, 1,3X, o 1,4X diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con una muestra de referencia, incluyendo todos los puntos decimales entre medias (es decir, 0,15X, 0,25X, 0,35X, etc.). En ciertas realizaciones, la expresión diferencial puede incluir situaciones en las que el nivel de expresión de una secuencia de HRS dada proporciona menos de aproximadamente 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 por ciento (%) diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con una muestra de referencia, incluyendo todos los puntos decimales entre medias.

Cuando se utiliza una micromatriz de Affymetrix para medir los niveles de expresión de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de HRS, la expresión diferencial también puede determinarse mediante el valor de expresión medio resumido por el software Affymetrix Microarray Suite 5 (Affymetrix, Santa Clara, CA), o cualquier otro software similar, normalmente con un valor medio de expresión a escala de 1000.

La divulgación incluye procedimientos de detección de la presencia o niveles de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de referencia de HRS o una parte de la misma para distinguir entre células, tejidos u otras muestras biológicas de un organismo o especie diferente, donde la presencia o los niveles de esa secuencia se asocian con un organismo o especie seleccionada. Ejemplos generales incluyen procedimientos para distinguir entre los seres humanos y cualquier combinación de bacterias, hongos, plantas y otros animales no humanos. Se incluyen dentro de los animales procedimientos para distinguir entre seres humanos y cualquier combinación de vertebrados e invertebrados, incluyendo vertebrados tales como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos no humanos, e invertebrados tales como insectos, moluscos, crustáceos y corales. Se incluyen dentro de los mamíferos no humanos procedimientos para distinguir entre seres humanos y cualquier combinación de los mamíferos no humanos de la orden Afrosoricida, Macroscelidea, Tubulidentata, Hyracoidea, Proboscidea, Sirenia, Cingulata, Pilosa, Scandentia, Dermoptera, Primates, Rodentia, Lagomorpha, Erinaceomorpha, Soricomorpha, Chiroptera, Pholidota, Cetacea, Carnivora, Perissodactyla, o Artiodactyla. Se incluyen dentro del orden de los primates monos, simios, gorilas y chimpancés, entre otros conocidos en la técnica. Por consiguiente, la presencia o niveles de una secuencia o variante de polinucleótidos o polipeptídica de referencia de HRS, tal como se describe en el presente documento, puede usarse para identificar el origen de una muestra biológica dada, tal como una célula, tejido u órgano, distinguiendo entre cualquier combinación de estos organismos, o distinguiendo entre seres humanos y uno cualquiera o más de estos organismos, tales como un panel de organismos. En ciertas realizaciones, la fuente de una muestra biológica dada también se puede determinar mediante la comparación de la presencia o los niveles de una secuencia de HRS o una parte de la misma con un valor predeterminado.

La divulgación incluye procedimientos de detección de la presencia o niveles de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de referencia de HRS o una parte de la misma para distinguir entre células, tejidos u otras muestras biológicas que se originan de diferentes tejidos u órganos. Los ejemplos no limitantes incluyen procedimientos para distinguir entre una célula u otra muestra biológica que se origina a partir de cualquier combinación de piel (por ejemplo, dermis, epidermis, capa subcutánea), folículos pilosos, sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, nervios periféricos), sistema auditivo u órganos del equilibrio (por ejemplo, oído interno, oído medio, oído externo), sistema respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones), tejidos gastroesofágicos, el sistema gastrointestinal (por ejemplo, boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto), sistema vascular (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos y arterias), hígado, vesícula biliar, sistema linfático/inmunitario (por ejemplo, ganglios linfáticos, folículos linfoides, bazo, timo, médula ósea), sistema uro-genital (por ejemplo, riñones, uréter, vejiga, uretra, cuello uterino, trompas de Falopio, ovarios, útero, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos), sistema musculoesquelético (por ejemplo, músculos esqueléticos, músculos lisos, hueso, cartílago, tendones, ligamentos), tejido adiposo, glándulas mamarias y el sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas, glándulas suprarrenales). Por lo tanto, basándose en la asociación de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de HRS tal como se describe en el presente documento, estos procedimientos pueden usarse para identificar o caracterizar el tejido u órgano del que se deriva una célula u otra muestra biológica.

Las realizaciones de la presente divulgación incluyen procedimientos de detección de la presencia o niveles de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de referencia de HRS o una parte de la misma para distinguir entre o caracterizar el estado de desarrollo o diferenciación de la célula. También se divulgan procedimientos para diferenciar entre células germinales, células madre y células somáticas. Los ejemplos de estados de desarrollo incluyen neonatal y adulto. Los ejemplos de estados de diferenciación celular incluyen todas las etapas discretas e identificables entre una célula totipotente, una célula pluripotente, una célula madre progenitora multipotente y una célula madura, completamente diferenciada.

Una célula totipotente de la divulgación tiene potencial total, normalmente surge durante la reproducción sexual y asexual, e incluye y las esporas y cigotos, aunque en algunos casos las células pueden desdiferenciarse y recuperar totipotencia. Una célula pluripotente incluye una célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales, incluido el endodermo (revestimiento del estómago interior, el tracto gastrointestinal, los pulmones), el mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) y el ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las células progenitoras multipotentes normalmente son capaces de diferenciarse en un número limitado de tipos de tejidos. Los ejemplos de células multipotentes incluyen, aunque sin limitación, células madre hematopoyéticas (células madre adultas) de la médula ósea que dan lugar a células del sistema inmunitario tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, células madre mesenquimáticas (células madre adultas) de la médula ósea que dan lugar a las células del estroma, células adiposas, y diversos tipos de células óseas, células madre epiteliales (células progenitoras) que dan lugar a los diversos tipos de células de la piel, y células satélite musculares (células progenitoras) que contribuyen a tejido muscular diferenciado. Por consiguiente, la presencia o niveles de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de HRS particular (por ejemplo, unión de splicing de una variante de splicing de HRS), pueden usarse para distinguir entre o caracterizar los estados de diferenciación celular mencionados anteriormente, en comparación con un control o un nivel predeterminado.

Se divulgan procedimientos de detección de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótidos o polipeptídica de referencia de HRS para caracterizar o diagnosticar el estado de una célula, tejido, órgano o sujeto, en la que ese estado puede caracterizarse como sano, enfermo, en riesgo de estar enfermo, o tratado. Para dichos fines de diagnóstico, el término "diagnóstico" o "diagnosticado" incluye identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica, caracterizar el riesgo de desarrollar dicha afección, y/o medir el cambio (o la ausencia de cambio) de una afección patológica en respuesta a la terapia. Los procedimientos de diagnóstico pueden diferir en su sensibilidad y especificidad. En ciertas realizaciones, la "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico se refiere al porcentaje de células, tejidos o sujetos enfermos que dan positivo (porcentaje de "auténticos positivos"). Las células, tejidos o sujetos enfermos no detectados por el ensayo denominan normalmente "falsos negativos". Las células, tejidos o sujetos que no están enfermos y que dan negativo en el ensayo pueden denominarse "auténticos negativos". En ciertas realizaciones, la "especificidad" de un ensayo de diagnóstico puede definirse como uno (1) menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de esas muestras o sujetos sin la enfermedad y que dan positivo. Aunque un procedimiento de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, basta con que el procedimiento proporcione una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

En ciertos casos, la presencia o el riesgo de desarrollar una afección patológica se pueden diagnosticar mediante la comparación de la presencia o niveles de una o más secuencias de polinucleótidos o polipeptídicas de referencia de HRS seleccionadas o partes de las mismas que se correlacionan con la afección, ya sea mediante niveles aumentados o disminuidos, en comparación con un control adecuado. Un "control adecuado" o "control apropiado" incluye un valor, nivel, rasgo, característica o propiedad determinado en una célula u otra muestra biológica de un tejido u organismo, por ejemplo, un control o células, tejido u organismo normal, que exhibe, por ejemplo, rasgos normales, tales como la ausencia de la afección. En ciertas realizaciones, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica o propiedad predefinida. Otros controles adecuados serán evidentes para los expertos en la materia. Ejemplos de enfermedades y afecciones se describen en otra parte en el presente documento.

La divulgación incluye técnicas de detección basadas en ácidos nucleicos o polinucleótidos de HRS, que ofrecen ciertas ventajas debido a la sensibilidad de la detección. Por lo tanto, ciertas realizaciones se refieren al uso o la detección de polinucleótidos de HRS como parte de un procedimiento o ensayo de diagnóstico. La presencia y/o niveles de polinucleótidos de HRS pueden medirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo los ensayos de hibridación, tales como Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o cualitativa (PCR), PCR con transcriptasa inversa cuantitativa o cualitativa (RT-PCR), micromatriz, blots de punto o de ranura, o hibridación *in situ* tal como hibridación fluorescente *in situ* (FISH), entre otros. Algunos de estos procedimientos se describen en mayor detalle a continuación.

Polinucleótidos de HRS tales como ADN y ARN pueden recogerse y/o generarse a partir de sangre, fluidos biológicos, tejidos, órganos, líneas celulares u otra muestra relevante usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las que se describe en Kingston. (2002 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (véase, *por ejemplo*, tal como se describe por Nelson y col. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 11890-11895, 2002) y en cualquier otro lugar.

Bibliotecas complementarias de ADN (cADN) pueden generarse usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritos en Ausubel y col. (2001 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Sambrook y col. (1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis y col. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY) y en cualquier otro lugar.

Ciertas realizaciones pueden emplear procedimientos de hibridación para detectar secuencias de polinucleótidos de HRS. Los procedimientos para llevar a cabo ensayos de hibridación de polinucleótidos han sido bien desarrollados en la técnica. Los procedimientos y condiciones de ensayo de hibridación variarán dependiendo de la aplicación y se seleccionan según los procedimientos de unión generales conocidos, incluyendo los mencionados en: Maniatis y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger y Kimmel Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young y Davism, P.N.A.S, 80: 1194 (1983). Procedimientos y aparatos para llevar a cabo reacciones de hibridación repetidas y controladas se han descrito en las patentes de Estados Unidos No. 5.871.928, 5.874.219, 6.045.996 y 6.386.749, 6.391.623, cada una de las cuales se incorpora al presente documento por referencia.

Ciertas realizaciones pueden emplear procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar secuencias de polinucleótidos de HRS. El término "amplificación" o "amplificación de ácidos nucleicos" se refiere a la producción de múltiples copias de un ácido nucleico diana que contiene al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana específica prevista. Las copias múltiples pueden denominarse amplicones o productos de amplificación. En ciertas realizaciones, la diana amplificada contiene menos que la secuencia génica diana completa (intrones y exones) o una secuencia génica diana expresada (transcrito sometido a splicing de los exones y secuencias flanqueantes no traducidas). Por ejemplo, los amplicones específicos pueden producirse mediante amplificando una parte del polinucleótido diana usando cebadores de amplificación que hibridan con, y inician la polimerización desde, las posiciones internas del polinucleótido diana. Preferentemente, la parte amplificada contiene una secuencia diana detectable que se puede detectar usando cualquiera de diversos procedimientos bien conocidos.

"Amplificación selectiva" o "amplificación específica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana según la presente invención donde la amplificación detectable de la secuencia diana se limita sustancialmente a la amplificación de la secuencia diana aportada por una muestra de ácido nucleico de interés que está siendo ensayada y no es aportada por la secuencia de ácido nucleico diana aportada por alguna otra fuente de muestra, por ejemplo, la contaminación presente en los reactivos usados durante las reacciones de amplificación o en el entorno en el que se llevan a cabo las reacciones de amplificación.

Por "condiciones de amplificación" se entiende condiciones que permiten la amplificación de ácido nucleico según la presente invención. Las condiciones de amplificación pueden, en algunas realizaciones, ser menos astringentes que las "condiciones de hibridación astringentes" tal como se describen en el presente documento. Los oligonucleótidos usados en las reacciones de amplificación de la presente divulgación hibridan con sus dianas previstas en condiciones de amplificación, pero pueden o no hibridar en condiciones de hibridación astringentes. Por otro lado, las sondas de detección de la presente invención normalmente hibridan en condiciones de hibridación astringentes. Las condiciones aceptables para llevar a cabo amplificaciones de ácidos nucleicos según la presente divulgación pueden ser valoradas fácilmente por algún experto en la materia dependiendo del procedimiento particular de amplificación empleado.

Muchos procedimientos bien conocidos de amplificación de ácidos nucleicos requieren termociclado para desnaturalizar como alternativa ácidos nucleicos bicatenarios e hibridar cebadores; sin embargo, otros procedimientos bien conocidos de amplificación de ácidos nucleicos son isotérmicos. La reacción en cadena de la polimerasa (patentes de Estados Unidos No. 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188), comúnmente conocida como PCR, usa múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de pares de cebadores a las cadenas opuestas, y extensión del cebador para aumentar exponencialmente el número de copias de la secuencia diana. En una variación denominada RT-PCR, se utiliza transcriptasa inversa (RT) para fabricar un ADN complementario (cADN) a partir de mRNA, y el cADN se amplifica por PCR para producir múltiples copias de ADN.

Tal como se indicó anteriormente, el término "PCR" se refiere a múltiples ciclos de amplificación que amplifican selectivamente una especie de ácido nucleico diana. Se incluyen PCR cuantitativa (qPCR), PCR en tiempo real), PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa de transcripción inversa (qRT-PCR) se describe bien en la técnica. El término "pPCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, y el término "qRT-PCR" se refiere a la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa cuantitativa. qPCR y qRT-PCR pueden usarse para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de cADN diana. Se permite tanto la detección y cuantificación de una secuencia específica en una reserva de cADN, tal como un gen o transcrito de HRS seleccionado.

La expresión "PCR en tiempo real" puede usar colorante de unión a ADN que se une a todo el ADN bicatenario (ds) en la PCR, haciendo que el colorante emita fluorescencia. Un aumento del producto de ADN durante la PCR, por tanto, causa un aumento en la intensidad de fluorescencia y se mide en cada ciclo, permitiendo de este modo que las concentraciones de ADN sean cuantificadas. Sin embargo, colorantes de dsADN tales como SYBR Green se unirán a todos los productos de PCR de dsADN. La fluorescencia se detecta y se mide en el termociclador de PCR en tiempo real, y su aumento geométrico correspondiente al aumento exponencial del producto se usa para determinar el ciclo

umbral ("Ct") en cada reacción.

La expresión "puntuación de Ct" se refiere al número de ciclo umbral, que es el ciclo en el que la amplificación por PCR ha superado un nivel umbral. Si hay una mayor cantidad de mARN para un gen particular en una muestra, ésta cruzará el umbral antes que un gen poco expresado, ya que hay más de ARN de partida que amplificar. Por lo tanto, una baja puntuación de Ct indica la expresión génica alta en una muestra y una puntuación de Ct alta es indicativa de expresión génica baja.

Ciertas realizaciones pueden emplear la reacción en cadena de la ligasa (Weiss, R. 1991, Science 254: 1292), comúnmente denominada LCR, que usa dos conjuntos de oligonucleótidos de ADN complementarios que hibridan con las regiones adyacentes del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de ADN están enlazados covalentemente por una ADN ligasa en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y ligamiento para producir un producto de oligonucleótido ligado bicatenario detectable.

En ciertas realizaciones, otras técnicas pueden utilizarse para evaluar las transcripciones de ARN de los transcritos a partir de una biblioteca de cADN en particular, incluyendo el análisis de micromatrices (Han, M., y col., Nat Biotechnol, 19: 631-635, 2001; Bao, P., y col., Anal Chem, 74: 1792-1797, 2002; Schena y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-19, 1996; y Heller y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-55, 1997) y SAGE (análisis en serie de la expresión génica). Como MPSS, SAGE es digital y puede generar un gran número de secuencias distintivas. (véase por ejemplo, Velculescu, V. E., y col., Trends Genet, 16: 423-425., 2000; Tuteja R. y Tuteja N. Bioessays. 2004 Ago; 26(8):916-22), aunque las técnicas como el MPSS ofrecen órdenes de magnitud inferiores a las mencionadas.

En ciertas realizaciones, el término "micromatriz" incluye una "micromatriz de ácido nucleico" que tiene una pluralidad de ácidos nucleicos unidos al sustrato, siendo la hibridación con cada uno de la pluralidad de ácidos nucleicos unidos detectable por separado. El sustrato puede ser sólido o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido. Las micromatrices de ácidos nucleicos incluyen todos los dispositivos llamados así en Schena (ed.), DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Oxford University Press (1999); Nature Genet. 21(1) (supl.): 1-60 (1999); Schena (ed.), Microarray Biochip: Tools and Technology, Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000). Las micromatrices de ácidos nucleicos pueden incluir una pluralidad de ácidos nucleicos unidos a sustrato en la que la pluralidad de ácidos nucleicos se dispone sobre una pluralidad de perlas, en lugar de sobre un sustrato plano unitario, tal como se describe, por ejemplo, en Brenner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1665-1670 (2000). Ejemplos de micromatrices de ácido nucleico pueden encontrarse en las patentes de Estados Unidos No. 6.391.623, 6.383.754, 6.383.749, 6.380.377, 6.379.897, 6.376.191, 6.372.431, 6.351.712 6.344.316, 6.316.193, 6.312.906, 6.309.828, 6.309.824, 6.306.643, 6.300.063, 6.287.850, 6.284.497, 6.284.465, 6.280.954, 6.262.216, 6.251.601, 6.245.518, 6.263.287, 6.251.601, 6.238.866, 6.228.575, 6.214.587, 6.203.989, 6.171.797, 6.103.474, 6.083.726, 6.054.274, 6.040.138, 6.083.726, 6.004.755, 6.001.309, 5.958.342, 5.952.180, 5.936.731, 5.843.655, 5.814.454, 5.837.196, 5.436.327, 5.412.087, y 5.405.783, las divulgaciones de las cuales se incorporan por referencia.

Los ejemplos adicionales incluyen matrices de ácido nucleico que están disponibles en el mercado de Affymetrix (Santa Clara, Calif.) con el nombre comercial GeneChip™. Procedimientos ejemplares adicionales de fabricación y uso de matrices se proporcionan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos No. 7.028.629; 7.011.949; 7.011.945; 6.936.419; 6.927.032; 6.924.103; 6.921.642; y 6.818.394.

La presente divulgación en relación con las matrices y micromatrices también contempla muchos usos para polímeros fijados a sustratos sólidos. Estos usos incluyen monitorización y perfilado de la expresión génica, selección de bibliotecas, genotipado y diagnóstico. Procedimientos de monitorización y perfilado la expresión génica y procedimientos útiles para la monitorización y el perfilado de la expresión génica y se muestran en las patentes de Estados Unidos No. 5.800.992, 6.013.449, 6.020.135, 6.033.860, 6.040.138, 6.177.248 y 6.309.822. El genotipado y los usos del mismo se muestran en el documento U.S. No. de serie 10/442.021, 10/013.598 (solicitud de Estados Unidos No. 2003/0036069), y patentes de Estados Unidos No. 5.925.525, 6.268.141, 5.856.092, 6.267.152, 6.300.063, 6.525.185, 6.632.611, 5.858.659, 6.284.460, 6.361.947, 6.368.799, 6.673.579 y 6.333.179. Otros procedimientos de amplificación, etiquetado y análisis de ácidos nucleicos que pueden usarse en combinación con los procedimientos descritos en el presente documento están incorporados en las patentes de Estados Unidos No. 5.871.928, 5.902.723, 6.045.996, 5.541.061 y 6.197.506.

Como será evidente para los expertos en la materia, ciertas realizaciones pueden emplear oligonucleótidos, tales como cebadores o sondas, para la amplificación o detección, tal como se describe en el presente documento. Si bien el diseño y la secuencia de los oligonucleótidos depende de su función, tal como se describe en el presente documento, varias variables se suelen tener en cuenta. Entre las más relevantes están: longitud, temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), especificidad, complementariedad con otros oligonucleótidos en el sistema, contenido de G/C, tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G), y la secuencia del extremo 3'.

Ciertas realizaciones, por lo tanto, incluyen procedimientos para detectar un polinucleótido de HRS diana en una muestra, normalmente donde el polinucleótido comprende la secuencia de un polinucleótido de HRS de referencia descrito en el presente documento, que comprende a) hibridar la muestra con una sonda que comprende una secuencia complementaria al polinucleótido diana en la muestra, y la sonda que hibrida específicamente con dicho polinucleótido diana, en condiciones en las que se forma un complejo de hibridación entre dicha sonda y dicho polinucleótido diana o fragmentos del mismo y b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo de hibridación, y opcionalmente, si está presente, la cantidad del mismo. También se incluyen procedimientos para detectar un polinucleótido de HRS diana en una muestra, comprendiendo el polinucleótido la secuencia de un polinucleótido de HRS de referencia, tal como se describe en el presente documento, que comprende a) amplificar el polinucleótido diana o fragmento del mismo y b) detectar la presencia o ausencia de dicho polinucleótido diana o fragmento del mismo amplificado y, opcionalmente, si está presente, la cantidad del mismo.

Las realizaciones de la presente divulgación incluyen diversas técnicas de detección basadas en polipéptido de HRS, incluyendo técnicas de detección basadas en anticuerpos. En estas realizaciones está incluido el uso de polipéptidos de HRS para generar anticuerpos u otros elementos de unión, que pueden usarse entonces en procedimientos y composiciones de diagnóstico para detectar o cuantificar polipéptidos de HRS seleccionados en una célula u otra muestra biológica, normalmente de un sujeto.

Ciertas realizaciones pueden emplear metodologías estándar tales como Western blot e inmunoprecipitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), citometría de flujo, y ensayos de inmunofluorescencia (IFA). Estos procedimientos bien conocidos utilizan normalmente uno o más anticuerpos monoclonales o policlonales tal como se describe en el presente documento que se unen específicamente a un polipéptido de HRS seleccionado de la invención, o una región única de ese polipéptido de HRS, y generalmente no se unen de manera significativa a otros polipéptidos de HRS, tales como un polipéptido de HRS de longitud completa. En ciertas realizaciones, la región única del polipéptido de HRS puede estar codificada por una unión de splicing única o una estructura tridimensional particular de una variante de splicing alternativa recién identificada.

Ciertas realizaciones pueden emplear "matrices", tales como "micromatrices". En ciertas realizaciones, una "micromatriz" también puede referirse a una "micromatriz peptídica" o "micromatriz de proteínas" que tiene una colección o una pluralidad de polipéptidos unidos a un sustrato, siendo la unión de cada uno de la pluralidad de polipéptidos unidos detectable por separado. Como alternativa, la micromatriz peptídica puede tener una pluralidad de elementos de unión, incluyendo, aunque sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, elementos de unión de presentación de fagos, elementos de unión de 2 híbridos de levadura, y aptámeros, que pueden detectar específicamente la unión de los polipéptidos de HRS descritos en el presente documento. La matriz puede estar basada en la detección de autoanticuerpos de estos polipéptidos de HRS, tal como se describe, por ejemplo, en Robinson y col., Nature Medicine 8(3):295-301 (2002). Pueden encontrarse ejemplos de matrices peptídicas en los documentos WO 02/31463, WO 02/25288, WO 01/94946, WO 01/88162, WO 01/68671, WO 01/57259, WO 00/61806, WO 00/54046, WO 00/47774, WO 99/40434, WO 99/39210 y WO 97/42507 y las patentes de Estados Unidos No. 6.268.210, 5.766.960 y 5.143.854, cada una de las cuales se incorpora por referencia.

Ciertas realizaciones pueden emplear MS u otros procedimientos basados en el peso molecular para la detección de diagnóstico de secuencias de polipéptidos de HRS. La espectrometría de masas (MS) generalmente se refiere a una técnica analítica para determinar la composición elemental de una muestra o molécula. La MS también puede usarse para determinar las estructuras químicas de moléculas, tales como péptidos y otros compuestos químicos.

En general, el principio de MS consiste en ionizar compuestos químicos para generar moléculas o fragmentos de moléculas cargados, y a continuación medir sus relaciones de masa respecto a carga. En un procedimiento de MS ilustrativo: una muestra se carga en el instrumento de MS, y se somete a vaporización, los componentes de la muestra se ionizan mediante uno de diversos procedimientos (por ejemplo, mediante el impacto con un haz de electrones), lo que da como resultado la formación de partículas con carga positiva, los iones positivos son entonces acelerados por un campo magnético, se realizan los cálculos en la relación de masa respecto a carga ( $m/z$ ) de las partículas basándose en los detalles del movimiento de los iones a medida que transitan a través de campos electromagnéticos y, la detección de los iones, que en la etapa anterior fueron ordenados según la  $m/z$ .

Un instrumento de MS ilustrativo tiene tres módulos: una fuente de iones, que convierte las moléculas de muestra en fase gaseosa en iones (o, en el caso de ionización por electropulverización, mueve los iones que existen en solución a la fase gaseosa); un analizador de masas, que ordena los iones por sus masas mediante la aplicación de campos electromagnéticos; y un detector, que mide el valor de una cantidad indicadora y, de este modo, proporciona datos para el cálculo de las abundancias de cada ion presente.

La técnica de MS tiene usos tanto cualitativos como cuantitativos, incluyendo la identificación de compuestos desconocidos, la determinación de la composición isotópica de elementos en una molécula, y la determinación de la

estructura de un compuesto observando su fragmentación. Otros usos incluyen la cuantificación de la cantidad de un compuesto en una muestra o el estudio de los fundamentos de la química de iones en fase gaseosa (la química de iones y neutros en un vacío). Por consiguiente, las técnicas de MS pueden usarse según cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento para medir la presencia o los niveles de un polipéptido de HRS en una muestra biológica, y para comparar dichos niveles con una muestra de control o un valor predeterminado.

#### B. Descubrimiento de compuestos y agentes terapéuticos

Ciertas realizaciones se refieren al uso de secuencias de referencia de polipéptidos de HRS o polinucleótidos de HRS en el descubrimiento de fármacos, normalmente para identificar agentes que modulan una o más de las actividades no canónicas de la HRS de referencia. Por ejemplo, ciertas realizaciones incluyen procedimientos de identificación de uno o más "socios de unión" de un polipéptido de HRS de referencia, o un polipéptido que comprende una secuencia de referencia de HRS tal como una proteína celular u otra molécula huésped que se asocia con el polipéptido de HRS y participa en su actividad o actividades no canónicas. También se incluyen procedimientos de identificación de un compuesto (por ejemplo, polipéptido) u otro agente que agoniza o antagoniza la actividad no canónica de un polipéptido de referencia de HRS o variante activa del mismo, tal como mediante la interacción con el polipéptido de HRS y/o uno o más de sus socios de unión celular.

Ciertas realizaciones, por lo tanto, incluyen procedimientos de identificación de un socio de unión de un polipéptido de referencia de HRS, que comprenden a) combinar el polipéptido de HRS con una muestra biológica en condiciones adecuadas; y b) detectar la unión específica del polipéptido de HRS a un socio de unión, identificando de este modo un socio de unión que se une específicamente al polipéptido de HRS de referencia. También se incluyen procedimientos de cribado de un compuesto que se une específicamente a un polipéptido de referencia de HRS o un socio de unión del polipéptido de HRS, que comprenden a) combinar el polipéptido o el socio de unión con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas, y b) detectar la unión del polipéptido o el socio de unión al compuesto de ensayo, identificando de este modo un compuesto que se une específicamente al polipéptido o su socio de unión. En ciertas realizaciones, el compuesto es un polipéptido o péptido. En ciertas realizaciones, el compuesto es una molécula pequeña u otro compuesto químico (por ejemplo, no biológico). En ciertas realizaciones, el compuesto es un peptidomimético.

Cualquier procedimiento adecuado para detectar interacciones proteína-proteína puede emplearse para la identificación de proteínas celulares que interactúan con un polipéptido de referencia de HRS, interactúan con uno o más de sus socios de unión celular, o ambos. Los ejemplos de los procedimientos tradicionales que pueden emplearse incluyen co-inmunoprecipitación, reticulación, y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas de lisados celulares o proteínas obtenidas de lisados celulares, principalmente para identificar proteínas en el lisado que interactúan con el polipéptido de HRS.

En estas y realizaciones relacionadas, al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína que interactúa con un polipéptido de HRS o su socio de unión puede determinarse usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia, tales como a través de la técnica de degradación de Edman. Véase, *por ejemplo*, Creighton Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y., págs. 34-49, 1983. La secuencia de aminoácidos obtenida puede usarse como una guía para la generación de mezclas de oligonucleótidos que pueden usarse para la detección de secuencias de genes que codifican dichas proteínas. El cribado puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación o de PCR convencionales, tal como se describen en el presente documento y se conocen en la técnica. Las técnicas para la generación de mezclas de oligonucleótidos y el cribado son bien conocidas. Véase, *por ejemplo*, Ausubel y col. Current Protocols in Molecular Biology Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; y Innis y col., eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, Inc., Nueva York, 1990.

Adicionalmente, pueden emplearse procedimientos en la identificación simultánea de genes que codifican el socio de unión o otro polipéptido. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, sondear bibliotecas de expresión, de una manera similar a la técnica bien conocida de sondeo con anticuerpos de bibliotecas lambda-gt11, usando proteína HRS etiquetada, u otro polipéptido, péptido o proteína de fusión, por ejemplo, un polipéptido variante de HRS o dominio de HRS fusionado a un marcador (por ejemplo, una enzima, flúor, proteína luminiscente o colorante) o un dominio Ig-Fc.

Un procedimiento que detecta interacciones de proteínas *in vivo* es el sistema de dos híbridos. Un ejemplo de este sistema se ha descrito (Chien y col., PNAS USA 88:9578-9582, 1991) y está disponible en el mercado de Clontech (Palo Alto, Calif.). En ciertos casos, puede usarse el sistema de dos híbridos u metodología para cribar bibliotecas de dominio de activación para proteínas que interactúan con el producto génico "cebo". A modo de ejemplo, y no a modo de limitación, un polipéptido o variante de referencia de HRS puede utilizarse como el producto génico "cebo". Un socio de unión de HRS también puede usarse como un producto génico "cebo". Secuencias genómicas totales o de cADN se fusionan al ADN que codifica un dominio de activación. Esta biblioteca y un plásmido que codifica un híbrido de un

producto génico de HRS cebo fusionado con el dominio de unión a ADN se co-transformaron en una cepa reportera de levadura, y los transformantes resultantes se seleccionan para los que expresan el gen reportero.

También se incluyen los sistemas de tres híbridos, que permiten la detección de interacciones ARN-proteína en levadura. Véase, por ejemplo, Hook y col., RNA. 11:227-233, 2005. Por consiguiente, estos y otros procedimientos pueden usarse para identificar un socio de unión celular de un polipéptido de HRS. Estos y otros procedimientos también pueden usarse para identificar otros compuestos tales como agentes de unión o ácidos nucleicos que interactúan con el polipéptido de HRS, su socio de unión celular, o ambos.

10 Tal como se ha indicado anteriormente, una vez aislados, los socios de unión pueden identificarse y pueden, a su vez, usarse junto con técnicas estándar para identificar proteínas u otros compuestos con los que interactúa. Ciertas realizaciones se refieren, de este modo, a procedimientos de cribado para un compuesto que se une específicamente al socio de unión de un polipéptido de referencia de HRS, que comprende a) combinar el socio de unión con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas, y b) detectar la unión del socio de unión al compuesto de ensayo, identificando de este modo un compuesto que se une específicamente al socio de unión. En ciertas realizaciones, el compuesto de ensayo es un polipéptido. En ciertas realizaciones, el compuesto de ensayo es un compuesto químico, tal como un compuesto de molécula pequeña o peptidomimético.

Ciertas realizaciones divulgan procedimientos de cribado para un compuesto que modula la actividad de un polipéptido de referencia de HRS, que comprende a) combinar el polipéptido con al menos un compuesto de ensayo en condiciones permisivas para la actividad del polipéptido, b) valorar la actividad del polipéptido en presencia del compuesto de ensayo, y c) comparar la actividad del polipéptido en presencia del compuesto de ensayo con la actividad del polipéptido en ausencia del compuesto de ensayo, donde un cambio en la actividad del polipéptido en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad del polipéptido.

25 Ciertas realizaciones divulgan procedimientos de cribado para un compuesto que modula la actividad de un socio de unión de un polipéptido de referencia de HRS, que comprende a) combinar el polipéptido con al menos un compuesto de ensayo en condiciones permisivas para la actividad del socio de unión, b) valorar la actividad del socio de unión en presencia del compuesto de ensayo, y c) comparar la actividad del socio de unión en presencia del compuesto de ensayo con la actividad del socio de unión en ausencia del compuesto de ensayo, donde un cambio en la actividad del socio de unión en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad del socio de unión. Normalmente, estas y realizaciones relacionadas incluyen la valoración de una actividad no canónica seleccionada que está asociada con el polipéptido de HRS o su socio de unión. Se divulgan condiciones *in vitro* e *in vivo*, tales como condiciones de cultivo celular.

35 Ciertas realizaciones divulgan procedimientos de cribado de un compuesto para la eficacia como un agonista total o parcial de un polipéptido de referencia de HRS o un fragmento activo o variante del mismo, que comprende a) exponer una muestra que comprende el polipéptido a un compuesto, y b) detectar actividad agonista en la muestra, normalmente mediante la medición de un aumento en la actividad no canónica del polipéptido de HRS. Ciertos procedimientos incluyen a) exponer una muestra que comprende un socio de unión del polipéptido de HRS a un compuesto, y b) detectar actividad agonista en la muestra, normalmente mediante la medición de un aumento en la actividad no canónica seleccionada del polipéptido de HRS. Ciertas realizaciones incluyen composiciones que comprenden un compuesto antagonista identificado mediante el procedimiento y un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 También se divulgan procedimientos de cribado de un compuesto para la eficacia como un antagonista total o parcial de un polipéptido de referencia de HRS, que comprende a) exponer una muestra que comprende el polipéptido a un compuesto, y b) detectar actividad antagonista en la muestra, normalmente mediante la medición de una disminución en la actividad no canónica del polipéptido de HRS. Ciertos procedimientos incluyen a) exponer una muestra que comprende un socio de unión del polipéptido de HRS a un compuesto, y b) detectar actividad antagonista en la muestra, normalmente mediante la medición de una disminución en la actividad no canónica seleccionada del polipéptido de HRS. Ciertas realizaciones incluyen composiciones que comprenden un compuesto antagonista identificado mediante el procedimiento y un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 La divulgación comprende sistemas *in vitro* para identificar compuestos capaces de interactuar con o modular una secuencia de referencia de HRS o su socio de unión. Algunos de los compuestos identificados por dichos sistemas pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de la actividad de la ruta, y en la elaboración de componentes de la misma ruta. También pueden usarse en cribados para identificar compuestos que alteran las interacciones entre los componentes de la ruta; o pueden alterar dichas interacciones directamente. Un enfoque ejemplar implica la preparación de una mezcla de reacción del polipéptido de HRS y un compuesto de ensayo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos interactúen y se unan, formando de este modo un complejo que puede retirarse de y/o detectarse en la mezcla de reacción

Pueden llevarse a cabo ensayos de cribado *in vitro* de diversas maneras. Por ejemplo, un polipéptido de HRS, un socio de unión celular, o un compuesto o compuestos de ensayo pueden anclarse sobre una fase sólida. En estas y realizaciones relacionadas, los complejos resultantes pueden ser capturados y detectados en la fase sólida al final de la reacción. En un ejemplo de dicho procedimiento, el polipéptido de HRS y/o su socio de unión se anclan sobre una superficie sólida, y el compuesto o compuestos de ensayo, que no están anclados, pueden etiquetarse, ya sea directa o indirectamente, de modo que su captura por el componente en la superficie sólida puede ser detectada. En otros ejemplos, el compuesto o compuestos de ensayo están anclados a la superficie sólida, y el polipéptido de HRS y/o su socio de unión, que no están anclados, están etiquetados o son detectables de alguna manera. En ciertas realizaciones, pueden usarse convenientemente placas de microtitulación como la fase sólida. El componente anclado (o compuesto de ensayo) puede inmovilizarse mediante fijaciones no covalentes o covalentes. La fijación no covalente puede llevarse a cabo simplemente revistiendo la superficie sólida con una solución de la proteína y secando. Como alternativa, un anticuerpo inmovilizado, preferentemente un anticuerpo monoclonal, específico para la proteína a inmovilizar puede usarse para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse por adelantado y almacenarse.

Para llevar a cabo un ensayo ejemplar, el componente no inmovilizado se añade normalmente a la superficie revestida que contiene el componente anclado. Después de que la reacción se completa, los componentes sin reaccionar se retiran (por ejemplo, por lavado) en condiciones tales que cualesquiera complejos específicos formados permanecerán inmovilizados sobre la superficie sólida. La detección de los complejos anclados en la superficie sólida se puede conseguir de varias maneras. Por ejemplo, cuando el componente previamente no inmovilizado está pre-etiquetado, la detección de la etiqueta inmovilizada sobre la superficie indica que se formaron complejos. Cuando el componente previamente no inmovilizado no está pre-etiquetado, puede usarse una etiqueta indirecta para detectar los complejos anclados sobre la superficie; por ejemplo, usando un anticuerpo etiquetado específico para el componente previamente no inmovilizado (el anticuerpo, a su vez, puede estar etiquetado directamente o etiquetado indirectamente con un anticuerpo anti-Ig etiquetado).

Como alternativa, la presencia o ausencia de unión de un compuesto de ensayo puede determinarse, por ejemplo, usando resonancia del plasmón superficial (SPR) y el cambio en el ángulo de resonancia como un índice, donde un polipéptido de HRS o un socio de unión celular se inmoviliza sobre la superficie de un chip sensor disponible en el mercado (por ejemplo, fabricado por Biacore™) según un procedimiento convencional, el compuesto de ensayo se pone en contacto con el mismo, y el chip sensor se ilumina con una luz de una longitud de onda particular desde un ángulo particular. La unión de un compuesto de ensayo también se puede medir detectando la aparición de un pico correspondiente al compuesto de ensayo mediante un procedimiento en el que un polipéptido de HRS o un socio de unión celular se inmoviliza sobre la superficie de un chip de proteína adaptable a un espectrómetro de masas, una compuesto de ensayo se pone en contacto con el mismo, y un procedimiento de ionización tal como MALDI-MS, ESI-MS, FAB-MS y similares se combina con un espectrómetro de masas (por ejemplo, espectrómetro de masas de doble enfoque, espectrómetro de masas cuadrupolo, espectrómetro de masas de tiempo-de-vuelo, espectrómetro de masas de transformada de Fourier, espectrómetro de masas de ciclotrón de iones y similares).

La divulgación comprende ensayos basados en células, ensayos basados en vesículas de membrana, o ensayos basados en la fracción de membrana pueden usarse para identificar compuestos que modulan interacciones en la ruta no canónica del polipéptido de HRS seleccionado. Con este fin, pueden usarse líneas celulares que expresan un polipéptido de HRS y/o un socio de unión, o una proteína de fusión que contiene un dominio o fragmento de dichas proteínas (o una combinación de los mismos), o líneas celulares (por ejemplo, células COS, células CHO, células HEK293, células Hela, etc.) que han sido manipuladas genéticamente para expresar dicha proteína o proteínas o proteína o proteínas de fusión. Un compuesto o compuestos de ensayo que influyen en la actividad no canónica pueden identificarse mediante el control de un cambio (por ejemplo, un cambio estadísticamente significativo) en esa actividad en comparación con un control o una cantidad predeterminada.

Para realizaciones que se relacionan con agentes antisentido y de ARNi, por ejemplo, también se incluyen los procedimientos de cribado de un compuesto para la eficacia en alterar la expresión de un polinucleótido de referencia de HRS, que comprende a) exponer una muestra que comprende el polinucleótido de referencia de HRS a un compuesto tal como un oligonucleótido antisentido potencial, y b) detectar la expresión alterada del polinucleótido de HRS. En ciertos ejemplos no limitantes, estas y otras realizaciones pueden emplearse en ensayos basados en células o en ensayos de traducción libres de células, según técnicas de rutina en la técnica. También se incluyen los agentes antisentido y de ARNi identificados mediante dichos procedimientos.

También se divulgan cualquiera de los procedimientos anteriores, u otros procedimientos de cribado conocidos en la técnica, que están adaptados para cribado de alto rendimiento (HTS). El HTS normalmente usa la automatización para ejecutar un cribado de un ensayo contra una biblioteca de compuestos candidatos, por ejemplo, un ensayo que mide un aumento o una disminución de una actividad no canónica, tal como se describe en el presente documento.

### C. Procedimientos de tratamiento

- En otro aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos de uso de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de una célula, tejido o sujeto con una composición tal como se describe en el presente documento. Las células o tejido que pueden estar moduladas por la presente invención son preferentemente células de mamífero, o más preferiblemente células humanas. Dichas células pueden estar en un estado sano o en un estado patológico.
- 10 Por consiguiente, los agentes de HRS descritos en el presente documento, incluyendo polipéptidos de HRS, polinucleótidos de HRS, vectores basados en polinucleótidos de HRS, oligonucleótidos antisentido, agentes de ARNi, así como agentes de unión tales como péptidos, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, peptidomiméticos y otras moléculas pequeñas, pueden usarse para tratar diversas enfermedades o afecciones no limitantes asociados con las actividades no canónicas de una HRS de. Los ejemplos de dichas actividades no canónicas incluyen
- 15 modulación de la proliferación celular, modulación de la migración celular, modulación de la diferenciación celular (por ejemplo, hematopoyesis), modulación de la apoptosis u otras formas de muerte celular, modulación de la señalización celular, modulación de la angiogénesis, modulación de la unión celular, modulación del metabolismo celular, modulación de la producción o la actividad de citoquinas, modulación de la actividad del receptor de citoquinas, modulación de la inflamación, y similares.
- 20 Se incluyen las terapias basadas en polinucleótidos, tales como terapias antisentido y terapias de interferencia de ARNi, que normalmente se relacionan con la reducción de la expresión de una molécula diana, tal como una variante particular de splicing de un polipéptido de HRS o un socio de unión celular de un polipéptido de HRS, que en caso contrario contribuye a su actividad no canónica. Las terapias antisentido o de ARNi normalmente antagonizan la
- 25 actividad no canónica, tal como reduciendo la expresión del polipéptido de referencia de HRS. También se incluyen polipéptidos, anticuerpos, peptidomiméticos, u otras terapias basadas en moléculas pequeñas, que, bien agonizan o bien antagonizan la actividad no canónica de un polipéptido de referencia de HRS, tal como mediante la interacción directa con el polipéptido de HRS, su socio o socios de unión celular, o ambos.
- 30 La divulgación comprende, por ejemplo, se proporcionan procedimientos para modular las actividades celulares terapéuticamente relevantes incluyendo, aunque sin limitarse a, metabolismo celular, diferenciación celular, proliferación celular, muerte celular, movilización celular, migración celular, función del sistema inmunitario, transcripción génica, traducción del mRNA, impedancia celular, producción de citoquinas, y similares, que comprende poner en contacto una célula con una composición de HRS tal como se describe en el presente documento. Por
- 35 consiguiente, las composiciones de HRS pueden emplearse en el tratamiento de esencialmente cualquier célula o tejido o sujeto que se beneficiaría de la modulación de una o más de dichas actividades.
- Las composiciones HRS también pueden usarse en cualquiera de una serie de contextos terapéuticos que incluyen, por ejemplo, los relacionados con el tratamiento o la prevención de enfermedades neoplásicas, enfermedades del
- 40 sistema inmunitario (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias e inflamación), enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades neuronales/neurológicas, enfermedades musculares/cardiovasculares, enfermedades asociadas con la hematopoyesis aberrante, enfermedades asociadas con la angiogénesis aberrante, enfermedades asociadas con la supervivencia celular aberrante, y otras.
- 45 Por ejemplo, las composiciones de la divulgación pueden usarse como inmunomoduladores para el tratamiento de indicaciones anti- o pro-inflamatorias mediante la modulación de las células que median, ya sea directa o indirectamente, en enfermedades condiciones y trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios. La utilidad de las composiciones de la invención como inmunomoduladores puede monitorizarse usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas y disponibles en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos de migración (por ejemplo, el uso de
- 50 leucocitos, linfocitos, monocitos), ensayos de producción de citoquinas, ensayos de viabilidad celular (por ejemplo, usando células B, células T, monocitos, células NK), y similares.
- "Inflamación" generalmente se refiere a la respuesta biológica de los tejidos a los estímulos nocivos, tales como agentes patógenos, células dañadas (por ejemplo, heridas), e irritantes. La expresión "respuesta inflamatoria" se
- 55 refiere a los mecanismos específicos por los cuales se consigue y regula la inflamación, incluyendo, simplemente a modo de ilustración, activación o migración de células inmunitarias, producción de citoquinas, vasodilatación, incluyendo la liberación de quininas, fibrinólisis y coagulación, entre otros descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Idealmente, la inflamación es un intento de protección por el cuerpo para eliminar tanto los estímulos perjudiciales como iniciar el procedimiento de curación para el tejido o tejidos afectados. En ausencia de
- 60 inflamación, las heridas e infecciones nunca se curarían, creando una situación en la que la destrucción progresiva del tejido pondría en peligro la supervivencia. Por otra parte, la inflamación excesiva o crónica puede asociarse con diversas enfermedades, como la fiebre del heno, la aterosclerosis y la artritis reumatoide, entre otras descritas en el

presente documento y conocidas en la técnica.

- Los signos clínicos de inflamación crónica dependen de la duración de la enfermedad, las lesiones inflamatorias, la causa y el área anatómica afectada (véase, por ejemplo, Kumar y col., Robbins Basic Pathology-8th Ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica se asocia con diversas afecciones patológicas o enfermedades, incluyendo, por ejemplo, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis, tal como artritis reumatoide y osteoartritis y gota artrítica, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, ataque cardíaco, insuficiencia renal, lupus, pancreatitis, accidente cerebrovascular, complicaciones quirúrgicas, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, trastornos neurológicos, diabetes, trastornos metabólicos, obesidad, y psoriasis, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica. Por lo tanto, las composiciones de HRS pueden usarse para tratar o gestionar inflamación crónica, modular cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias crónicas individuales, o tratar cualquier una o más enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica.
- 15 Criterios para la evaluación de los signos y síntomas de afecciones inflamatorias y otras, incluyendo para fines de realizar el diagnóstico diferencial y también para monitorizar tratamientos tales como la determinación de si una dosis terapéuticamente eficaz se ha administrado en el ciclo de tratamiento, por ejemplo, mediante la determinación de la mejoría según criterios clínicos aceptados, serán evidentes para los expertos en la materia y se indicarán como ejemplo mediante las enseñanzas de, por ejemplo, Berkow y col., eds., The Merck Manual, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman y col., eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

También se divulgan procedimientos para modular una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria innata. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" incluye una reacción medible u observable a un antígeno, composición de vacuna, o molécula inmunomoduladora mediada por una o más células del sistema inmunitario. Una respuesta inmunitaria normalmente comienza con un antígeno o molécula inmunomoduladora que se une a una célula del sistema inmunitario. Una reacción a un antígeno o molécula inmunomoduladora puede estar mediada por muchos tipos de células, incluyendo una célula que se une inicialmente a un antígeno o molécula inmunomoduladora y las células que participan en la mediación de una respuesta inmunitaria mediada por células, humoral, innata.

Una "respuesta inmunitaria innata", tal como se usa en el presente documento, puede implicar la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o un polipéptido de HRS a receptores de la superficie celular, tales como receptores de tipo Toll. La activación de receptores de tipo toll y rutas de señalización Ipaf en respuesta a PAMP u otras señales causa la producción de moléculas inmunomoduladoras, tales como citoquinas y moléculas co-estimuladoras, que inducen y/o potencian una respuesta inmunitaria. Las células implicadas en la respuesta inmunitaria innata incluyen, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células asesinas naturales, y neutrófilos, entre otras.

Ciertas realizaciones se refieren al aumento de una respuesta inmunitaria innata. Otras realizaciones se refieren a la disminución de una respuesta inmunitaria innata. En ciertos aspectos, una respuesta inmunitaria innata está mediada por uno o más receptores de tipo Toll (TLR), tales como TLR2 y/o TLR4. Ciertos polipéptidos de HRS de la invención se unen a TLR tales como TLR2 y/o TLR4. Los TLR reconocen PAMP que distinguen a agentes infecciosos de sí mismos y que median la producción de moléculas inmunomoduladoras, tales como citoquinas, necesarias para el desarrollo de una inmunidad adaptativa eficaz (Aderem, A y Ulevitch, R. J. Nature 406: 782-787 (2000) y Brightbill, H. D., Immunology 101: 1-10 (2000), que se incorporan al presente documento por referencia). Los miembros de la familia de receptores de tipo toll reconocen diversos tipos de antígenos y pueden discriminar entre los patógenos. Por ejemplo, TLR2 reconoce diversos componentes fúngicos, Gram-positivos y micobacterianos, TLR4 reconoce el lipopolisacárido producto Gram-negativo (LPS), y TLR9 reconoce ácidos nucleicos tales como repeticiones de CpG en el ADN bacteriano.

Las composiciones de HRS que estimulan la inmunidad innata (por ejemplo, a través de TLR2 y/o TLR4) pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones, ya sea solos o en combinación con otras terapias. Ejemplos específicos de dichas afecciones incluyen enfermedades infecciosas, tales como enfermedades infecciosas bacterianas, víricas y parasitarias. Composiciones de HRS que estimulan la inmunidad innata también pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas, para mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto para el antígeno primario, ya sea en una vacuna viva, atenuada o de otro tipo.

Los ejemplos de enfermedades o agentes víricos infecciosos (y sus vacunas correspondientes) incluyen, aunque no se limitan a, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis E, calcivirus asociado a diarrea, diarrea por rotavirus, neumonía por *Haemophilus influenzae* B y enfermedad invasiva, gripe, sarampión, paperas, rubéola, neumonía asociada a paragrape, neumonía por virus sincitial respiratorio (VSR), síndrome respiratorio agudo grave (SARS), virus del papiloma humano, úlceras genitales por herpes simple tipo 2, VIH/SIDA, dengue, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, enfermedad asociada al virus del Nilo occidental, fiebre amarilla, virus de Epstein-Barr, fiebre de Lassa, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre hemorrágica del Ébola, fiebre hemorrágica de Marburgo, rabia, fiebre del Valle del Rift, viruela, lepra, infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, poliomielitis, entre otras descritas en el presente documento.

10

Los ejemplos de enfermedades infecciosas o agentes bacterianos incluyen, aunque no se limitan a, *Bacillus anthracis*, *Borellia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psitacci*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* (es decir, difteria), *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia reckettsii*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, y otitis media (por ejemplo, a menudo causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*), entre otras descritas en otro lugar en el presente documento.

15

20

Ejemplos de enfermedades infecciosas parasitarias incluyen, aunque no se limitan a, Amebiasis (por ejemplo, *Entamoeba histolytica*), anquilostomiasis (por ejemplo, parásitos nematodos tales como *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*), Leishmaniosis, Malaria (cuatro especies del protozoo parásito *Plasmodium*; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), esquistosomiasis (esquistosoma parásito; *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*), *Onchocerca volvulus* (ceguera de los ríos), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas/enfermedad de sueño americana) y *Dracunculus medinensis*, filariasis linfática.

25

30

Ciertas composiciones de HRS pueden ser útiles en el tratamiento o la reducción del choque endotóxico, que a menudo resulta de la exposición a antígenos extraños, tales como lipopolisacárido (LPS). Debido a que el choque endotóxico puede estar mediado por la señalización de TLR y fragmentos de HRS endógenos de origen natural (por ejemplo, SV9) puede estimular los TLR, ciertos de los agentes de unión, agentes antisentido, o agentes de ARNi proporcionados en el presente documento pueden hacer a un sujeto más resistente a choque endotóxico antagonizando o reduciendo de otro modo la estimulación mediada por un fragmento HRS endógeno de TLR2 y/o TLR4.

35

Ciertas composiciones de HRS pueden ser útiles para reducir o antagonizar ciertas actividades inmunitarias. Por ejemplo, dado el papel de los TLR en la modulación de la migración celular, tales como la migración de monocitos, las composiciones de HRS que señalan a través de TLR también pueden modular la migración celular. En ciertos aspectos, las composiciones de HRS reducen o antagonizan actividades mediadas por CCL1, tal como la migración de células inmunitarias, incluyendo la migración de monocitos. Como un ejemplo, ciertas composiciones de HRS pueden activar TLR, tales como TLR2 y/o TLR4, lo que en ciertos casos causa la secreción de citoquinas (por ejemplo, MIP1 $\alpha$ ), y la regulación negativa en los niveles o la actividad de los receptores de citoquinas relacionadas (por ejemplo, CCL1). Por lo tanto, las composiciones de HRS pueden emplearse para modular la actividad inmunitaria, tal como la migración celular asociada con TLR y receptores de citoquinas, tales como CCL1, y de ese modo tratar enfermedades o condiciones mediadas por TLR y/o CCR1.

40

45

También se divulgan procedimientos de tratamiento de enfermedades inmunitarias. Enfermedades, trastornos o afecciones ilustrativas del sistema inmunitario, que se pueden tratar según la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, inmunodeficiencias primarias, trombocitopenia inmunomediada, síndrome de Kawasaki, trasplante de médula ósea (por ejemplo, trasplante de médula ósea reciente en adultos o niños), leucemia linfocítica de células B crónica, infección por VIH (por ejemplo, infección por VIH en adulto o pediátrica), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, púrpura postransfusional, y similares.

50

Adicionalmente, enfermedades trastornos y afecciones adicionales incluyen síndrome de Guillain-Barre, anemia (por ejemplo, anemia asociada con el parvovirus B19, pacientes con mieloma múltiple estable que están en alto riesgo de infección (por ejemplo, infección recurrente), anemia hemolítica autoinmunitaria (por ejemplo, anemia hemolítica autoinmunitaria de tipo caliente), trombocitopenia (por ejemplo, trombocitopenia neonatal), y neutropenia mediada por sistema inmunitario), trasplante (por ejemplo, receptores negativos para citomegalovirus (CMV) de órganos positivos para CMV), hipogammaglobulinemia (por ejemplo, neonatos hipogammaglobulinémicos con factor de riesgo para infección o morbilidad), epilepsia (por ejemplo, epilepsia intratable), síndromes de vasculitis sistémicas, miastenia grave (por ejemplo, descompensación en la miastenia grave), dermatomiositis y polimiositis.

60

Enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunitarias adicionales incluyen, aunque no se limitan a, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, autoimmunocitopenia, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, cardiopatía reumática, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), la esclerosis múltiple, neuritis, uveítis oftálmica, poliendocrinopatías, púrpura (por ejemplo, púrpura de Henloch-Scoenlein), enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, inflamación pulmonar autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus dependiente de insulina y enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria.

Enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias adicionales incluyen, aunque no se limitan a, tiroiditis autoinmunitaria; hipotiroidismo, incluyendo tiroiditis de Hashimoto y tiroiditis caracterizada, por ejemplo, por citotoxicidad mediada por células y humoral de la tiroides; LES (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, mediante complejos inmunitarios circulantes y localmente generados); síndrome de Goodpasture (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos anti-membrana basal); pénfigo (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos acantolíticoepidérmicos); autoinmunitades por receptores tales como, por ejemplo, enfermedad de Graves (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por los anticuerpos para un receptor de hormona estimulante de la tiroides; miastenia graves, que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra el receptor de acetilcolina); resistencia a la insulina (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por los anticuerpos contra el receptor de insulina); anemia hemolítica autoinmunitaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por fagocitosis de glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpo); y púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por fagocitosis de plaquetas sensibilizadas con anticuerpo).

Enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias incluyen, aunque no se limitan a, artritis reumatoide (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por complejos inmunitarios en articulaciones); esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos nucleolares y otros nucleares); enfermedad mixta del tejido conectivo, (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por los anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles, por ejemplo, ribonucleoproteína); polimiositis/dermatomiositis (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por los anticuerpos anti-nucleares no histónicos); anemia perniciosa (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos anti-células parietales, antimicrosoma, y anti-factor intrínseco); enfermedad de Addison idiopática (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por citotoxicidad adrenal mediada por células y humoral); infertilidad (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos antispermatozoides); glomerulonefritis (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos o complejos inmunitarios contra la membrana basal glomerular); por glomerulonefritis primaria, por nefropatía por IgA; penfigoide ampolloso (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por IgG y complemento en la membrana basal); síndrome de Sjogren (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos de tejido múltiple y/o el anticuerpo antinuclear no histónico específico (SS-B)); diabetes mellitus (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos para células de islotes mediados por células y humorales); y resistencia a fármacos adrenérgicos, incluyendo resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra el receptor beta-adrenérgico).

Aún otras enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias incluyen, aunque no se limitan a hepatitis crónica activa (que a menudo se caracteriza, por ejemplo por anticuerpos contra músculo liso); cirrosis biliar primaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos anti-mitocondriales); otra insuficiencia de glándula endocrina (que se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos específicos de tejido en algunos casos); vitiligo (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos anti-melanocitos); vasculitis (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por inmunoglobulina y complemento en las paredes del vaso y/o complemento bajo en suero); afecciones post-infarto de miocardio (que a menudo se caracterizan, por ejemplo, por anticuerpos anti-miocardio); síndrome de cardiotomía (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos anti-miocardio); urticaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM contra IgE); dermatitis atópica (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM contra IgE); asma (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM contra IgE); miopatías inflamatorias; y otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos y atróficos.

También se divulgan procedimientos de modulación de la hematopoyesis y afecciones relacionadas. Los ejemplos de procedimientos hematopoyéticos que pueden ser modulados por los polipéptidos de HRS de la invención incluyen, sin limitación, la formación de células mieloides (por ejemplo, células eritroides, mastocitos monocitos/macrófagos, células dendríticas mieloides, granulocitos, tales como basófilos, neutrófilos y eosinófilos, megacariocitos, plaquetas) y células linfoides (por ejemplo, células asesinas naturales, células dendríticas linfoides, células B y células T). Ciertos procedimientos hematopoyéticos específicos incluyen eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis, megacariopoyesis, trombopoyesis, y otros. También se incluyen procedimientos para modular el tráfico o la movilización de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre hematopoyéticas, células progenitoras, eritrocitos, granulocitos, linfocitos, megacariocitos y trombocitos.

Los procedimientos de modulación de la hematopoyesis se pueden poner en práctica *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o en cualquier combinación de los mismos. Estos procedimientos se pueden poner en práctica en cualquier muestra

biológica, cultivo celular, o tejido que contenga células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas u otras células madre o progenitoras que son capaces de diferenciarse a lo largo del linaje hematopoyético (por ejemplo, tejido adiposo derivado de células madre). Para procedimientos *in vitro* y *ex vivo*, las células madre y células progenitoras, ya sea de origen hematopoyético o de otro, se pueden aislar y/o identificar según las técnicas y características descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

En aún otras realizaciones, las composiciones de HRS de la divulgación pueden usarse para modular la angiogénesis, por ejemplo, a través de la modulación de la proliferación y/o señalización de células endoteliales. La proliferación y/o señalización celular de células endoteliales pueden monitorizarse usando una línea celular apropiada (por ejemplo, células pulmonares endoteliales microvasculares humanas (HMVEC-L) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)), y usando un ensayo apropiado (por ejemplo, ensayos de migración de células endoteliales, ensayos de proliferación de células endoteliales, ensayos de formación de tubos, ensayos de tapón de matrigel, etc.), muchos de los cuales son conocidos y están disponibles en la técnica.

Por lo tanto, en realizaciones relacionadas, las composiciones de la divulgación pueden emplearse en el tratamiento de esencialmente cualquier célula o tejido o sujeto que se beneficiaría de la modulación de la angiogénesis. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula o tejido o sujeto que experimenta o es susceptible a la angiogénesis (por ejemplo, una afección angiogénica) puede ponerse en contacto con una composición adecuada de la invención para inhibir una afección angiogénica. En otras realizaciones, una célula o tejido que experimenta o es susceptible a angiogénesis insuficiente (por ejemplo, una afección angiostática) puede ponerse en contacto con una composición apropiada de la invención con el fin de interferir en la actividad angiostática y/o promover la angiogénesis.

Los ejemplos ilustrativos de afecciones angiogénicas incluyen, aunque no se limitan a, degeneración macular asociada a la edad (AMD), cáncer (tanto sólido como hematológico), anomalías del desarrollo (organogénesis), ceguera diabética, endometriosis, neovascularización ocular, psoriasis, artritis reumatoide (RA), y decoloraciones piel (por ejemplo, hemangioma, nevus flammeus o nevus simplex). Los ejemplos de afecciones anti-angiogénicas incluyen, aunque no se limitan a, enfermedad cardiovascular, reestenosis, daños en los tejidos después de la reperfusión del tejido isquémico o insuficiencia cardíaca, inflamación crónica y cicatrización de heridas.

En otras realizaciones, las composiciones de HRS de la invención pueden usarse para modular la proliferación y/o supervivencia celular y, por consiguiente, para tratar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones caracterizadas por anomalías en la proliferación y/o supervivencia celular. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones de HRS pueden usarse para modular la apoptosis y/o para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la apoptosis anormal. Apoptosis es el término utilizado para describir la cascada de señalización celular conocida como muerte celular programada. Existen diversas indicaciones terapéuticas para las moléculas que inducen la apoptosis (por ejemplo, cáncer), así como aquellas que inhiben la apoptosis (es decir, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, sepsis, etc.). La apoptosis se puede monitorizar mediante cualquiera de una serie de técnicas disponibles conocidas y disponibles en la técnica incluyendo, por ejemplo, ensayos que miden la fragmentación del ADN, las alteraciones en la asimetría de la membrana, la activación de caspasas apoptóticas y/o la liberación del citocromo C y AIF.

Enfermedades ilustrativas asociadas con un aumento de la supervivencia celular, o la inhibición de la apoptosis incluyen, aunque no se limitan a, cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas y tumores dependientes de hormonas, incluyendo, aunque sin limitarse a cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario); trastornos autoinmunitarios (tales como, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmunitaria, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario, gastritis autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria y artritis reumatoide) e infecciones víricas (tales como herpesvirus, virus de la viruela y adenovirus), inflamación, enfermedad de injerto contra huésped (aguda y/o crónica), rechazo agudo del injerto y rechazo crónico de injerto.

Enfermedades o afecciones ilustrativas adicionales asociadas con el aumento de la supervivencia celular incluyen, aunque no se limitan a, la progresión y/o metástasis de tumores malignos y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica), síndrome mielodisplásico policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de las cadenas pesadas y tumores sólidos incluyendo, aunque sin limitarse a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma

osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

10

Enfermedades ilustrativas asociadas con el aumento de la apoptosis incluyen, aunque no se limitan a, SIDA (tal como la nefropatía inducida por VIH y encefalitis por VIH), trastornos neurodegenerativos (tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar y tumor cerebral o enfermedad asociada anteriormente), trastornos autoinmunitarios tales como esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmunitaria, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario, gastritis autoinmunitaria, trombocitopénica púrpura y artritis reumatoide, síndromes mielodisplásicos (tales como anemia aplásica), enfermedad injerto contra huésped (aguda y/o crónica), lesión isquémica (tal como la causada por infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y lesión por reperfusión), lesión o enfermedad hepática (por ejemplo, lesión hepática relacionada con hepatitis, cirrosis, isquemia/lesión por reperfusión, colestosis (lesión de los conductos biliares) y cáncer de hígado), enfermedad inducida hepática por toxinas (tal como la causada por el alcohol), choque séptico, colitis ulcerosa, caquexia y anorexia.

15

20

25

En aún otras realizaciones, las composiciones de la divulgación pueden usarse en el tratamiento de enfermedades neuronales o trastornos neurológicos, ejemplos ilustrativos de los cuales incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, corea de Huntington, hemiplejía, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia, parálisis cerebral, síndrome de fatiga crónica, síndromes de dolor crónico, anomalías neurológicas congénitas, enfermedades de los nervios craneales, delirio, demencia, enfermedades desmielinizantes, disautonomía, epilepsia, cefaleas, enfermedad de Huntington, hidrocefalia, meningitis, trastornos del movimiento, enfermedades musculares, neoplasias del sistema nervioso, síndromes neurocutáneos, enfermedades neurodegenerativas, síndromes de neurotoxicidad, trastornos de motilidad ocular, trastornos del sistema nervioso periférico, trastornos de la pituitaria, porencefalia, síndrome de Rett, trastornos del sueño, trastornos de la médula espinal, accidente cerebrovascular, corea de Sydenham, síndrome de Tourette, traumatismo y lesiones del sistema nervioso, etc. En ciertas realizaciones, la afección neurológica se asocia con la muerte de neuronas inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina que se cree que está implicada en la patogenia de ciertas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson, o un mecanismo relacionado.

30

35

40

Además, las realizaciones adicionales se refieren al uso de las composiciones de la invención en el tratamiento de trastornos metabólicos tales como adrenoleucodistrofia, enfermedad de Krabbe (leucodistrofia de células globoides), leucodistrofia metacromática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan (leucodistrofia esponjiforme), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome de Cockayne, enfermedad de Hurler, síndrome de Lowe, enfermedad de Leigh, enfermedad de Wilson, enfermedad de Hallervorden-Spatz, enfermedad de Tay-Sachs, etc. La utilidad de las composiciones de la invención en la modulación de los procedimientos metabólicos puede monitorizarse usando cualquier de diversas técnicas conocidas y disponibles en la técnica incluyendo, por ejemplo, ensayos que miden la lipogénesis de adipocitos o la lipólisis de adipocitos.

45

50

55

En realizaciones más específicas de la divulgación, las composiciones de HRS de la invención pueden usarse para modular la señalización celular, por ejemplo, a través de proteínas de señalización celular. La señalización celular puede monitorizarse usando cualquiera de una serie de ensayos bien conocidos. Por ejemplo, la inducción de los acontecimientos de señalización celular en general se puede controlar a través patrones de fosforilación alterados de diversas proteínas diana. La detección de actividades de señalización celular en respuesta al tratamiento de células con polipéptidos de HRS sirve, por lo tanto, como un indicador de efectos biológicos distintos. Las proteínas diana utilizados para este ensayo se pueden seleccionar de forma que abarquen componentes clave de las principales cascadas de señalización celular, proporcionando de este modo un amplio panorama del paisaje señalización celular y su relevancia terapéutica. En general, dichos ensayos implican el tratamiento de células con polipéptidos de HRS, seguido por la inmunodetección con anticuerpos que detectan específicamente las formas fosforiladas (activadas) de las proteínas diana.

60

Proteínas diana ilustrativas útiles para monitorizar acontecimientos de señalización celular terapéuticamente relevantes pueden incluir, aunque no se limitan a: MAPK p38 (proteína quinasa activada por mitógeno; citoquinas activadas por estrés celular e inflamatorias; implicadas en la diferenciación celular y la apoptosis); SAPK/JNK (proteína quinasa activada por estrés/quinasa Jun amino-terminal; citoquinas activadas por estrés celular e inflamatorias);

Erk1/2, p44/42 MAPK (proteína quinasa Erk1 y Erk2 activada por mitógeno; activadas por una amplia variedad de señales extracelulares; implicadas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celulares); y Akt (activada por la insulina y diversos factores de crecimiento o de supervivencia; implicada en la inhibición de la apoptosis, la regulación de la síntesis de glucógeno, la regulación del ciclo celular y el crecimiento celular). La fosforilación general de residuos de tirosina también puede monitorizarse como un indicador general de los cambios en la señalización celular mediada por fosforilación.

Por supuesto, se reconocerá que otras clases de proteínas, tales como moléculas de adhesión celular (por ejemplo, cadherinas, integrinas, claudinas, cateninas, selectinas, etc.) y/o proteínas de los canales iónicos también se pueden ensayar para monitorizar acontecimientos o actividades celulares moduladas por las composiciones de la invención.

En otras realizaciones específicas de la divulgación, las composiciones de HRS de la invención pueden usarse para modular la producción de citoquinas por células, por ejemplo, por leucocitos. La producción de citoquinas puede monitorizarse usando cualquiera de una serie de ensayos conocidos en la técnica (es decir, RT-PCR, ELISA, ELISPOT, citometría de flujo, etc.). En general, dichos ensayos implican el tratamiento de células con polipéptidos de HRS seguido de la detección de mRNA de citoquinas o polipéptidos para medir los cambios en la producción de citoquinas. La detección de aumentos y/o disminuciones en la producción de citoquinas en respuesta al tratamiento de células con polipéptidos de HRS sirve, por lo tanto, como un indicador de efectos biológicos distintos. Polipéptidos de HRS de la invención pueden inducir, mejorar y/o inhibir una respuesta inmunitaria o inflamatoria mediante la modulación de la producción de citoquinas. Por ejemplo, polipéptidos y composiciones de HRS de la invención pueden usarse para alterar un perfil de citoquinas (es decir, tipo 1 frente a tipo 2) en un sujeto. Las citoquinas ilustrativas que pueden medirse para monitorizar los efectos biológicos de las composiciones de HRS incluyen, aunque no se limitan a, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, etc.

## 25 ÍTEMS DE LA DIVULGACIÓN

1. Un polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) que tiene una actividad biológica no canónica, o un fragmento activo o variante del mismo.

2. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde el polipéptido comprende al menos el dominio WHEP de HRS.

3. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde el polipéptido comprende al menos el dominio de unión anticodón de HRS.

4. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde el polipéptido carece de un dominio de aminoacilación funcional.

5. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde el polipéptido comprende al menos el dominio WHEP de HRS y el dominio de unión anticodón de HRS, pero carece de un dominio de aminoacilación funcional.

6. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde el polipéptido comprende mostrada en la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO:11.

7. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde la variante activa del mismo es un polipéptido que tiene al menos el 90% de identidad respecto a una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO:11.

8. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde el fragmento activo del mismo comprende al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos de una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO:11.

9. El polipéptido variante de splicing aislado de histidil-tARN sintetasa (HRS) del ítem 1, donde la actividad biológica no canónica se selecciona entre el grupo que consiste en unión a ARN, unión a aminoácidos, modulación de la proliferación celular, modulación de la migración celular, modulación de la diferenciación celular, modulación de la apoptosis o muerte celular, modulación de la señalización celular, modulación de la angiogénesis, modulación de la unión celular, modulación del metabolismo celular, modulación de la producción o la actividad de citoquinas, modulación de la actividad del receptor de citoquinas, y modulación de la inflamación.

10. Un polipéptido de fusión que comprende cualquiera de los ítems 1-9 y un socio de fusión heterólogo.

11. Un complejo dimérico o multimérico que comprende al menos un polipéptido aislado del ítem 1.
12. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de cualquiera de los ítems 1-10.
- 5 13. Un polinucleótido aislado del ítem 12, donde el polinucleótido comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 5, 8 o 10, o un complemento de la misma.
14. Un vector de expresión que comprenden un polinucleótido aislado del ítem 13.
- 10 15. Una célula huésped que comprende un vector de expresión del ítem 14.
16. Un oligonucleótido que hibrida específicamente con un polinucleótido de la SEQ ID NO:5, 8, o 10.
- 15 17. El oligonucleótido del ítem 16, seleccionado de entre un cebador, una sonda y un oligonucleótido antisentido.
18. Un agente de unión que exhibe especificidad de unión para un polipéptido aislado de HRS del ítem 1, un socio de unión celular del polipéptido aislado de HRS, o ambos.
- 20 19. El agente de unión del ítem 18, seleccionado de entre un anticuerpo, un fragmento de unión a antígenos del mismo, un péptido, un peptidomimético, una molécula pequeña y un aptámero.
20. El agente de unión del ítem 18, donde el agente de unión antagoniza una actividad no canónica del polipéptido de HRS.
- 25 21. El agente de unión del ítem 18, donde el agente de unión agoniza una actividad no canónica del polipéptido de HRS.
22. Un procedimiento de determinación de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótidos de una variante de splicing de histidil-tARN sintetasa (HRS) en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con uno o más oligonucleótidos que hibridan específicamente con una variante de splicing de HRS tal como se muestra en las SEQ ID NO: 5, 8 o 10, detectar la presencia o ausencia de los oligonucleótidos en la muestra, y determinar de este modo la presencia o los niveles de la secuencia de polinucleótidos de la variante de splicing de HRS.
- 30 23. Un procedimiento de determinación de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótidos de una variante de splicing de histidil-tARN sintetasa (HRS) en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos dos oligonucleótidos que amplifican específicamente una variante de splicing de HRS tal como se muestra en las SEQ ID NO: 5, 8 o 10, realizar una reacción de amplificación, detectar la presencia o ausencia de un producto amplificado, y determinar de este modo la presencia o los niveles de la secuencia de polinucleótidos de la variante de splicing de HRS.
- 35 40 24. El procedimiento del ítem 22 o 23, donde el uno o más oligonucleótidos hibridan específicamente con o amplifican específicamente una unión de splicing que es exclusiva de la variante de splicing de HRS.
- 45 25. El procedimiento del ítem 22 o 23, que comprende comparar la presencia o niveles de la variante de splicing de HRS con una muestra de control o un valor predeterminado.
26. El procedimiento del ítem 25, que comprende caracterizar el estado de la muestra para distinguirla del control.
- 50 27. El procedimiento del ítem 26, donde la muestra y el control comprende una célula o tejido, y el procedimiento comprende distinguir entre células o tejidos de diferentes especies, células de diferentes tejidos u órganos, células en diferentes estados del desarrollo celular, células en diferentes estados de diferenciación celular, o células sanas y enfermas.
- 55 28. Un procedimiento de identificación de un compuesto que se une específicamente a un polipéptido variante de splicing de histidil-tARN sintetasa (HRS) tal como se muestra en las SEQ ID NO: 6, 9 u 11, o uno o más de sus socios de unión celulares, que comprende a) combinar el polipéptido de HRS o su socio de unión celular o ambos con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas, y b) detectar la unión del polipéptido de HRS o su socio de unión celular o ambos al compuesto de ensayo, identificando de este modo un compuesto que se une específicamente al polipéptido de HRS o su socio de unión celular o ambos.
- 60 29. El procedimiento del ítem 28, donde el compuesto de ensayo es un polipéptido o péptido, un anticuerpo o fragmento

de unión a antígenos del mismo, un peptidomimético, o una molécula pequeña.

30. El procedimiento del ítem 28, donde el compuesto de ensayo agoniza una actividad biológica no canónica del polipéptido de HRS o su socio de unión celular.

5

31. El procedimiento del ítem 28, donde el compuesto de ensayo antagoniza una actividad biológica no canónica del polipéptido de HRS o su socio de unión celular.

32. Un compuesto identificado por el procedimiento de cualquiera de los ítems 28-31.

10

33. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: (i) un polipéptido aislado según el ítem 1; (ii) una proteína de fusión según el ítem 10; (iii) un complejo dimérico o multimérico del ítem 11; (iv) un polinucleótido aislado según el ítem 12; (v) un vector de expresión según el ítem 13; (vi) un oligonucleótido según el ítem 16; (vii) un agente de unión según el ítem 18; y (viii) un compuesto según el ítem 32.

15

34. Un procedimiento para modular una actividad celular que comprende la puesta en contacto una célula o tejido con una composición del ítem 33.

20 35. El procedimiento del ítem 34, donde la actividad celular se selecciona entre el grupo que consiste en proliferación celular, migración celular, diferenciación celular, apoptosis o muerte celular, señalización celular, angiogénesis, unión celular, metabolismo, producción o la actividad de citoquinas, actividad del receptor de citoquina, e inflamación.

36. El procedimiento del ítem 37, donde la actividad celular es la producción o secreción de citoquinas.

25

37. El procedimiento del ítem 36, donde la citoquina es una o más de IL-2, TNF- $\alpha$ , o MIP1- $\alpha$ .

38. El procedimiento del ítem 35, donde la actividad celular es actividad de los receptores de citoquinas.

30 39. El procedimiento del ítem 38, donde el receptor de citoquinas es CCR1.

40. El procedimiento del ítem 35, donde la actividad celular es migración celular.

41. El procedimiento del ítem 40, que comprende reducir la migración celular de monocitos.

35

42. El procedimiento del ítem 41, donde la actividad celular es señalización celular a través de receptores de tipo Toll (TLR).

43. El procedimiento del ítem 35, donde la célula está en un sujeto.

40

44. Un procedimiento para tratar una afección que comprende la administración a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica del ítem 33, donde la afección se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades neoplásicas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas, infecciones, enfermedades cardiovasculares, enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal, y enfermedades asociadas con la supervivencia celular anormal.

45

45. El procedimiento del ítem 44, donde la afección es una enfermedad neurológica.

46. El procedimiento del ítem 45, donde la enfermedad neurológica está asociada con muerte neuronal inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

50

47. El procedimiento del ítem 44, donde la afección es una enfermedad inflamatoria.

48. El procedimiento del ítem 47, donde la enfermedad inflamatoria es gota artrítica o enfermedad inflamatoria intestinal.

55

49. Un procedimiento de cribado para identificar un modulador de la actividad celular que comprende las etapas de:

(a) formación de una mezcla de reacción, que incluye:

60

(i) una componente seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido según cualquiera de los ítems 1-9; un polipéptido de fusión según el ítem 10; un polinucleótido según el ítem 12; y un vector de expresión según el ítem 13;

(ii) un socio de unión, efector celular y/o tipo celular que se sabe que se une y/o es modulado por dicho componente;  
y

5 (iii) un compuesto de ensayo;

(b) detectar una interacción de dicho componente con el socio de unión, efector celular y/o tipo celular, donde un cambio en la interacción en presencia del compuesto de ensayo, en relación con la interacción en ausencia del compuesto de ensayo, de este modo identifica un modulador de la señalización celular.

10

Ejemplos

EJEMPLO 1

15 IDENTIFICACIÓN DE VARIANTE DE SPLICING ALTERNATIVA, HRS-SV9, DEL GEN DE HISTIDIL-TARN SINTETASA (HRS) HUMANA

Una variante de splicing alternativa del gen de HRS, denominada HRS-SV9, se identificó por PCR de la siguiente manera. Un par de cebadores, uno que cubre la región límite de la región 5 'no traducida y el exón 1 (HRS-BPF: 20 AGTGGACAGCCGGGATGGCAGAGC (SEQ ID NO: 1)) y el otro cerca del extremo 3' del exón 4 (HRS-P1R: CAGGAAGTCGCCTATCTGAAG (SEC ID NO: 2)), se usaron para buscar un acontecimiento de splicing de retención del intrón 2 previamente notificado por la base de datos EST de la Universidad de California Santa Cruz (EST # BP267368). Productos de reacción de PCR usando cADN como plantilla dieron lugar a una banda distinta (figura 1B, flecha superior) mayor que la banda de referencia (figura 1B, flecha inferior), que es el fragmento amplificado a partir 25 del gen de HRS de longitud completa (NM\_002109.3; SEQ ID NO: 3). Se detectó esta banda más grande en una biblioteca de cADN de músculo esquelético humano, pero no en las bibliotecas de cADN de células HEK293T o IMR32, lo que indica la especificidad tisular de esta variante de splicing. Esta banda se escindió y el fragmento de ADN se extrajo con un kit de purificación en gel para la secuenciación.

30 La secuenciación de ADN confirmó una inserción desde el intrón 2, tal como se notificó anteriormente, sin embargo no había indicios de la mutación T>C notificada en el exón 2, haciendo de esta una variante de splicing alternativa distinta del gen de HRS (figura 3A). La secuencia insertada de Intrón 2 introduce un codón de terminación inmediatamente después del exón 2, de tal manera que la secuencia de la proteína codificada tiene sólo los primeros 60 aminoácidos de la proteína HRS de longitud completa (figura 3B). La figura 3C muestra la secuencia codificante de 35 ácido nucleico (SEQ ID NO: 5) y secuencia de la proteína codificada (SEQ ID NO: 6) para la variante de splicing HRS-SV9.

Ejemplo 2

40 IDENTIFICACIÓN DE VARIANTE DE SPLICING ALTERNATIVA, HRS-SV11, DEL GEN DE HISTIDIL-TARN SINTETASA (HRS) HUMANA

En este ejemplo, también se identificó otra variante de splicing alternativa del gen de HRS, denominado HRS-SV11. Se usó un par de cebadores, uno que cubre el límite del extremo 3' de 5'-UTR y el extremo 5' del exón 1 (HRS-BPF: 45 AGTGGACAGCCGGGATGGCAGAGC (SEQ ID NO: 1)) y el otro que cubre residuos en el extremo 5' de 3'-UTR (HRS-3'-UTR: ATAGTGCCAGTCCCCTTCC (SEQ ID NO: 7)). Una banda distinta (figura 2B, flecha inferior) menor que la banda de referencia (figura 2B, flecha superior) se observó después de la amplificación por PCR del cADN. La banda se escindió, se purificó en gel y se secuenció. La secuenciación de ADN confirmó que esta es una variante de splicing del gen de HRS que contiene una delección del exón 3 al exón 10 (figura 3A). Esta supresión no causa desplazamiento 50 de marco. Por lo tanto, a nivel de proteínas, HRS-SV11 comprende el dominio WHEP N-terminal y el dominio anticodón C-terminal de la proteína HRS de referencia, pero falta el dominio de aminoacilación (figura 3B).

La figura 3D muestra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEQ ID NO: 8) y secuencia de la proteína codificada (SEQ ID NO: 9) para la variante de splicing HRS-SV11. Tal como se muestra en la figura 2C, este transcrito se 55 descubrió en cADN total de cerebro humano adulto, pulmón, músculo esquelético y THP-1, células Jurkat.

EJEMPLO 3

LAS VARIANTES DE SPLICING HRS-SV9 Y HRS-SV11 PUEDEN SER DE ORIGEN NATURAL

60

Para ensayar la existencia natural de estas variantes de splicing a nivel de proteínas, el extracto celular total se sometió a inmunoblot con anticuerpos anti HRS. Dos anticuerpos comerciales, un anticuerpo monoclonal con un epítipo de

los aminoácidos 1-97 (Novus Biologicals) y un anticuerpo policlonal con un epítipo en los aminoácidos 50-200 cerca del extremo C (Abcam), se ensayaron con un número de líneas celulares, incluyendo HEK293T, C2C12, y los tejidos musculares de ratas adultas, incluyendo los músculos tibiales (que representan músculo rápido) y los músculos sóleo (que representan músculo lento). Tanto los anticuerpos con terminal N como los anticuerpos con terminal C detectaron una banda (flechas inferiores en las figuras 4A y 4B) en HEK293T, mientras que el músculo tibial y sóleo de las ratas adultas tienen un tamaño compatible con el tamaño predicho del polipéptido variante de splicing HRS-SV11.

La inmunoprecipitación con el anticuerpo N-terminal detectó una banda en miotubos C2C12 diferenciados (flecha inferior en la figura 5A), que tiene un tamaño consecuente con el tamaño predicho del polipéptido variante de splicing HRS-SV9. Las bandas no se detectaron en las células HEK293T o mioblastos C2C12 diferenciados.

También se usó lisado celular total de células HEK293T que sobreexpresan HRS-SV11 etiquetado con myc como una referencia para la proteína HRS-SV11 endógena, que debe ser ligeramente más pequeño que HRS-SV11 etiquetado con myc. Tal como se muestra en las figuras 5B y 5C, una banda que discurre alrededor de 20 kDa, pero ligeramente más pequeña que HRS-SV11 etiquetado con myc fue detectada en células IMR32 por ambos anticuerpos (flechas inferiores en B y C), lo que sugiere la presencia de HRS-SV11 endógeno.

#### EJEMPLO 4

#### 20 SECRECIÓN DE VARIANTES DE SPLICING HRS-SV9 Y HRS-SV11 A PARTIR DE CÉLULAS HEK293T CUANDO SE SOBREEXPRESAN

En este ejemplo, HRS-SV9 y HRS-SV11 se expresaron con fuerza en células HEK293T y se ensayaron para determinar si se secretaban desde las células.

Para la construcción del plásmido, las secuencias codificantes de HRS de tipo silvestre, HRS-SV9 y HRS-SV11 se clonaron en vector pCI-neo-myc-myc-C (Promega, Madison, WI) a través de EcoRI/XhoI, respectivamente. Para ensayos de secreción, las células HEK293T se transfectaron cuando alcanzaban el 60-70% de confluencia. Se mezcló 1 µg de ADN con 125 µl de Opti-MEM. Se mezclaron 4 µl de lipofectamine 2000 con 125 µl de Opti-MEM. Después de 5 minutos, se añadió el complejo ADN-Opti-MEM al complejo lipofectamine 2000-Opti-MEM golpeando suavemente varias veces. La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se añadió gota a gota encima de las células. Después de agitación suave, las células se devolvieron a la incubadora. El medio de cultivo se renovó después de 6-7 horas. 24 horas después de la transfección, el medio se cambió a medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero. Tanto el medio como el extracto celular total se recogieron después de otras 6 horas de incubación. Las proteínas en los medios se precipitaron con TCA (ácido tricloroacético) al 20%. Tanto los medios como los extractos celulares totales se resolvieron en gel NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) y se sometieron a inmunoblot con los anticuerpos para HRS y tubulina N-terminales (Invitrogen).

Usando este enfoque, HRS-SV9 y HRS-SV11, así como HRS de longitud completa, se detectaron en fracciones de medios, demostrando que eran secretados desde las células HEK293T (figura 6). En cambio, la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) no se secretó (véase la figura 6C). Tal como se muestra en las figuras 6A-B, la tubulina se usó como control de fugas; la tubulina está presente en la fracción de lisado celular total, pero está ausente en fracciones de medio, demostrando ausencia de fugas en este experimento.

#### 45 EJEMPLO 5

#### LAS VARIANTES DE SPLICING HRS-SV9 Y HRS-SV11 AUMENTAN LA SECRECIÓN DE IL-2 EN CÉLULAS T ACTIVADAS

Cuando el antígeno es presentado por células presentadoras de antígeno (APC), la respuesta detectable más temprana de la activación de células T es la secreción de citoquinas, tales como IL-2. A través de la secreción autocrina, IL-2 activa la proliferación de células T, generando de este modo células necesarias para eliminar antígeno. Por lo tanto, los reguladores de la secreción de IL-2 sirven como inmunomoduladores para respuestas inmunitarias mediada por linfocitos T.

Las células T Jurkat de leucemia (ATCC No: TIB-152) se usan ampliamente para investigación de activación de células T, usando la expresión y la liberación de IL-2 como una indicación de activación. Para la activación de células T, las células T Jurkat se estimularon mediante ésteres de forbol (PMA) e ionomicina (IOM). La secreción de IL-2 en los medios se evaluó mediante ELISA. Como se esperaba, PMA e ionomicina estimularon las células T Jurkat para liberar IL-2 de una manera dependiente de la dosis. Tal como se muestra en la figura 7, HRS-SV9 y HRS-SV11, cuando se co-aplican con PMA e IOM aumentaron significativamente la secreción de IL-2. Por lo tanto, tanto HRS-SV9 como HRS-SV11 exhibieron actividad inmunomoduladora inesperada.

**EJEMPLO 6****LA VARIANTE DE SPLICING HRS-SV9 ESTIMULA LA SECRECIÓN DE TNF- $\alpha$  EN PBMCS**

5 Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana. Las células se resuspendieron en medio RPMI con 10% de FBS a  $1 \times 10^6$  células/ml. Un millón de células fueron tratadas durante 24 horas con HRS-SV9 a 6,25, 12,5, 25, 50, 100, y 250 nM. Las PBMC también se trataron con lipopolisacárido (LPS) a 1 UE/ ml, PBS, o proteína de control negativo 1 o 2 100 nM. Después de 24 horas, el sobrenadante de células se  
10 recogió por centrifugado a 2000 x g durante 10 min y se evaluó en un ensayo ELISA de TNF- $\alpha$  (R & D Systems; Cat. DTA00C).

Como se muestra en Figura 8, HRS-SV9 estimulaba las PBMC para secretar TNF- $\alpha$  de una manera dependiente de la dosis. En cambio, las células tratadas con PBS o proteínas de control negativo secretaban una cantidad mínima o  
15 nada de TNF- $\alpha$  (PBS, Ctrl. Neg. 1 y Ctrl. Neg. 2). El LPS, un conocido inductor de la secreción de TNF- $\alpha$ , dio lugar a una señal positiva a 1 EU/ ml. Aunque una cantidad mínima de LPS estaba presente en la proteína HRS-SV9, (-0,11 EU/ml a 250 nM), la señal de TNF- $\alpha$  observada para HRS-SV9 está por encima de lo que se puede atribuir a LPS. Los resultados de este ejemplo demuestran que HRS-SV9 actúa como un modulador de la secreción de TNF- $\alpha$ .

**20 EJEMPLO 7****HRS-SV11 PROTEGE LAS NEURONAS CORTICALES DE RATA Y LAS CÉLULAS PC12 DE MUERTE CELULAR NEURONAL INDUCIDA POR 6-OHDA**

25 Dado que el transcrito HRS-SV11 se identificó a partir de una línea celular neuronal, esta proteína se ensayó en ensayos de neuroprotección usando neuronas corticales de rata primarias y células PC12 cultivadas. Los ensayos usados fueron: (1) muerte neuronal inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina que se cree que está implicada en la patogenia de la enfermedad de Parkinson (PD); (2) muerte neuronal inducida por beta-amiloide (A $\beta$ ) (usando la forma A $\beta$ <sub>1-42</sub>), que reproduce la enfermedad de Alzheimer; (3) muerte neuronal inducida por ácido L-  
30 glutámico, que se observa en muchas enfermedades neurológicas tales como accidente cerebrovascular; y (4) muerte de células PC12 inducida por MPP+. Estos modelos experimentales han sido ampliamente estudiados y se considera que son fisiológicamente relevantes para las enfermedades neurológicas humanas.

**Preparación de proteína recombinante.** Se clonó HRS-SV11 en vector pET20b (Novagen) en sitios de EcoRV/NotI  
35 sin el codón de terminación. Una marca de polihistidina (6XHis) del vector pET20b se añadió al extremo C de la proteína HRS-SV11, permitiendo la purificación con perlas de níquel-NTA. La cepa de *E. coli* Rosetta (Novagen) se transformó con el plásmido pET20b-HRS-SV11 y se dejó crecer a 37°C con agitación vigorosa hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzaba 0,6-0,8. Se añadió IPTG 200  $\mu$ M para inducir la expresión de proteínas. Las bacterias se dejaron crear a 16 °C durante una noche.

40 Las bacterias se precipitaron a continuación, se resuspendieron en 50 ml de 1X tampón Ni-NTA (Tris 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 25 mM, pH8,0) con 1 comprimido de inhibidor de proteasa libre de EDTA Complete (Roche) y 300 mg de lisozima (Sigma), y se colocó en una rueda giratoria a 4°C durante 30 min. El lisado se sonicó con 6X impulsos de 10" con interrupciones de 5" (aumento de amplitud del 25% al 50% al 75% durante 3 ciclos). A continuación el  
45 lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 45 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se incubó con 1 ml de suspensión de resina Ni-NTA durante 10-15 min en una columna de 50 ml. Después de la incubación, la mezcla de proteínas-perlas se lavó exhaustivamente con 1X tampón Ni-NTA (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 25 mM, pH 8,0) suplementado con el 0,1% de Triton X-114 para retirar la endotoxina de las bacterias. Tras terminar el lavado, las proteínas se eluyeron en 10 ml (1X) tampón de elución de Ni-NTA (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, pH  
50 8,0). La proteína se dializó en Slide-A-Lyzer de límite 10 kDa (Pierce) contra 2X PBS tres veces, a continuación se concentró con un Amicon Centricon de límite 10 kDa (Fisher). La proteína concentrada se almacenó en glicerol al 50% y DTT 2 mM a -20°C. HRS-SV14 y HRS de tipo silvestre se clonaron en vector pET21a y se purificaron de la misma manera que HRS-SV11.

55 **Cultivo celular y tratamiento.** Se mantuvieron células PC12 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado con suero de caballo al 8%, suero fetal bovino al 8%, 30 IU/ml de penicilina y 30  $\mu$ g/ml de estreptomina a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Para ensayos de neuroprotección, las células PC12 se sembraron en placas de 24 pocillos a  $1,25 \times 10^5$  células/pocillo y se usaron un día después de la siembra.

60 Se aislaron neuronas corticales de rata primarias de embriones de rata el día 18 del embrión (E18) y se cultivaron tal como se ha descrito anteriormente (Brewer y col., 1995) con algunas modificaciones. En resumen, la corteza se extirpó en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) suplementada con piruvato sódico 1 mM y HEPES 10 mM (pH 7,4) sin

Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Gibco). Después de tripsinizarla durante 15 min a 37°C, la corteza tratada se lavó con medio de siembra en placas (DMEM con suero de caballo al 10%, suplementado con GlutaMAX 0,5 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin), y se trituraron varias veces. A las células se les dejó reposar durante 3 min, y a continuación se sedimentaron mediante centrifugado a 1.200 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se suspendió en 1 ml de medio de siembra en placas y se contó. 1,5x10<sup>5</sup> células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos revestidas de poli-L-lisina (0,1 mg/ml) y se mantuvieron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 4 h, el medio de siembra en placas se sustituyó por medio de cultivo (medio neurobasal, suplementado con GlutaMAX 0,5 mM y (1X) suplemento B27). La mitad del medio se renovó una vez por semana. Los experimentos se realizaron el 9 día *in vitro* (DIV 9) a menos que se mencione lo contrario. Un día antes de los experimentos, la mitad del medio se renovó.

En estudios de tratamiento con fármacos, los fármacos se diluyeron en medio de cultivo (pero la 6-OHDA se diluyó en H<sub>2</sub>O), y a continuación se aplicó a las células. Para neurotoxicidad inducida por glutamato monosódico (MSG), las neuronas se expusieron a MSG durante 20 min, y se lavaron una vez con medio de cultivo y se mantuvieron en medio de cultivo fresco. Se añadió memantina al mismo tiempo con MSG. Para toxicidad inducida por beta-amiloide, se incubó Aβ<sub>1-42</sub> a 37°C durante un día para formar agregados, y a continuación se añadió a las células. Para toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno, se disolvió un comprimido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 12,5 ml de H<sub>2</sub>O para crear un choque, y a continuación se añadió a las células.

La CE<sub>50</sub> de cada neurotoxina se determinó y se usó en los siguientes experimentos. La viabilidad neuronal se midió mediante ensayos de MTT y LDH. El ensayo de MTT se basa en la utilización de deshidrogenasas mitocondriales de células viables, que escinden el anillo de tetrazolio del MTT y dan cristales de formazán de MTT púrpura, mientras que el ensayo de LDH mide la liberación de LDH en el medio debido a la alteración de la integridad de la membrana. Para el ensayo de MTT, se añadió MTT en el medio a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó con las células durante 2 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. La deshidrogenasa mitocondrial escinde el anillo tetrazolio de MTT y produce cristales de formazán púrpura. Después de la incubación, el medio se aspiró y se añadieron 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán. La microplaca se agitó suavemente y se incubó a 37°C durante 5 min. A continuación, se recogieron 100 µl de solución y se cargaron en una microplaca de 96 pocillos, y la absorbancia se leyó a 570 nm (630 nm como referencia) mediante espectrofotómetro (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). La absorbancia relativa (DO570 - DO630) se usó como indicador de la viabilidad celular.

para el ensayo de LDH, la LDH liberada en el medio se midió mediante el kit de ensayo de LDH (Roche) siguiendo las instrucciones del producto. El medio se recogió y se centrifugó. El sobrenadante se guardó y 100 µl se cargaron en un pocillo de una microplaca de 96 pocillos (MP). Se añadieron 100 µl de medio de reacción recién preparado a cada pocillo, y se incubaron con medio durante 15 min a temperatura ambiente. La microplaca se mantuvo alejada de la luz después de añadir la mezcla de reacción. La absorbancia de las muestras a 492 nm se midió después de 15 min mediante espectrofotómetro (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Se usaron 200 µl del medio de ensayo como control de fondo. Se usó Triton X-100 al 2% como un control positivo, dado que permeabiliza toda la membrana celular y libera la cantidad máxima de LDH.

Entre los tres ensayos de neuroprotección, se descubrió que HRS-SV11 protegía las neuronas corticales de la muerte neuronal inducida por 6-OHDA de una manera dependiente de la dosis cuando estas neuronas fueron pre-tratadas con HRS-SV11 durante 24 h (figura 9A), pero tenía poco o ningún efecto sobre muerte neuronal inducida por Aβ, ácido L-glutámico y MPP+ (figura 10).

HRS-SV11 también se ensayó en un modelo de muerte de células PC12 inducida por 6-OHDA, ya que este modelo también es relevante para PD y ha sido bien caracterizado. Se observó una protección similar contra 6-OHDA después del pre-tratamiento de las células PC12 con HRS-SV11 durante 24 h (figuras 9B-C). Además del pre-tratamiento durante 24 h, HRS-SV11 también ejerció neuroprotección incluso con pre-tratamiento de 30 min (figura 5D), lo que sugiere que la síntesis de nuevas proteínas puede no ser necesario para la neuroprotección por HRS-SV11.

## EJEMPLO 8

### HRS-SV11 PROTEGE A LAS NEURONAS A TRAVÉS DE UN MECANISMO NO EXTRACELULAR

El mecanismo exacto de neurotoxicidad de 6-OHDA no se entiende claramente, pero hay más indicios a favor de un mecanismo extracelular, en lugar de uno intracelular (véase Blum y col., 2000; Izumi y col., 2005; Hanrott y col., 2006). 6-OHDA, en el espacio extracelular, se auto-oxida a p-quinona y especies de oxígeno reactivo, tales como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Para examinar si HRS-SV11, como otros antioxidantes, protege a las células PC12 a través de la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y p-quinona en el espacio extracelular, se usó un sistema libre de células para medir la acumulación de p-quinona en presencia o ausencia de HRS-SV11 aprovechándose de una propiedad de p-quinona de que p-quinona tiene una única absorbancia a 490 nm.

Tal como se muestra en la figura 11A, 6-OHDA se auto-oxidó en un tubo de ensayo con el tiempo y dio una acumulación de p-quinona. La adición de HRS-SV11 no redujo la cantidad de p-quinona generada, mientras que la vitamina C, un antioxidante conocido, bloqueó eficazmente la producción de p-quinona. Este resultado indica que HRS-SV11 no previene la neurotoxicidad de 6-OHDA bloqueando directamente la generación de p-quinona en el espacio extracelular, sino que en su lugar utiliza otro mecanismo.

También se ensayó si HRS-SV11 bloquea la muerte neuronal inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es otro producto de oxidación fundamental de 6-OHDA, y se ha demostrado que la muerte de células PC12 inducida por 6-OHDA es bloqueada por catalasa, de la forma más probable hidrolizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (véase Hanrott y col., 2006). Tal como se muestra en la figura 11B, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducía muerte de neuronas corticales de manera dependiente de la dosis, con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 120 mM. Sin embargo, el pretratamiento de neuronas corticales con HRS-SV11 (de 1 nM hasta 1 μM) no promovió la supervivencia neuronal en comparación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (120 mM) en solitario (figura 11C). Este resultado sugiere que HRS-SV11 no prevenía ni reducía la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el espacio extracelular, o no interfería en la ruta de muerte intracelular iniciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La mayoría de los antioxidantes son eficaces cuando se aplican conjuntamente con un oxidante. Por ejemplo, el glutatión suprime la toxicidad de p-quinona y la catalasa bloquea la toxicidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para confirmar resultados anteriores en vista de este fenómeno, se aplicó HRS-SV11 simultáneamente con 6-OHDA. Tal como se muestra en la figura 11D, la co-aplicación de HRS-SV11 con 6-OHDA no mostró ningún efecto de rescate tanto en neuronas corticales como en células PC12.

También se realizó un experimento de lavado; antes de la aplicación de 6-OHDA, las neuronas se lavaron con PBS y se refrescaron con medio de cultivo para eliminar cualquier HRS-SV11 restante después de la pre-incubación con HRS-SV11. Este régimen se reduce la posibilidad de cualquier interferencia directa con 6-OHDA. Tal como se muestra en la figura 11E, el lavado no afectó a la función protectora del HRS-SV11. Tomados en conjunto, estos datos sostuvieron fuertemente que HRS-SV11 ejerce protección neuronal a través de un mecanismo de señalización alternativo, en lugar de mediante la reducción de 6-OHDA o sus productos oxidados de forma extracelular.

#### EJEMPLO 9

##### HRS-SV11 SUPRIME LA APOPTOSIS INDUCIDA POR 6-OHDA DE CÉLULAS PC12

La apoptosis ha sido sugerida como causa principal de la toxicidad de 6-OHDA (véase Choi y col., 1999; Blum y col., 2001). La fragmentación y la condensación nuclear es una marca distintiva de apoptosis tardía. Se usó Hoechst 33342 para teñir e identificar células apoptóticas después de la exposición a 6-OHDA en presencia o ausencia de HRS-SV11. Tal como se muestra en la figura 12, aproximadamente el 20% de células PC12 sufrieron apoptosis después de 8 h de exposición a 6-OHDA 200 μM, como se discriminó por tinción con Hoechst. El pretratamiento con HRS-SV11 (a 1000 nM) redujo en gran medida la parte de células apoptóticas (véase la figura 12D para los recuentos de células apoptóticas). Este resultado sugiere que HRS-SV11 protegida células PC12 a través de la supresión de la apoptosis inducida por 6-OHDA.

#### EJEMPLO 10

##### LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA CONTRIBUYEN A LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DE HRS-SV11

HRS-SV11 contiene tres cisteínas (Cys): Cys117, 169 y 171. Cys169 es el tercer aminoácido empezando por el final y Cys171 es el último aminoácido (véase la figura 13A). Cys169 y Cys 171 fueron modificadas para conseguir una población de monómeros homogénea de HRS-SV11 para estudios estructurales. Se fabricaron dos mutantes, (1) HRS-SV11\_delC y (2) HRS-SV11\_C2S.

La variante HRS-SV11\_delC (denominada delC) tiene los tres últimos aminoácidos (incluyendo Cys169 y Cys171) en HRS-SV11 delecionados. La variante HRS-SV11\_C2S (denominada C2S) tiene Cys169 y Cys171 mutados a residuos de serina (Ser).

Se llevó a cabo cromatografía por filtración en gel analítica en las proteínas usando un sistema AKTA FPLC (GE Healthcare). Las muestras de proteína se cargaron en una columna de Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, y DTT 1 mM. Como se analiza por filtración en gel analítica (véase la figura 13B), HRS-SV11\_C2S tenía un pico, que corresponde a la forma de monómero, y HRS-SV11\_delC tenía dos picos, uno grande correspondiente a monómero y una pequeña correspondiente al dímero. Cys 177 también se modificó a Ser (la variante C117S), y la figura 13 muestra que esta mutación fija HRS-SV11 en forma de dímero. El HRS-SV11 de tipo silvestre estaba en una forma entre dímero y monómero, lo que sugiere que la proteína HRS-SV11 conmutada dinámicamente entre dímero y monómero.

Los mutantes de HRS-SV11 también se ensayaron en el modelo de muerte de células PC12 inducida por 6-OHDA. Tal como se muestra en la figura 13C, los mutantes C2S y delC perdieron la función protectora observada con la proteína HRS-SV11 de tipo silvestre, lo que indica la importancia de estas dos cisteínas para la neuroprotección de HRS-SV11.

#### EJEMPLO 11

##### HRS-SV11 EJERCE NEUROPROTECCIÓN A TRAVÉS DE JAK2, JNK Y P38

10 Para explorar la ruta de señalización neuroprotectora de HRS-SV11, se usaron una serie de inhibidores químicos específicos para interferir con las moléculas de señalización específicas. Los resultados se muestran en la figura 14. A partir de un panel de inhibidores, se descubrió que la inhibición de JAK2 (por AG490 a 40  $\mu$ M), JNK y p38 juntos (por SB202190 a 10  $\mu$ M y SP600125 a 10  $\mu$ M), suprimía el efecto protector de HRS-SV11, mientras que la inhibición de la fosfolipasa C (PLC) por U73122, o MKK por arctigenina, o JNK o p38 en solitario, no tuvo ningún efecto sobre las células PC12. Estos resultados sugieren la implicación de JAK2, JNK y p38 en la señalización de HRS-SV11.

#### EJEMPLO 12

##### 20 HRS-SV11 SE UNE A CCR5

Para comprender mejor la neuroprotección de HRS-SV11, se identificaron receptores afines potenciales sobre la superficie celular. Un fragmento artificial que contenía los aminoácidos 1-48 de HRS (1-48 a.a.), así como proteína HRS de tipo silvestre, inducía la migración de células HEK293T que expresan CCR5, pero un mutante por delección sin los a.a. 1-48 no lo hizo (Howard y *col.*, 2002). Dado que HRS-SV11 contiene los a.a.1-48 de HRS de tipo silvestre, se ensayó CCR5 como un receptor candidato para HRS-SV11.

Se amplificó y se clonó CCR5 humano un vector pEGFP-N1 vector. El receptor CCR1 humano, también un receptor de quimioquinas CC, se incluyó como control. Se transfectaron células HEK293T con plásmidos CCR5-EGFP o CCR1-EGFP y 1d después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se separan de placa de cultivo mediante tripsina. Se colocaron  $1 \times 10^6$  células en un tubo de FACS en 100  $\mu$ l de medios completos y se mantuvieron en hielo (las células se mantuvieron en frío durante el resto del ensayo). Las células se trataron con proteína de HRS-SV11 recombinante durante 45'. A continuación, las células se lavaron una vez con 1 ml de tampón de tinción (PBS 1X + FBS al 3%) y se centrifugaron a 4°C, 400 x g durante 10'. Después del lavado, las células se incubaron con 0,3  $\mu$ l de anticuerpo anti-V5-FITC primario (3  $\mu$ g/ml) en 100  $\mu$ l de tampón de tinción durante 30' en la oscuridad (mantenido en la oscuridad durante el resto del ensayo). A continuación, las células se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de tinción, 4°C, 400 x g durante 10' y se centrifugaron. Después del lavado final, los sedimentos celulares se resuspendieron en 800  $\mu$ l de tampón de tinción y se analizaron inmediatamente por FACS.

40 Tanto CCR5-EGFP como proteína CCR1-EGFP se localizaban correctamente en la membrana celular cuando se transfectan en células HEK293T tal como se esperaba (datos no mostrados). Mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), se descubrió que la aplicación de proteína HRS-SV11 recombinante a las células HEK293T que expresan CCR5 aumentaba la unión superficial de anticuerpo marcado con His como se refleja por un desplazamiento a la derecha de la curva (figura 15B), pero no produjo ningún desplazamiento en las células que expresan CCR1 (figura 15D), lo que sugiere que CCR5 es un receptor potencial de HRS-SV11. Tal como se muestra en la figura 15C, este desplazamiento no se vio afectado por el pretratamiento de las células HEK293T que expresan CCR5 con Met-RANTES, un agonista de CCR5. Dado que Met-RANTES se une al extremo N del receptor CCR5, estos datos sugieren que el extremo N de CCR5 no está implicado en la unión de HRS-SV11 a CCR5.

#### 50 EJEMPLO 13

##### IDENTIFICACIÓN DE UNA VARIANTE DE SPLICING ALTERNATIVA, HRS-SV14, DEL GEN DE HISTIDIL-TARN SINTETASA (HRS) HUMANA

55 En este experimento, otra variante de splicing del gen de HRS, llamada HRS-SV14, se identificó a partir del cerebro fetal humano mediante PCR anidada (véase la figura 16A, flecha). Para configurar la primera reacción de PCR, se generó una mezcla de reacción de 10  $\mu$ l que contenía 1  $\mu$ l de primera cadena de cADN, 1X de tampón Advantage 2 PCR (Clontech), 200  $\mu$ M de cada dNTP (Ambion), 250 pM de cada uno de los cebadores directos e inversos (IDT oligo), y 1,25X de Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Los cebadores para la primera PCR fueron hsH1-E2F1 (5'-TGA AAC TGA AGG CAC AGC TG-3') (SEQ ID NO:12) y hsH1-E13R1 (5'-TCT TCT CTT CGG ACA TCC AC-3') (SEQ ID NO:13). Las condiciones de termociclado para la primera PCR fueron 1 minuto a 95°C seguido por 20 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C, una extensión final de 5 minutos a 72°C. La

configuración de PCR y las condiciones de termociclado para PCR anidada fueron las mismas que las de la primera PCR, excepto que, en la PCR anidada, la plantilla es producto de la primera PCR diluido 1000 veces, y los cebadores son rnH1-E02F1 (5'-AAC AGA AGT TCG TCC TCA AAA C-3') (SEQ ID NO:14) y rnH1-E12J13R2(5'- TCC ACC TCT TCT CTG CTC GTC A-3') (SEQ ID NO:15). Los productos de PCR anidada se resolvieron mediante electroforesis. Se

5 aislaron distintos productos de PCR y se purificaron mediante el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Los productos de PCR aislados se clonaron usando el kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen). Se obtuvieron y se secuenciaron plásmidos con productos de PCR insertados con éxito. Para identificar acontecimientos de splicing alternativos, se alinearon secuencias de productos de PCR con la secuencia de mRNA de HARS humano en la base de datos NCBI (Número de entrada: NM\_002109).

10

El alineamiento de secuencias mostró que el transcrito HRS-SV14 tiene una delección de 894 pb, desde el Exón 4 al Exón 10 del de HRS humana (figura 16B), lo que hace que la proteína HRS-SV14 carezca de los aminoácidos 101-398 a.a. de la proteína HRS de tipo silvestre, tal como se muestra en la figura 16C. HRS-SV14 es similar a HRS-SV11, excepto que conserva el Exón 3, que se traduce en 40 a.a. del dominio de aminoacilación.

15

A continuación, se produjo la proteína HRS-SV14 recombinante y se ensayó para efectos neuroprotectores en el modelo de muerte de células PC12 inducida por 6-OHDA. Tal como se muestra en la figura 16D, el pretratamiento de células PC12 con HRS-SV14 500 nM durante 24 horas redujo significativamente la muerte de células PC12 tras la exposición a 6-OHDA, y el nivel de neuroprotección fue comparable al de HRS-SV11.

20

#### **EJEMPLO 14**

##### **LA VARIANTE DE SPLICING DE HISTIDIL-TARN SINTETASA, SV9, INHIBE LA MIGRACIÓN DE THP-1**

25 Para caracterizar las propiedades de SV9, una variante de splicing de la histidil-tARN sintetasa (aminoácidos 1-60), se configuró un ensayo de migración basándose en una publicación anterior que sugería propiedades quimioatrayentes tanto para la histidil-tARN sintetasa longitud completa como para un fragmento de la misma (aminoácidos 1-48) [Howard y col. (2002), J. Exp. Med., 196:781-791].

30 Células THP-1 (ATCC, N° de catálogo TIB-202) se cultivaron en medio RPMI-1640 (ATCC, N° de catálogo 30-2001) suplementado con FBS termoinactivado al 10% (Invitrogen, N° de catálogo 10082147) y 2-β-mercaptoetanol 0,05 mM. La densidad celular se mantuvo a 2-4 x 10<sup>5</sup> células/ml. Antes del ensayo de migración, se recogieron células THP-1 mediante centrifugado, se ajustaron a una densidad de 6 x 10<sup>5</sup> células/ml y se les privó de alimento durante 45 minutos en tampón de migración (medio RPMI-1640 con BSAal 0,1%) que contenía 6 µg/ml de Calcein AM (Invitrogen, N° de

35 catálogo C3099). A mismo tiempo, se añadió SV9 (o PBS como control) a las células a diferentes concentraciones finales. Se añadieron 100 µl de células (que contenían 6 x 10<sup>5</sup> células) pretratadas con SV9 a la cámara superior del aparato de migración. Se añadieron 600 µl de tampón de migración que contenía CCL-5 o tampón PBS a la cámara inferior y se dejó migrar a las células durante 2 horas. Las células que migraron a la cámara inferior se recogieron y se resuspendieron en 100 µl de PBS, se transfirieron a una placa Greiner opaca de 384 pocillos y se leyó la fluorescencia en un lector de placas.

40

Tal como se muestra en la figura 19, SV9 inhibía inesperadamente la migración de células THP-1 a otros ligandos tales como CCL-5.

#### **EJEMPLO 15**

##### **LA VARIANTE DE SPLICING DE HISTIDIL-TARN SINTETASA, SV9, INHIBE LA MIGRACIÓN DE THP-1 MEDIADA POR CCR-1**

50 Para caracterizar adicionalmente las propiedades de SV9, se usó el ensayo de migración para determinar a qué receptor se acopla SV9 para inhibir la migración de células THP-1, dado que CCL-5 puede acoplarse potencialmente a tres receptores, CCR1, CCR3 y CCR5.

Células THP-1 (ATCC, N° de catálogo TIB-202) se cultivaron en medio RPMI-1640 (ATCC, N° de catálogo 30-2001) suplementado con FBS termoinactivado al 10% (Invitrogen, N° de catálogo 10082147) y 2-β-mercaptoetanol 0,05 mM. La densidad celular se mantuvo a 2-4 x 10<sup>5</sup> células/ml. Antes del ensayo de migración, se recogieron células THP-1 mediante centrifugado, se ajustaron a una densidad de 6 x 10<sup>5</sup> células/ml y se les privó de alimento durante 45 minutos en tampón de migración (medio RPMI-1640 con BSAal 0,1%) que contenía 6 µg/ml de Calcein AM (Invitrogen, N° de catálogo C3099). A mismo tiempo, se añadió SV9 (o PBS como control) a las células a diferentes concentraciones

60

60 finales. Se añadieron 100 µl de células (que contenían 6 x 10<sup>5</sup> células) pretratadas con SV9 a la cámara superior del aparato de migración. Se añadieron 600 µl de tampón de migración que contenía CCL-23, un ligando cuya única reactividad conocida es hacia CCR-1, o tampón PBS a la cámara inferior y se dejó migrar a las células durante 2

horas. Las células que migraron a la cámara inferior se recogieron y se resuspendieron en 100 µl de PBS, se transfirieron a una placa Greiner opaca de 384 pocillos y se leyó la fluorescencia en un lector de placas.

La figura 20 muestra que SV9 inhibe la migración de células THP-1 a CCL-23, y, por lo tanto, probablemente inactiva la ruta del receptor CCR1.

#### **EJEMPLO 16**

##### **LA VARIANTE DE SPLICING DE HISTIDIL-TARN SINTETASA, SV9, ACTIVA LOS RECEPTORES DE TIPO TOLL**

10

Descubrimientos previos [Parker y col. (2004), J. Immunol., 172:4977-4986] sugerían que la activación de un receptor de tipo Toll puede regular negativamente CCR1. Se usó un ensayo reportero basado en células para determinar si SV9 también puede activar receptores de tipo Toll.

15 Células RAW-Blue™ (InvivoGen, raw-sp) que expresan diversos receptores de tipo Toll se mantuvieron en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% con 1 x medio HEK-Blue™ Selection (InvivoGen, hb-sel). El día del ensayo, el medio se retiró y las células se aclararon dos veces con PBS. Las células se tripsinizaron o rasparon y se resuspendieron en medio de cultivo fresco para preparar una suspensión celular a aproximadamente 550.000 células/ml. Se añadieron 20 µl de SV9, o controles, a diversas concentraciones a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano que incluye un control negativo, tal como agua libre de endotoxinas. Se añadieron 180 µl de suspensión celular (aproximadamente 100.000 células) por pocillo y la placa se incubó a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% durante 18-24 horas. Al día siguiente, se preparó una solución de QUANTI-Blue™ según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron 160 µl de QUANTI-Blue™ resuspendido a los pocillos de una placa de 96 pocillos, seguido por la adición de 40 µl de sobrenadante de células RAW-Blue™ inducido. La placa se incubó a continuación a 37°C durante 30 minutos hasta 6 horas. Los niveles de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) se determinaron usando un espectrofotómetro a 620-655 nm.

La figura 21 muestra que la proteína SV9 activa los receptores de tipo Toll presentes en la superficie de las células RAW-Blue™, y estimula la producción del reportero SEAP.

30

#### **EJEMPLO 17**

##### **LA VARIANTE DE SPLICING DE HISTIDIL-TARN SINTETASA, SV9, ACTIVA PREFERENTEMENTE EL RECEPTOR 4 DE TIPO TOLL**

35

Para caracterizar adicionalmente a qué receptor de tipo Toll se acopla SV9, se usaron células que expresan solamente TLR-2 o TLR-4 en un ensayo reportero similar.

40 Células 293 que expresaban TLR-2 o TLR-4 (InvivoGen, N° de catálogo hb2-cells) se mantuvieron en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% y 1 x medio HEK-Blue™ Selection (InvivoGen, N° de catálogo hb-sel). El día del ensayo, se añadieron 20 µl de SV9 a diferentes concentraciones, o controles, a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se preparó una suspensión celular de células HEK-Blue™-hTLR2 o TLR4 a 5 x 10<sup>5</sup> células por ml en medio de ensayo (DMEM, FBS termoinactivado al 10%). Se añadieron 90 µl de suspensión celular (aproximadamente 50.000 células) por pocillo y la placa se incubó a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 20-24 horas. Al día siguiente, se preparó una solución de QUANTI-Blue™ según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron 180 µl de QUANTI-Blue™ resuspendido (InvivoGen: N° de catálogo rep-qb1) a los pocillos de una placa de 96 pocillos, seguido por la adición de 20 µl de sobrenadante de células HEK-Blue™-hTLR2 o TLR4 inducido. La placa se incubó a continuación a 37°C durante 1-3 horas. Los niveles de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) se determinaron usando un espectrofotómetro a 650 nm.

50

La figura 22 muestra que la proteína SV9 activa tanto TLR2 (22A) como TLR4 (22B) pero es significativamente más potente sobre TLR4.

#### **EJEMPLO 18**

55

##### **LA VARIANTE DE SPLICING DE HISTIDIL-TARN SINTETASA, SV9, ESTIMULA LA SECRECIÓN DE MIP-1-ALFA**

La activación del receptor de tipo Toll ha demostrado dar como resultado la secreción de MIP-1α que, a su vez, podría desencadenar la regulación negativa de CCR1 [Parker y col. (2004), J. Immunol., 172:4977-4986]. Se usó un ensayo ELISA para determinar si el acoplamiento a SV9 de TLR-2 y/o TLR-4 da como resultado secreción de MIP-1α.

60

Células THP-1 (ATCC, N° de catálogo TIB-202) se cultivaron en medio RPMI-1640 (ATCC, N° de catálogo 30-2001)

suplementado con FBS termoinactivado al 10% (Invitrogen, N° de catálogo 10082147) y 2-β-mercaptoetanol 0,05 mM.

Las células se sembraron a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup>/ml en una placa de 24 pocillos y se añadió SV9 o LPS a diferentes concentraciones a cada pocillo. Después de 24 horas de incubación, el sobrenadante se recogió de cada pocillo mediante centrifugado a 250 g y retirada del sobrenadante. Los niveles de expresión de MIP-1α a partir de cada muestra se determinaron usando un kit Quantikine de inmunoensayo de CCL3/MIP-1α humano (R&D, N° de catálogo DMA00) según las instrucciones del fabricante.

La figura 23 muestra que SV9 estimula la secreción de MIP-1α con una cinética distinta de LPS.

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> aTyr Pharma Inc. Zhou, Jie Fun, Lau Ching Xu, Zhiwen Lo, Wing Sze Piehl, Kristi Helen Greene, Leslie Ann

15 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS QUE COMPRENDEN VARIANTES DE SPLICING DE HISTIDIL-TARN SINTETASA QUE TIENEN ACTIVIDADES BIOLÓGICAS NO CANÓNICAS

<130> 120161.415PC

20 <140> PCT

<141> 16/03/2010

<160> 29

25

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

30 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador

40 <400> 1

agtgacagc cgggatggca gagc 24

<210> 2

45

<211> 21

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

55

<400> 2

caggaagtcg cctatctgaa g 21

60 <210> 3

<211> 1981

ES 2 742 251 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

```

tcgatagccg gaagtcaccc ttgctgaggc tggggcaacc accgcaggtc gagacagcag 60
gcggctcaag tggacagccg ggatggcaga gcgtgoggcg ctggaggagc tggtgaaact 120
tcaggagagag cgcgtgagag gcctcaagca gcagaaggcc agcgccgagc tgatcgagga 180
ggaggtggcg aaactcctga aactgaaggc acagctgggt cctgatgaaa gcaaacagaa 240
atthgtgctc aaaaccccca agggcacaag agactatagt ccccggcaga tggcagttcg 300
cgagaagggtg tttgacgtaa tcatccgttg cttcaagcgc cacgggtcag aagtattga 360
tacacctgta tttgaactaa aggaaacact gatgggaaag tatggggaag actccaagct 420
tatctatgac ctgaaggacc agggcgggga gctcctgtcc cttcgctatg acctcactgt 480
tccttttgct cggatatttg caatgaataa actgaccaac attaaacgct accacatagc 540
aaaggtatat cggcgggata acccagccat gaccggtggc cgataccggg aattctacca 600
gtgtgatttt gacattgctg ggaactttga tcccatgatc cctgatgcag agtgcctgaa 660

```

```

gatcatgtgc gagatcctga gttcacttca gataggcgac ttcctgggtca aggtaaacga 720
tcgacgcatt ctagatggga tgtttgctat ctgtgggtgt tctgacagca agttccgtac 780
catctgctcc tcagtagaca agctggacaa ggtgtcctgg gaagagggtga agaattgagat 840
ggtgggagag aagggccttg cacctgaggt ggctgaccgc attggggact atgtccagca 900
acatggtggg gtatccctgg tggacagct gctccaggat cctaaactat cccaaaacaa 960
gcaggccttg gagggcctgg gagacctgaa gttgctcttt gagtacctga ccctatttgg 1020
cattgatgac aaaatctcct ttgacctgag ccttgctcga gggctggatt actacactgg 1080
ggtgatctat gaggcagtgc tgctacagac cccagcccag gcaggggaag agcccctggg 1140
tgtgggcagt gtggctgctg gaggacgcta tgatgggcta gtgggcatgt tcgaccccaa 1200
agggcgcaag gtgccatgtg tggggctcag cattggggtg gagcggattt tctccatcgt 1260
ggaacagaga ctagaggctt tggaggagaa gatacggacc acggagacac aggtgcttgt 1320
ggcatctgca cagaagaagc tgctagagga aagactaaag cttgtctcag aactgtggga 1380
tgctgggatc aaggctgagc tgctgtacaa gaagaacca aagctactga accagttaca 1440
gtactgtgag gaggcaggca tcccactggt ggctatcatc ggcgagcagg aactcaagga 1500
tggggtcatc aagctccgtt cagtacgag cagggaaagag gtggatgtcc gaagagaaga 1560
ccttgtggag gaaatcaaaa ggagaacagg ccagcccctc tgcatctgct gaactgaaca 1620
aactatcaga ggaaggaag tgggactggc actatttgag gttaaagaaa actgcatatg 1680
tacttcaatt gctttgcaact tttccgtttc agcggaaagac ctgaagagtg gtcagaacag 1740
agcctttgat ttttattatg gttattttat tgattattac tggcaaaaac ggccaggtac 1800
aacacctttt tcatacaagg cccaggaggc ttagtccagt ctgtgctcct gggctacaag 1860
gaccagcct gagatggtcc catctgcagg gccccgcacc agttggagca gatgcctccc 1920
caccaccaat tgccaaaggt ccaataaaat gcctcaacca cggaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
a

```

10

<210> 4

<211> 509

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 4

ES 2 742 251 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu  
1 5 10 15  
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu  
20 25 30  
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp  
35 40 45  
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp  
50 55 60  
Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile  
65 70 75 80  
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val  
85 90 95  
Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys  
100 105 110  
Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg  
115 120 125  
Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu  
130 135 140  
Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn  
145 150 155 160  
Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe  
165 170 175  
Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu  
180 185 190  
Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu  
195 200 205  
Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys  
210 215 220  
Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys  
225 230 235 240  
Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu  
245 250 255  
Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln  
260 265 270  
Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys  
275 280 285  
Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu  
290 295 300  
Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe  
305 310 315 320  
Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr  
325 330 335  
Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu  
340 345 350  
Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly  
355 360 365  
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile  
370 375 380  
Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu  
385 390 395 400  
Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala  
405 410 415  
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp  
420 425 430  
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu  
435 440 445  
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala  
450 455 460  
Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser  
465 470 475 480  
Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu  
485 490 495  
Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys  
500 505

ES 2 742 251 T3

<211> 183

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

                atggcagagc gtgccggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
                ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
                ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aacagaaat ttgtgctcaa aaccccccaag 180
10              tag                                          183
    
```

<210> 6

<211> 60

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 6

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
          50          55          60
    
```

<210> 7

25

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

35

<400> 7

atagtccag tccacttc 20

40 <210> 8

<211> 516

<212> ADN

45

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 742 251 T3

```

atggcagagc gtgctggcgcct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgctgagc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcatc tgcacagaag 240
aagctgctag aggaaagact aaagcttgtc tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 300
gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 360
ggcatcccac tgggtggctat catcggcgag caggaactca aggatggggt catcaagctc 420
cgttcagtga cgagcagggg agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 480
aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatc tgctga 516

```

<210> 9

5 <211> 171

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 9

```

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

```

15 <210> 10

<211> 636

<212> ADN

20

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

atggcagagc gtgctggcgcct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgctgagc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
ggcacaagag actatagtcc cgggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240

atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcatc tgcacagaag 360
aagctgctag aggaaagact aaagcttgtc tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 420
gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 480
ggcatcccac tgggtggctat catcggcgag caggaactca aggatggggt catcaagctc 540
cgttcagtga cgagcagggg agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 600
aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatc tgctga 636

```

25

ES 2 742 251 T3

<210> 11

<211> 211

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 11

```

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

<210> 12

15

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador hsH1-E2F1

25

<400> 12

tgaaactgaa ggcacagctg 20

30 <210> 13

<211> 20

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

ES 2 742 251 T3

<220>

<223> Secuencia del cebador hsH1-E13R1

5 <400> 13

tcttctcttc ggacatccac 20

<210> 14

10

<211> 22

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador mH1-E02F1

20

<400> 14

aacagaagtt cgtcctcaaa ac 22

25 <210> 15

<211> 22

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia del cebador mHI-E12J13R2

<400> 15

tccacctctt ctctgctcgt ca 22

40

<210> 16

<211> 60

45 <212> PRT

<213> Pongo abelii

<400> 16

50

Asn	Gln	Leu	Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Val	Ala	Ile
1				5					10					15	
Ile	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Glu	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	Val
			20					25					30		
Thr	Ser	Arg	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Arg	Arg	Glu	Asp	Leu	Val	Glu	Glu
		35					40					45			
Ile	Lys	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Ile	Cys				
	50					55					60				

<210> 17

55 <211> 60

ES 2 742 251 T3

<212> PRT

<213> Bos taurus

5

<400> 17

```

Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
 1           5           10           15
Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
           20           25           30
Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
           35           40           45
Ile Lys Arg Arg Thr Ser Gln Pro Leu Cys Ile Cys
      50           55           60
    
```

10 <210> 18

<211> 60

<212> PRT

15

<213> Mus musculus

<400> 18

```

Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
 1           5           10           15
Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
           20           25           30
Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Gln Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
           35           40           45
Ile Arg Arg Arg Thr Asn Gln Pro Leu Ser Ile Cys
      50           55           60
    
```

20

<210> 19

<211> 60

25

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

30 <400> 19

```

Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
 1           5           10           15
Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
           20           25           30
Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
           35           40           45
Ile Arg Arg Arg Thr Asn Gln Pro Leu Tyr Val Cys
      50           55           60
    
```

<210> 20

35

<211> 55

<212> PRT

40 <213> Fugu rubripes

<400> 20

ES 2 742 251 T3

Ser Gln Leu Gln His Cys Glu Glu Ser Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asn Gly Val Val Lys Leu Arg Asn Val  
 20 25 30  
 Ala Thr Arg Asp Glu Val Asp Ile Ser Arg Ala Asp Leu Ile Ala Glu  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Arg Thr Ser Ala  
 50 55

<210> 21

5 <211> 56

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

10

<400> 21

Thr Gln Phe Gln Tyr Ala Glu Glu Arg Arg Ile Pro Leu Ala Ile Val  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Val Lys Leu Arg Asn Val  
 20 25 30  
 Val Thr Arg Asp Glu Gln Thr Ile Lys Leu Asp Gln Leu Ile Thr Ala  
 35 40 45  
 Val Arg Asp Thr Leu Ala Ala Leu  
 50 55

15 <210> 22

<211> 58

<212> PRT

20

<213> *Dictyostelium discoideum*

<400> 22

Ala Gln Leu Asn Thr Ala Asp Glu Ser Asn Ile Pro Leu Ile Ile Ile  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Lys Ser Glu Val Glu Thr Asn Ser Leu Ser Val Lys Thr Met  
 20 25 30  
 His Asp Arg Lys Gln Val Ser Ile Glu Arg Ser Asn Phe Thr Val Lys  
 35 40 45  
 Ile Lys Glu Ile Leu Ser Thr Ile Pro Lys  
 50 55

25

<210> 23

<211> 56

30

<212> PRT

<213> *Oryza sativa* subsp. *japonica*

35 <400> 23

ES 2 742 251 T3

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

<210> 24

5 <211> 53

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 24

aagtcattga tacacctgta ttggaactaa aggaaacact gatgggaaag tat 53

15 <210> 25

<211> 18

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly
1				5					10					15	
Lys	Tyr														

25

<210> 26

<211> 62

30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35 <400> 26

gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag gctttggagg agaagatacg gaccacggag 60  
ac 62

<210> 27

40

<211> 49

<212> ADN

45 <213> Homo sapiens

<400> 27

ggaacagaga ctagaggctt tggaggagaa gatacggacc acggagaca 49

50

<210> 28

<211> 16

ES 2 742 251 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 28

Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr  
 1 5 10 15

10 <210> 29

<211> 60

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

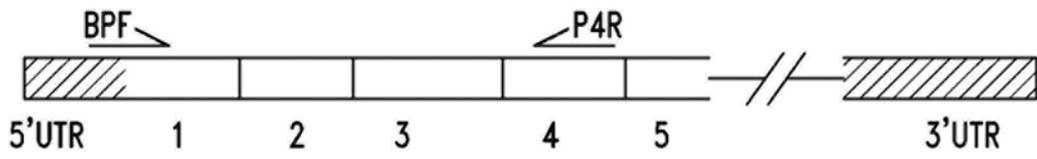
<400> 29

Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val  
 20 25 30  
 Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu  
 35 40 45  
 Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys  
 50 55 60

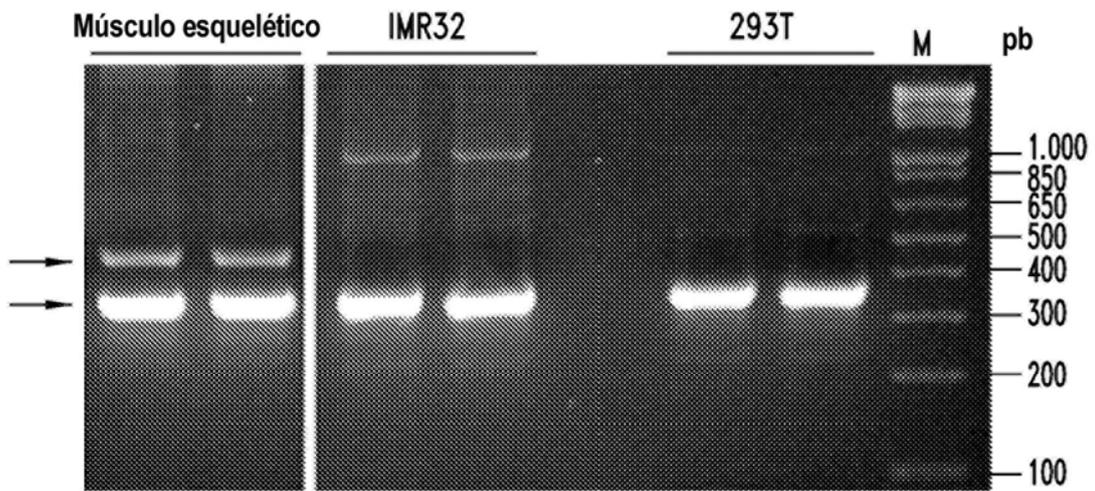
20

**REIVINDICACIONES**

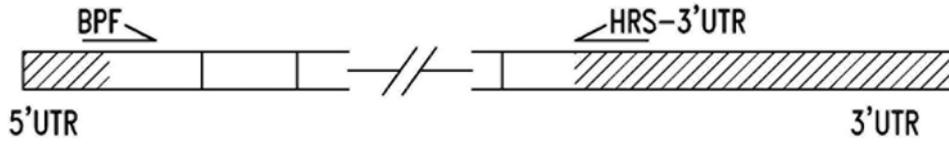
1. Una composición para uso en el tratamiento del cáncer que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo que exhibe especificidad de unión para un polipéptido variante de splicing de histidil-tARN sintetasa (HRS) que consiste en una secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6, 9, y 11, o en un fragmento de SEQ ID NO:6, 9, y 11, y donde anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo antagoniza una actividad no canónica del polipéptido variante de splicing HRS.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, donde el fragmento de SEQ ID NO:6, 9, o 11 consiste en el dominio WHEP de HRS.
3. La composición para uso según la reivindicación 1, donde el fragmento de SEQ ID NO:9 o 11 consiste en el dominio de unión anticodón de HRS.
4. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo es un anticuerpo monoclonal.
5. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
6. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo es un fragmento Fv o un polipéptido Fv de cadena sencilla (sFv).
7. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la composición es una solución estéril inyectable.
8. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la composición es adecuada para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal.



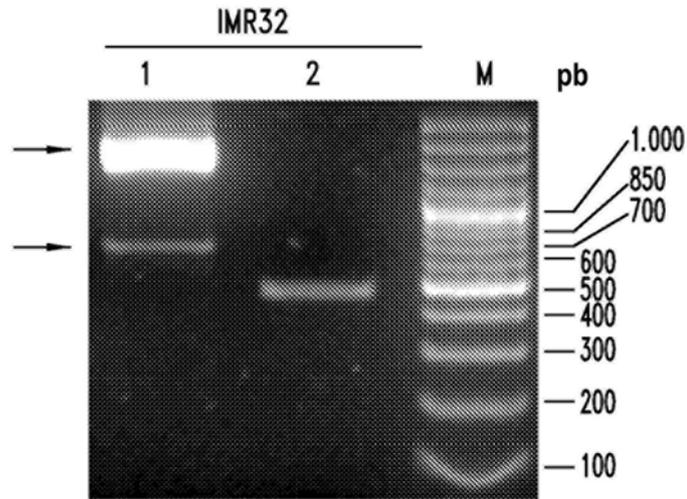
*FIG. 1A*



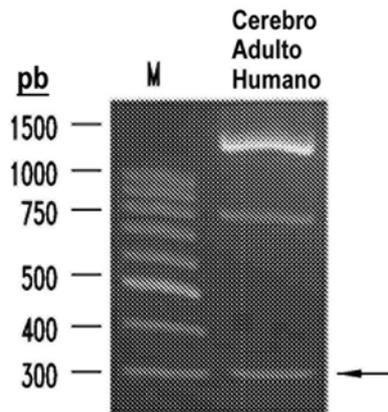
*FIG. 1B*



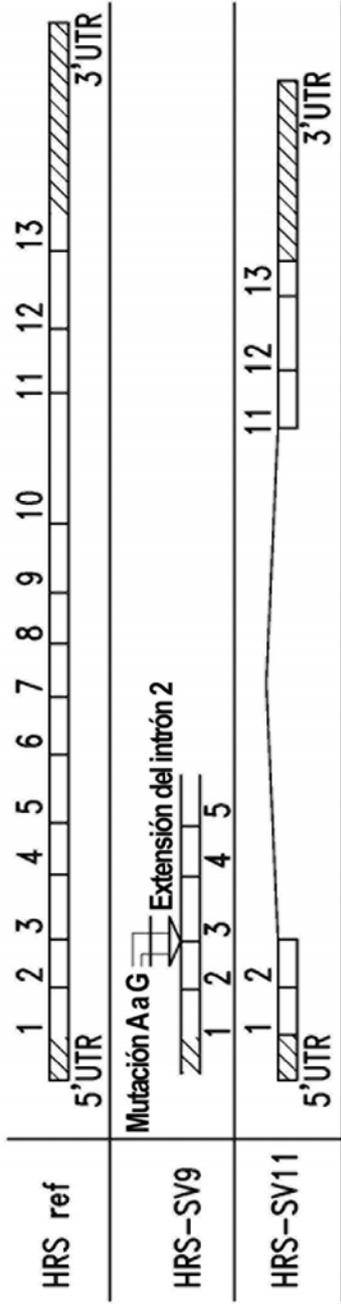
*FIG. 2A*



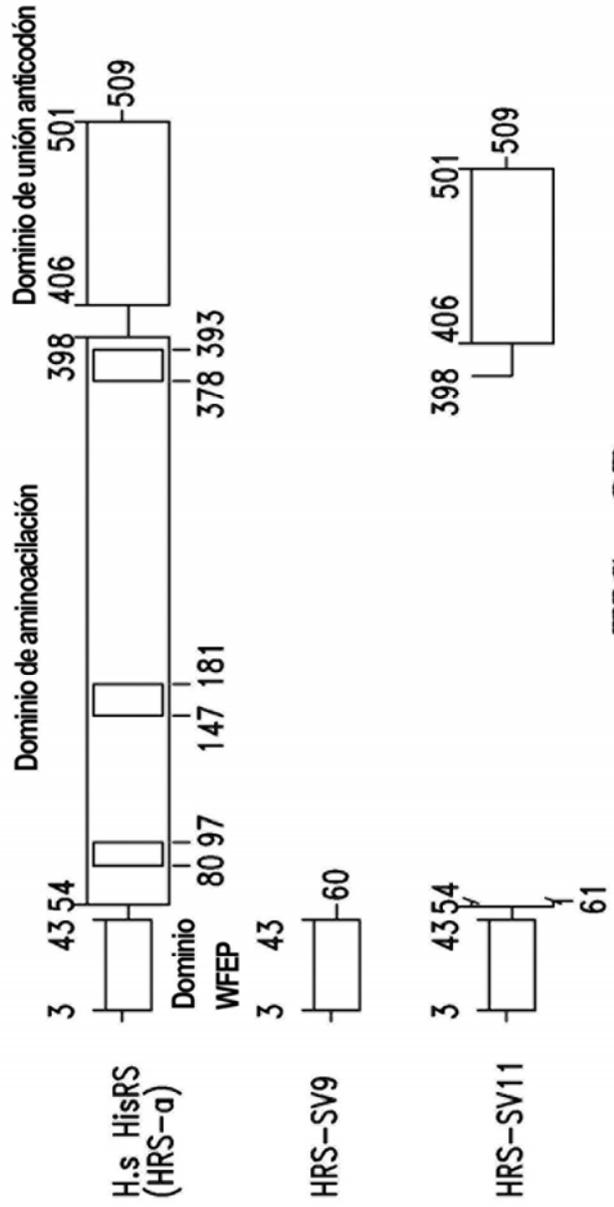
*FIG. 2B*



*FIG. 2C*



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

HRS-SV9:

1ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGA  
AGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTTGATGA  
AAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAACCCCAAGTAG<sup>183</sup>

HRS-SV11:

1ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTC  
AAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAG  
GCACAGCTGGGTCTTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAACCCCAAGGCCTTTGGAGG  
AGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGG  
AAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAAGTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAA  
GAACCCAAAGCTACTGAACAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCCTGGTGGCTATC  
ATCGGCGAGCAGGAAGTCAAGGATGGGGTCAATCAAGCTCCGTTTCAGTGACGAGCAGGGAAGAG  
GTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTGC  
ATCTGCTGA<sup>516</sup>

HRS-SV14:

1ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGA  
AGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTTGATGA  
AAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGGC  
AGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCAATTGATACACCTGTA<sup>1</sup>TTGAA  
CTFAAAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGETGC  
TAGAGGAAAGACTAAAAGCTTGTCTCAGAAGTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAA  
CCCAAAGCTACTGAACAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCCTGGTGGCTATCATCGGCGAGCAGG  
AACTCAAGGATGGGGTCAATCAAGCTCCGTTTCAGTGACGAGCAGGGAAGAGCTGGATGTCCGAAGAGAAGACCT  
TGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTGCATCTGCTGA<sup>636</sup>

*FIG. 3C*

HRS-SV9:

1MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQKASAEIIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKQFVLKTPK<sup>90</sup>

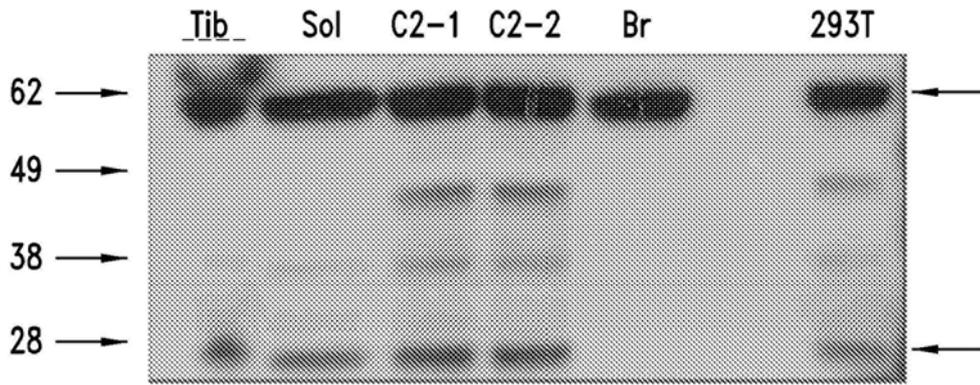
HRS-SV11:

1MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQKASAEIIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKQFVLKTPKALEEKIRTTETQVLVAS  
AQKLLLEERLKLVSSELWDAGIKAEILLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIHGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRRDL  
VVEIKRRTGQPLCIC<sup>171</sup>

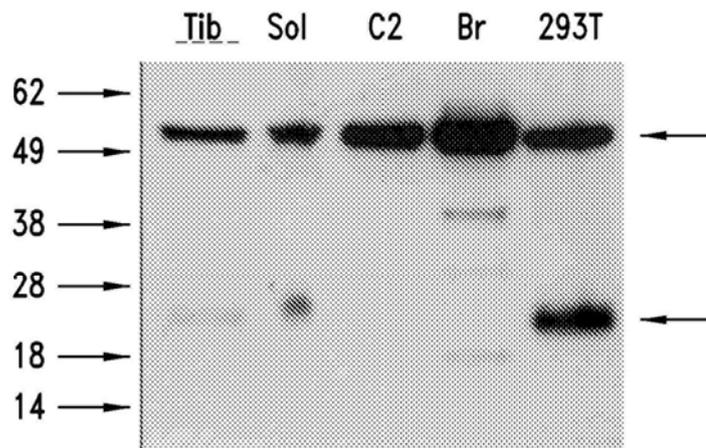
HRS-SV14:

1MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQKASAEIIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKQFVLKTPKGTDRDYSFRQMAVREKV  
FDVIIHRCFKRHGAIEVIDTPVPELKALEEKIRTTETQVLVASAQKLLLEERLKLVSSELWDAGIKAEILLYKKNPKLLNQLQ  
YCEEAGIPLVAIHGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRRDLVVEIKRRTGQPLCIC<sup>212</sup>

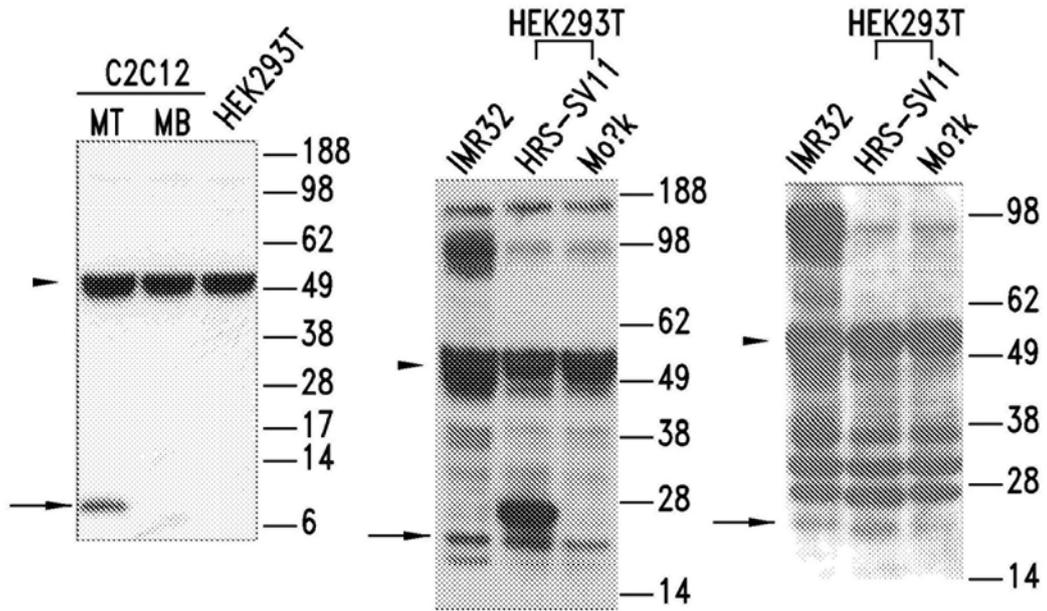
*FIG. 3D*



*FIG. 4A*



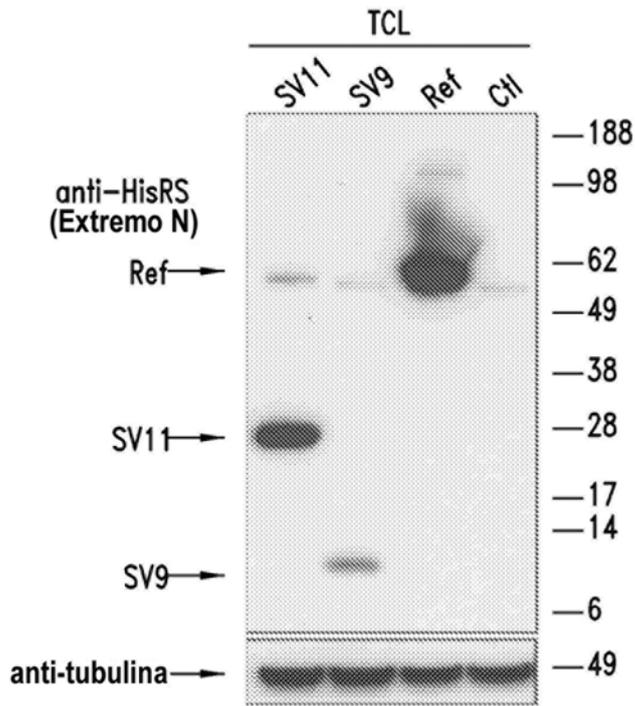
*FIG. 4B*



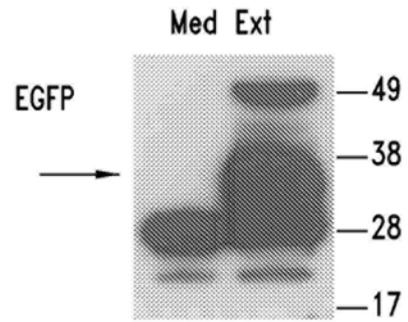
*FIG. 5A*

*FIG. 5B*

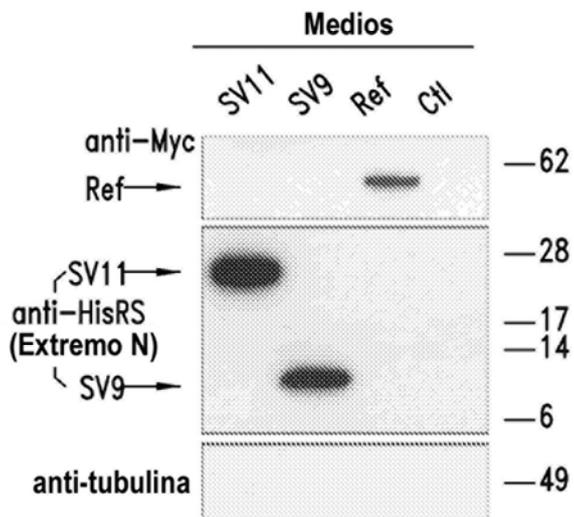
*FIG. 5C*



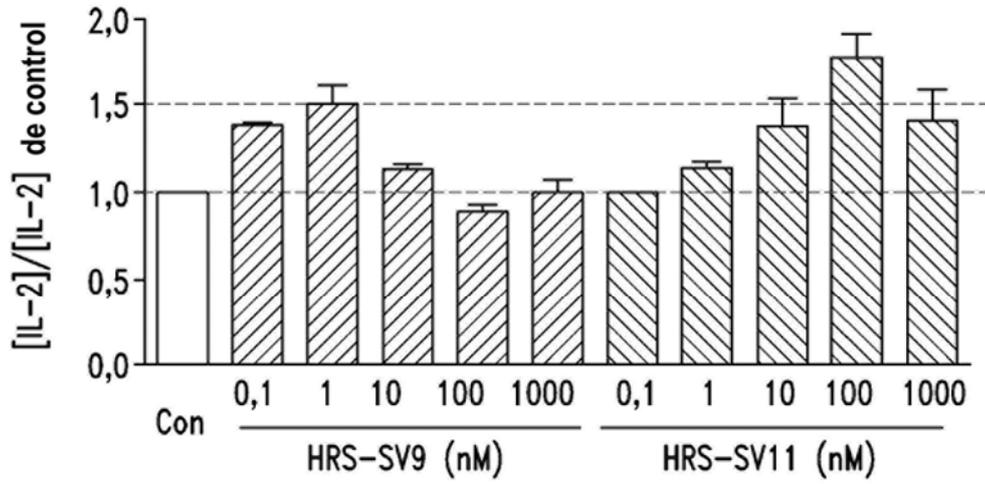
*FIG. 6A*



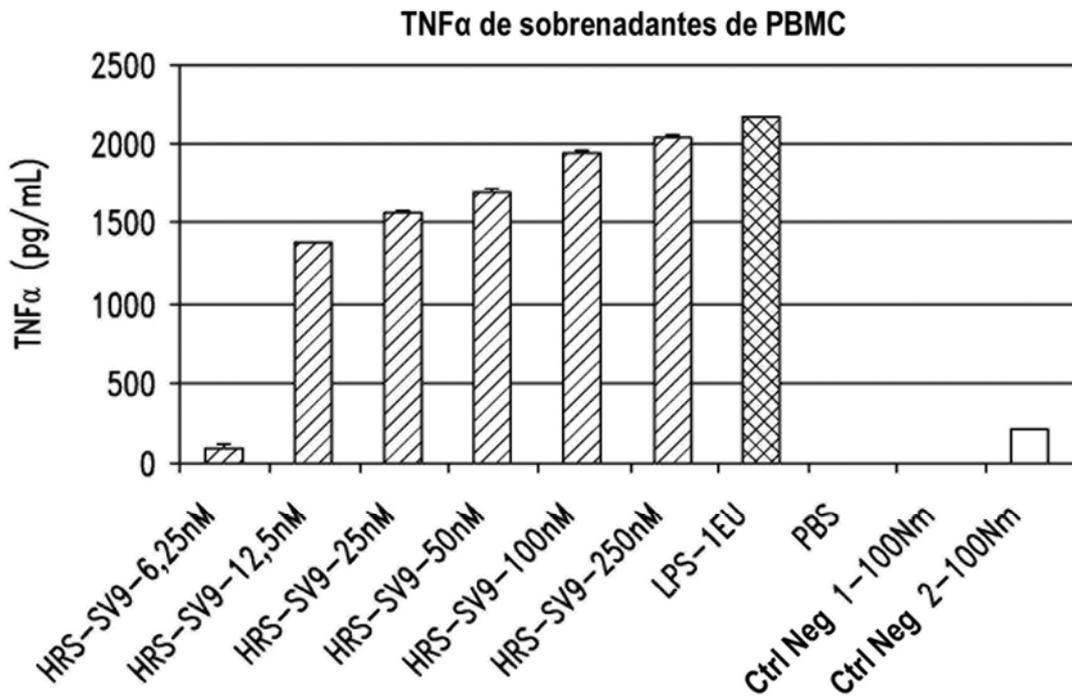
*FIG. 6C*



*FIG. 6B*



*FIG. 7*



*FIG. 8*

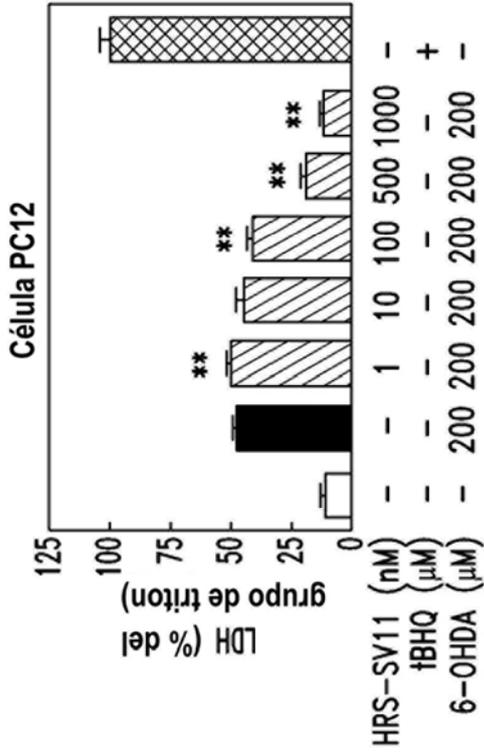


FIG. 9C

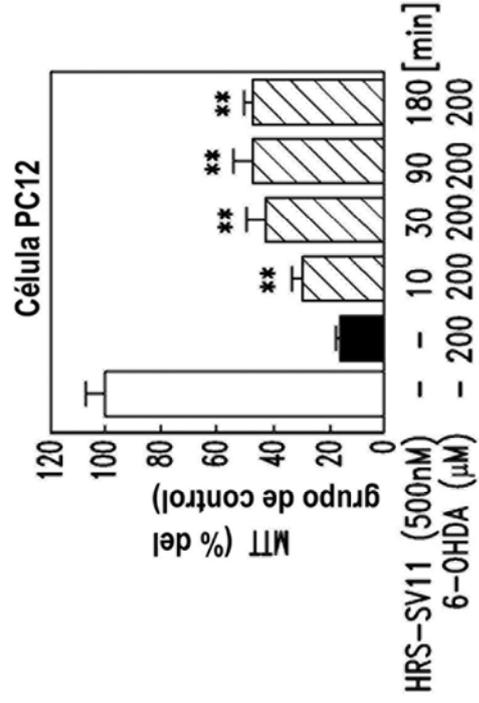


FIG. 9D

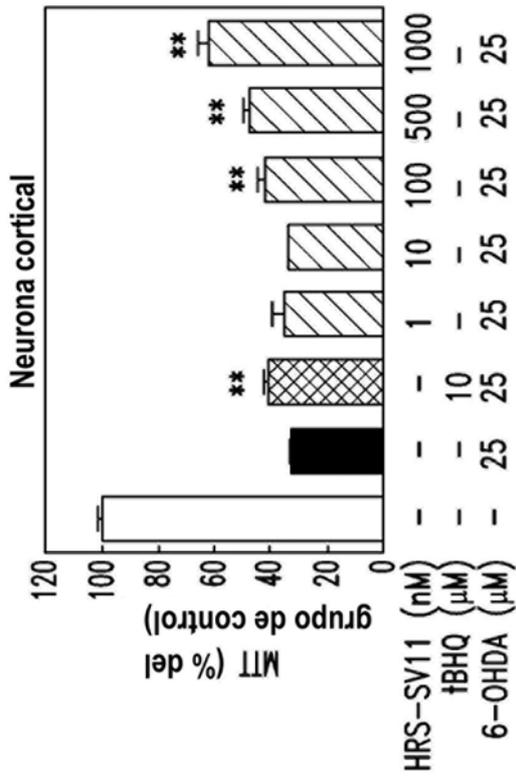


FIG. 9A

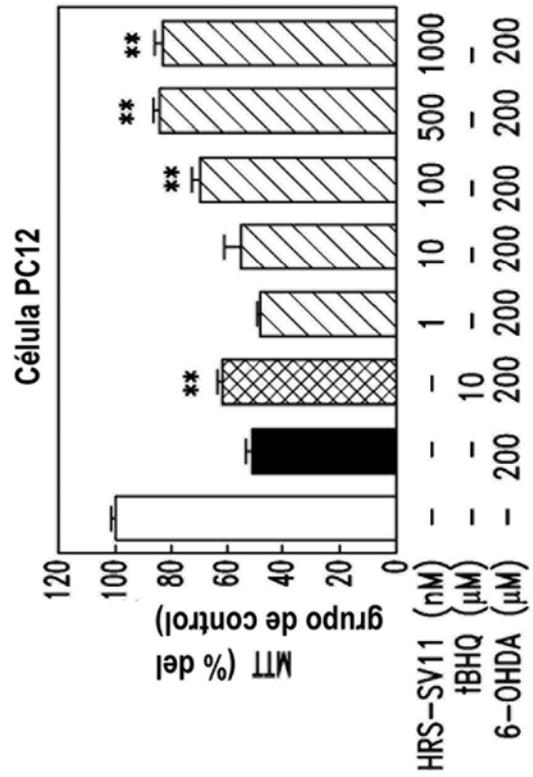


FIG. 9B

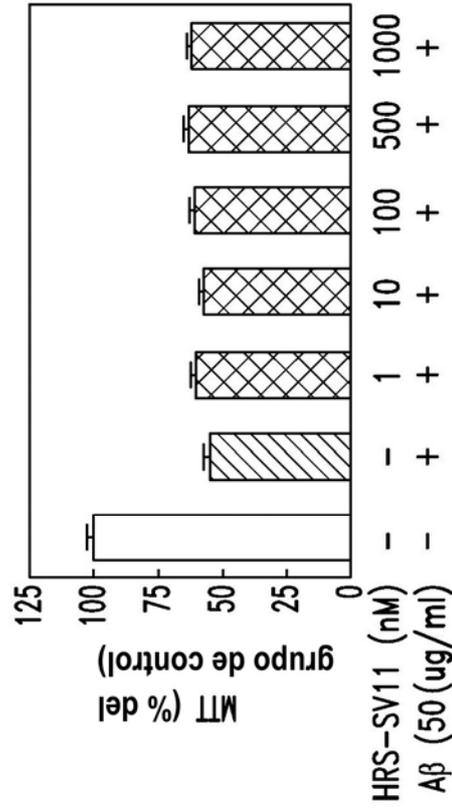


FIG. 10B

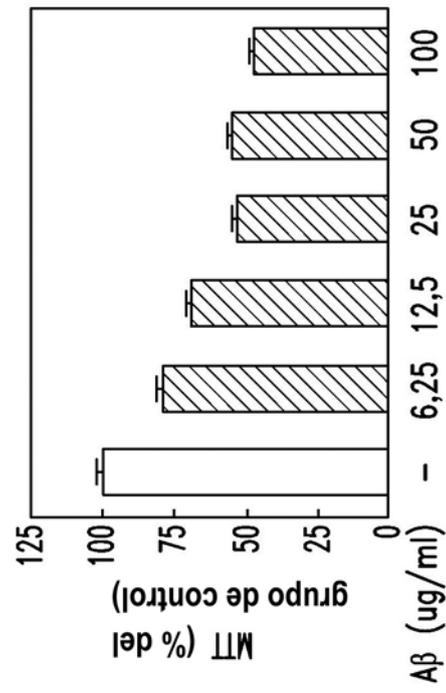


FIG. 10A

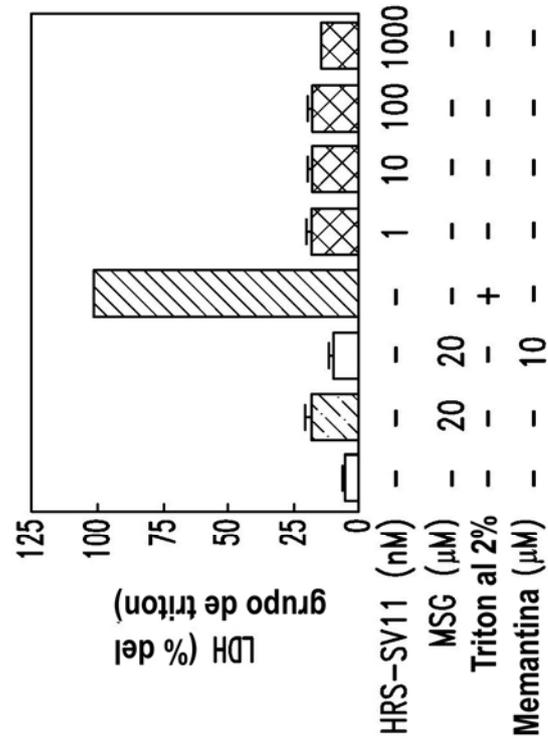


FIG. 10D

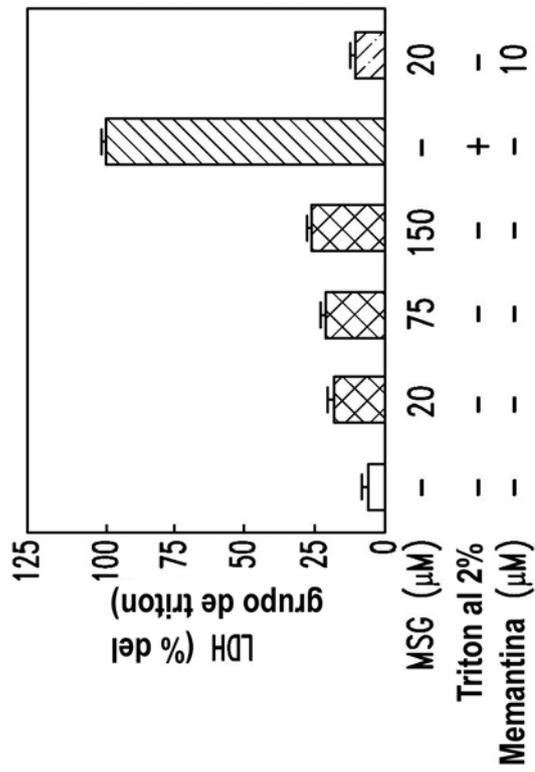


FIG. 10C

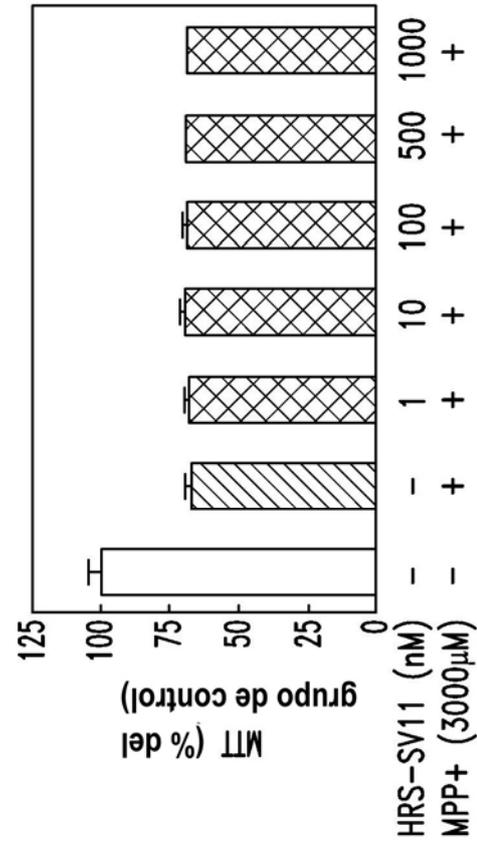


FIG. 10F

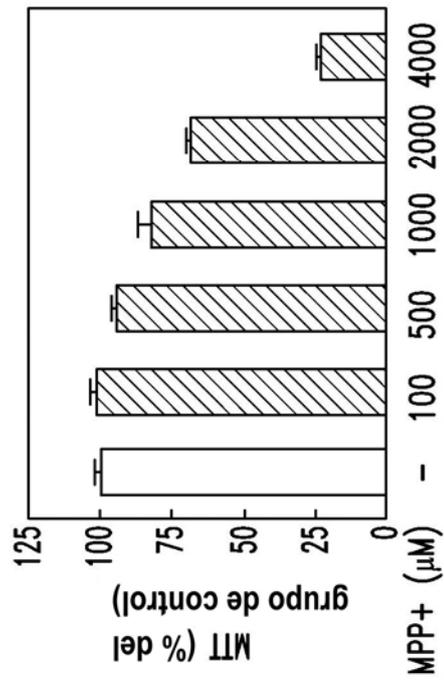
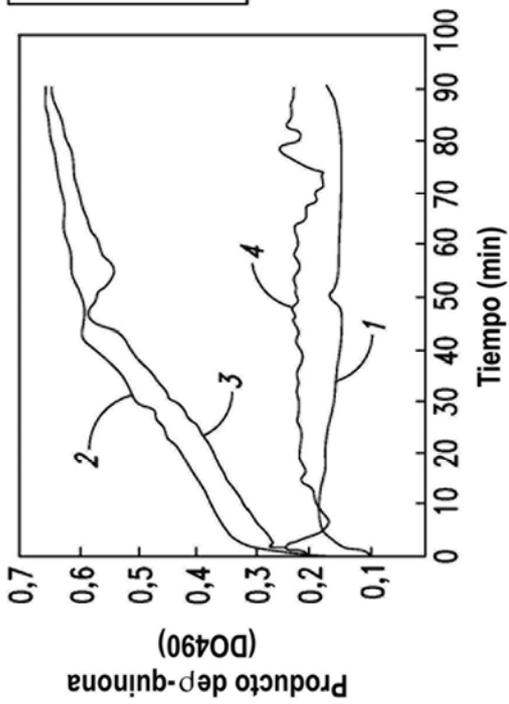


FIG. 10E



- 1= Con
- 2= 6-OHDA
- 3= HRS-SV11+
- 4= Vitamina C+ 6-OHDA

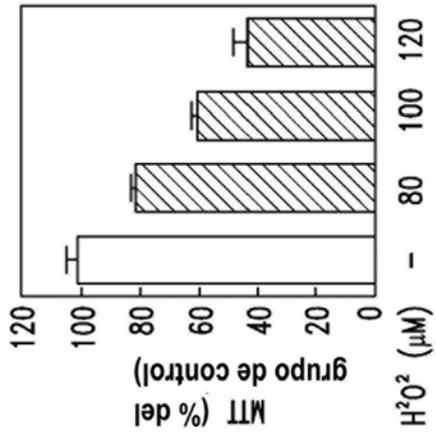


FIG. 11B

FIG. 11A

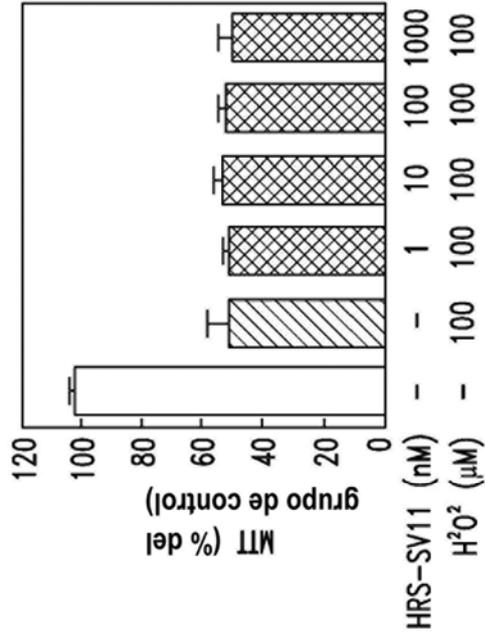


FIG. 11C

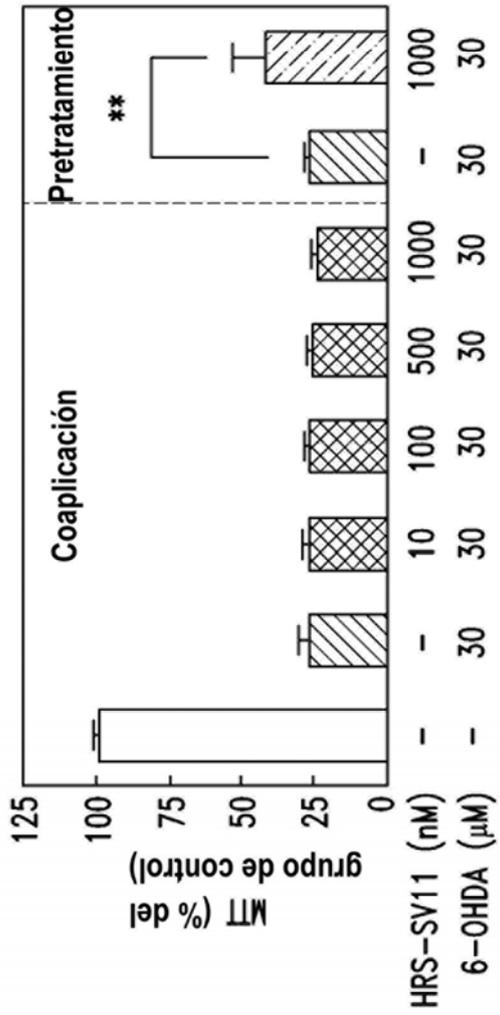


FIG. 11D

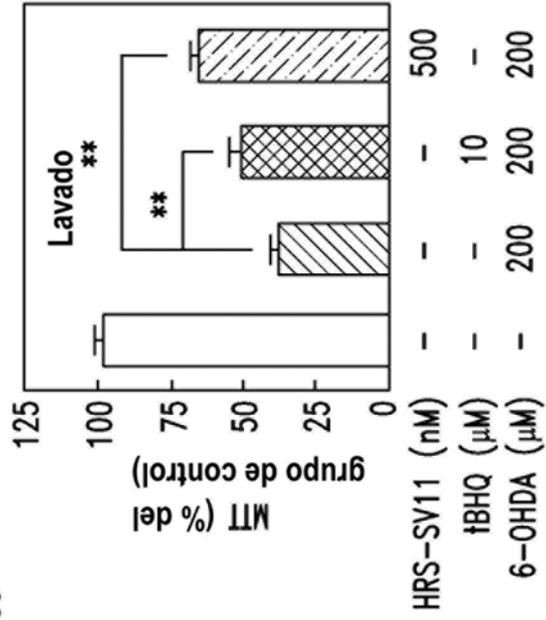


FIG. 11E

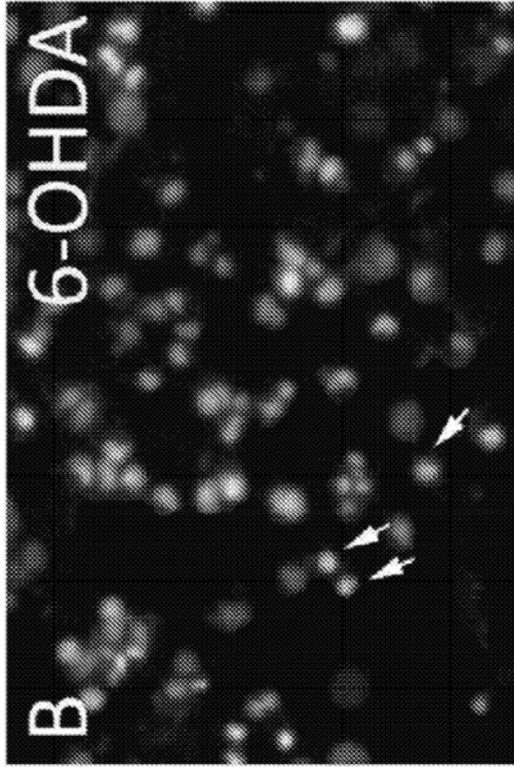


FIG. 12B

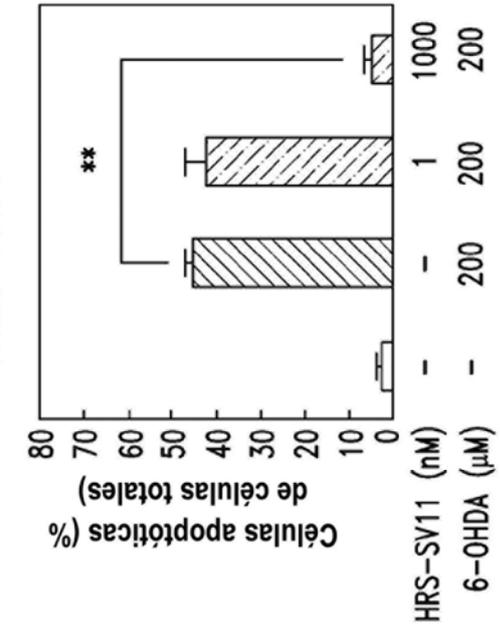


FIG. 12D

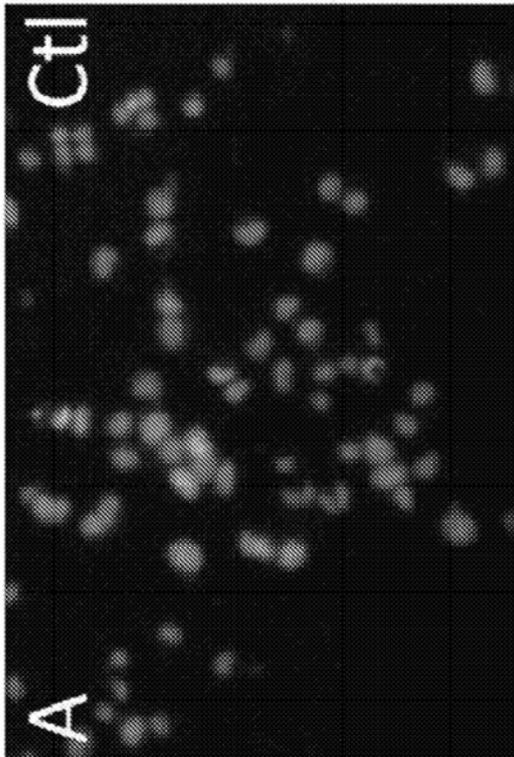


FIG. 12A

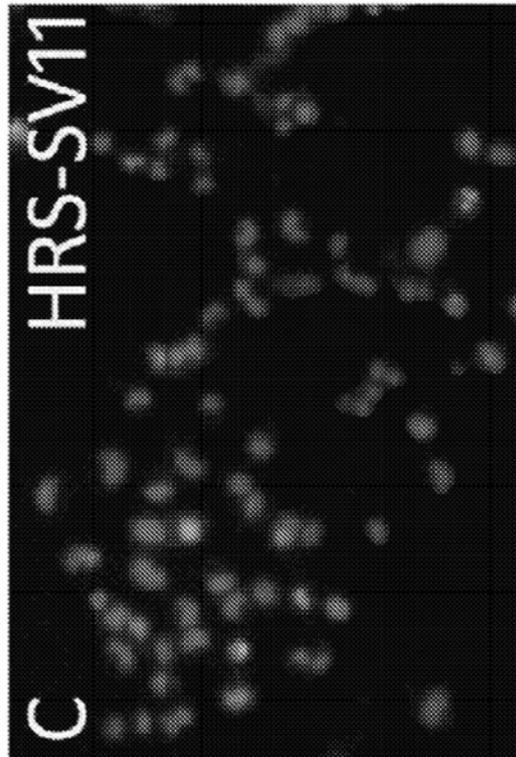


FIG. 12C

		169	▼	171
			▼	
HRS_HUMAN		NQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRRDLVEEIKRRTQPLCIC		
HRS_PONAB		NQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRRDLVEEIKRRTQPLCIC		
HRS_BOVIN		NQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVASREEVDVRRDLVEEIKRRTSQPLCIC		
HRS_MOUSE		NQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVASREEVDVRRDLVEEIKRRTNQPISIC		
HRS_MESAU		NQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVASREEVDVRRDLVEEIKRRTNQPISIC		
HRS_FUGRU		SOLQHCEESCIPLVAIIGEQELKDGVIKLRNVA TRDEVDIRADLIAEIKRRTSA-----		
HRS_CAEEL		TQFQYAEERRIPLAIVIGEQELKDGVIKLRNVA TRDEVDIRADLIAEIKRRTSA-----		
HRS_DICDI		AQLNTADESNIPLI III GKSEVETNSLSVKTMHDRKQVSIERSNFTVKIKEILSTIPK--		
HRS_ORYSJ		NHLKYATQSGIPMMVLVSESEISSQVKLKLQNLAAASQEEVDRTEFAQVLRKQKLRNP-----		

117 ▼

FIG. 13A

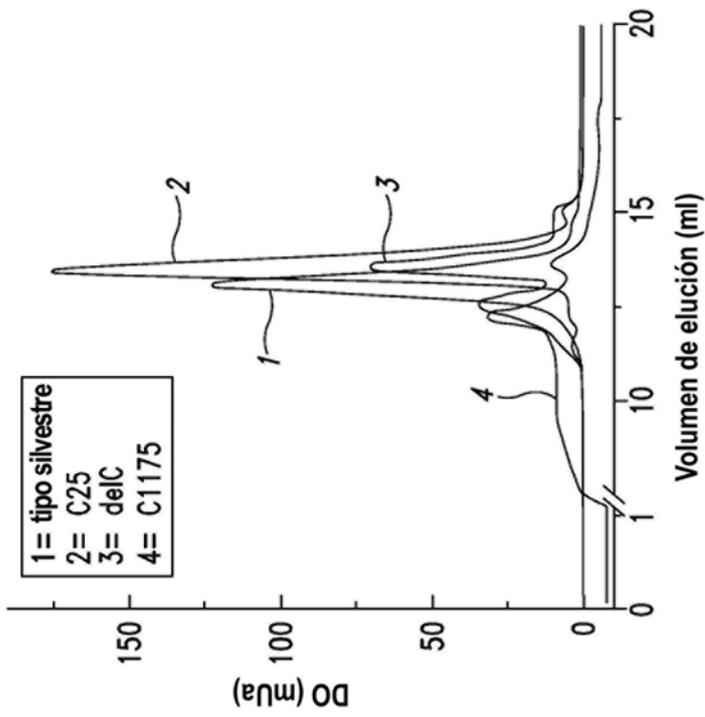


FIG. 13B

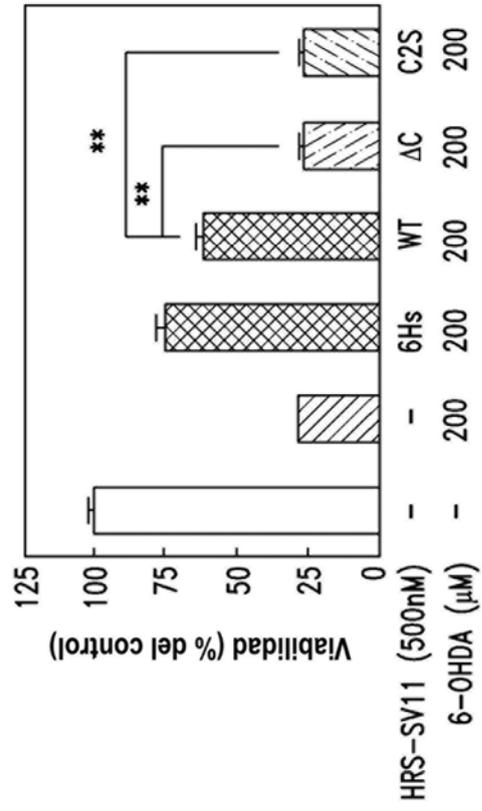
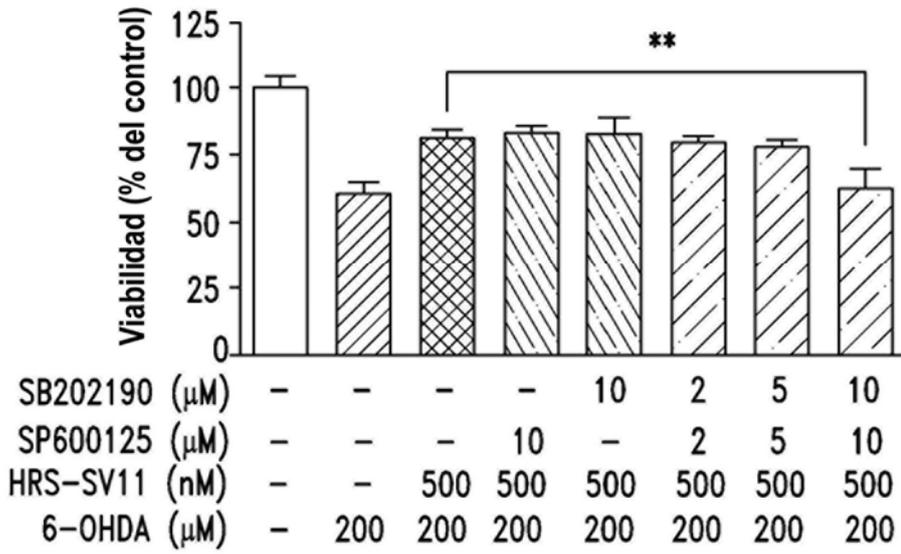
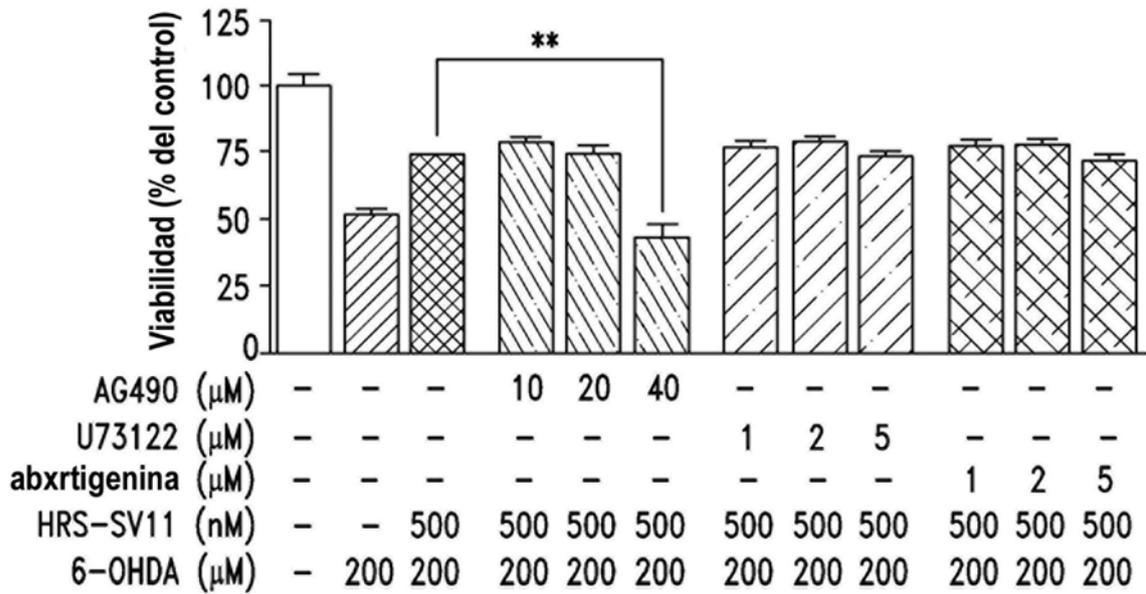


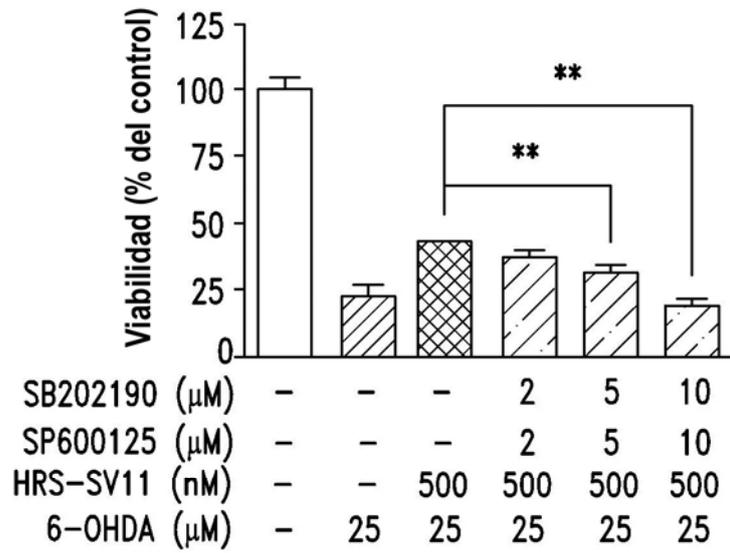
FIG. 13C



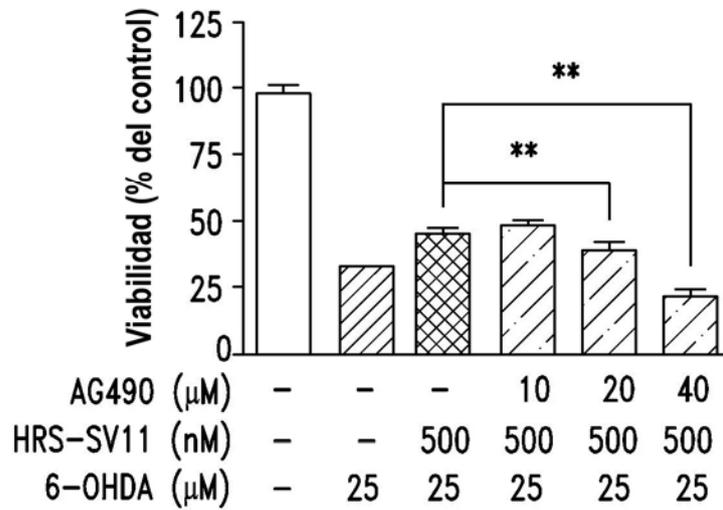
*FIG. 14A*



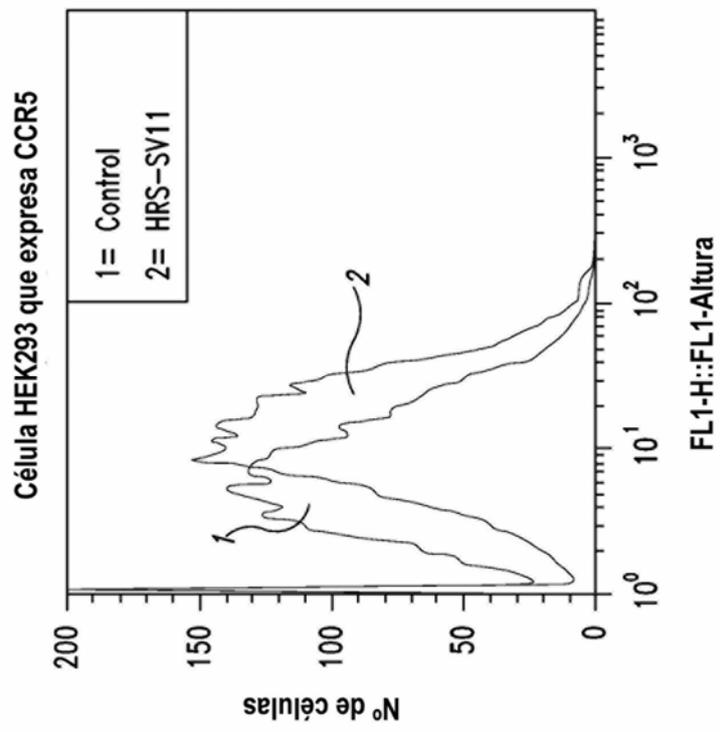
*FIG. 14B*



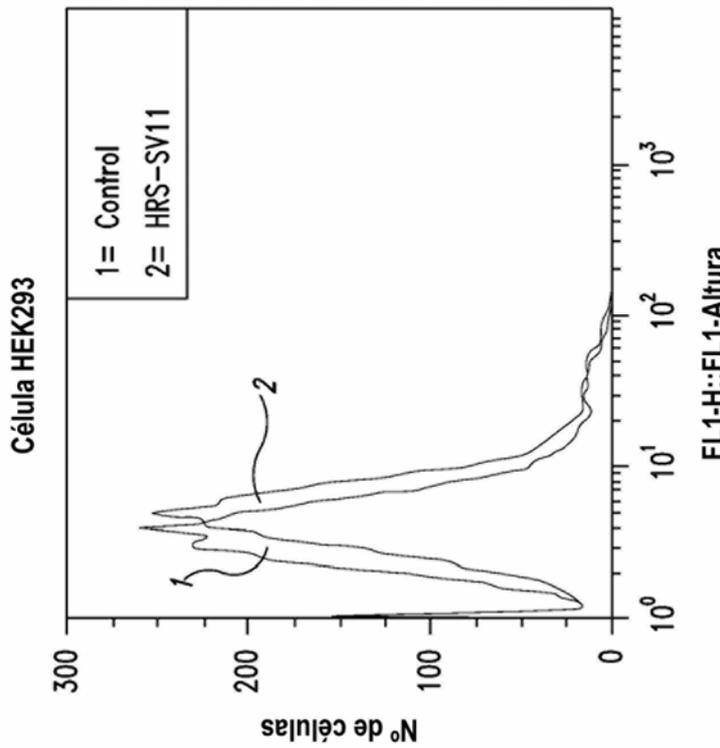
*FIG. 14C*



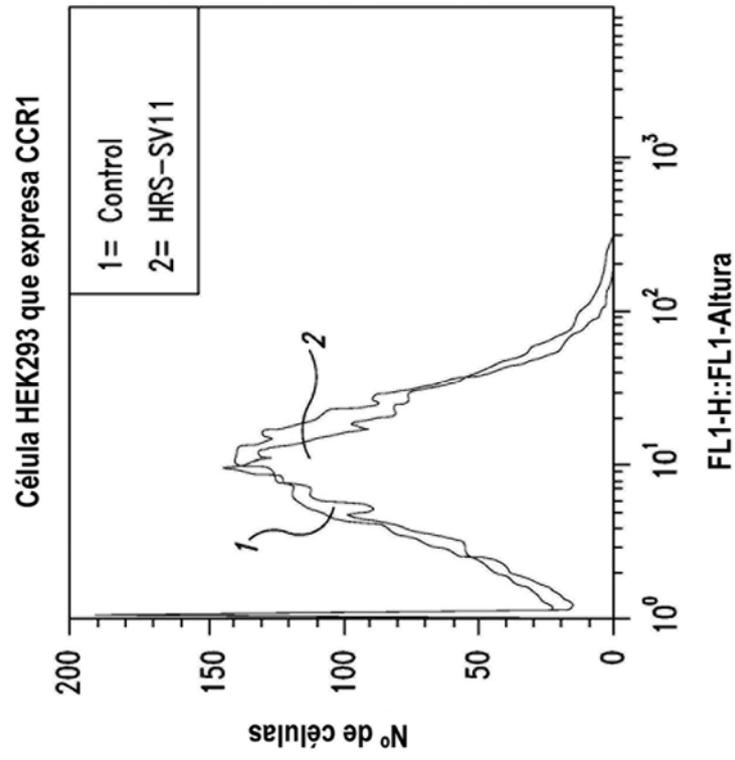
*FIG. 14D*



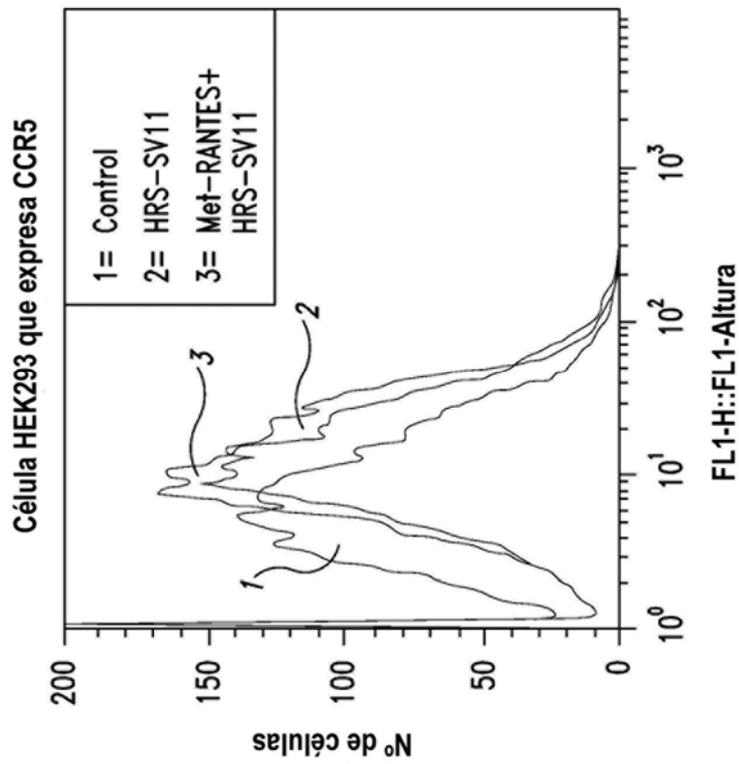
**FIG. 15B**



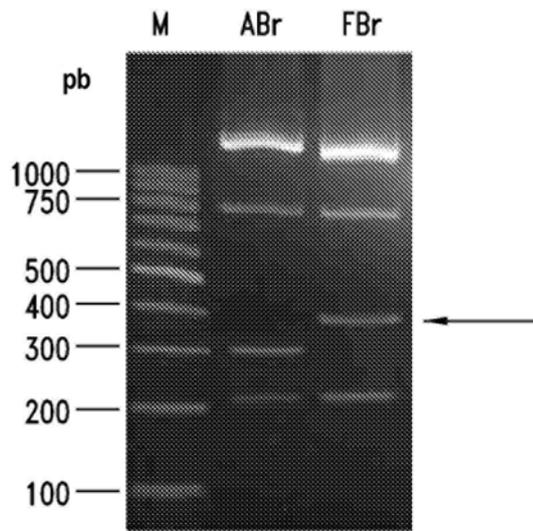
**FIG. 15A**



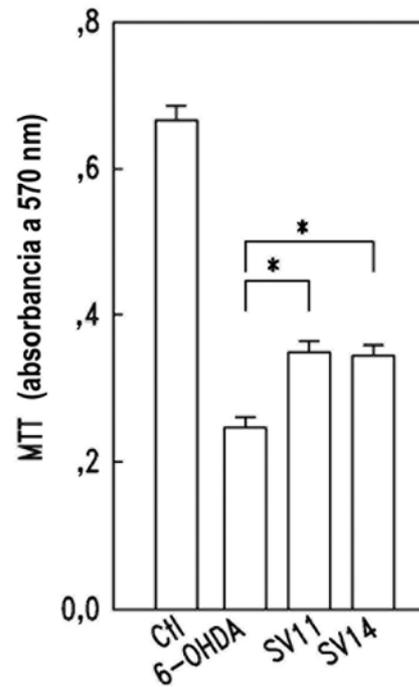
*FIG. 15D*



*FIG. 15C*



*FIG. 16A*



*FIG. 16D*

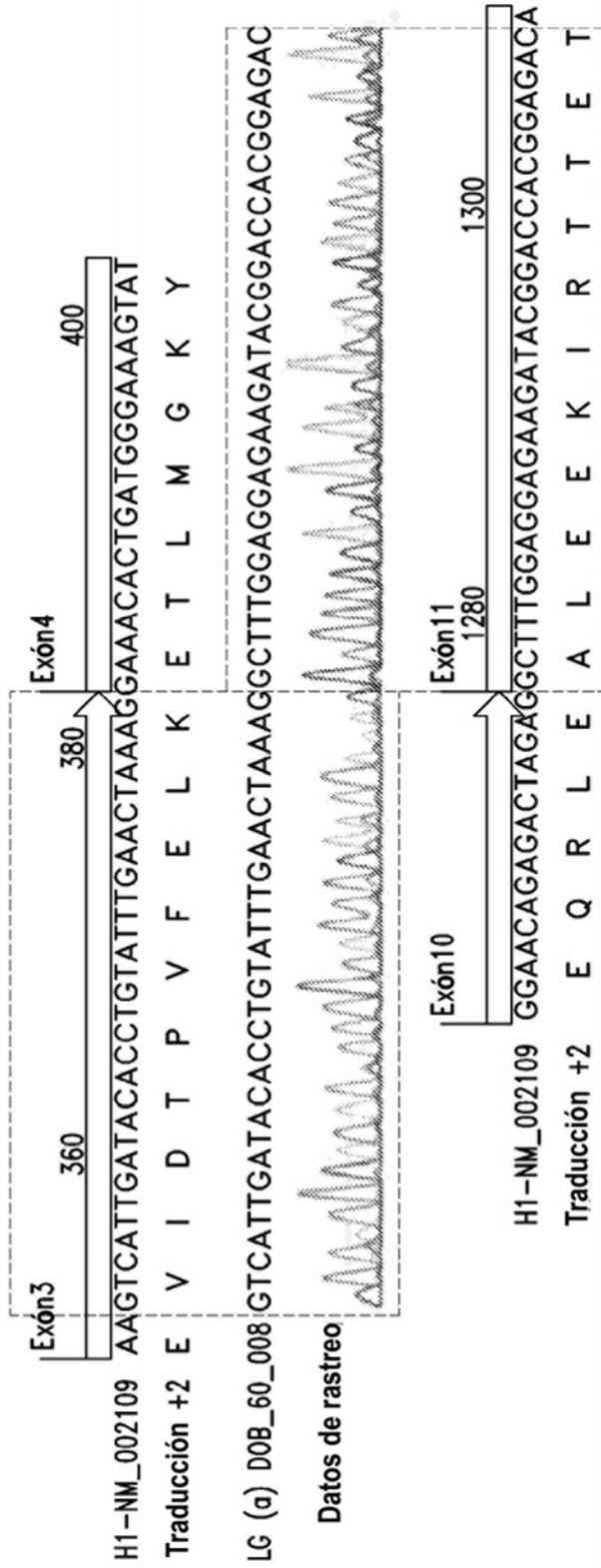
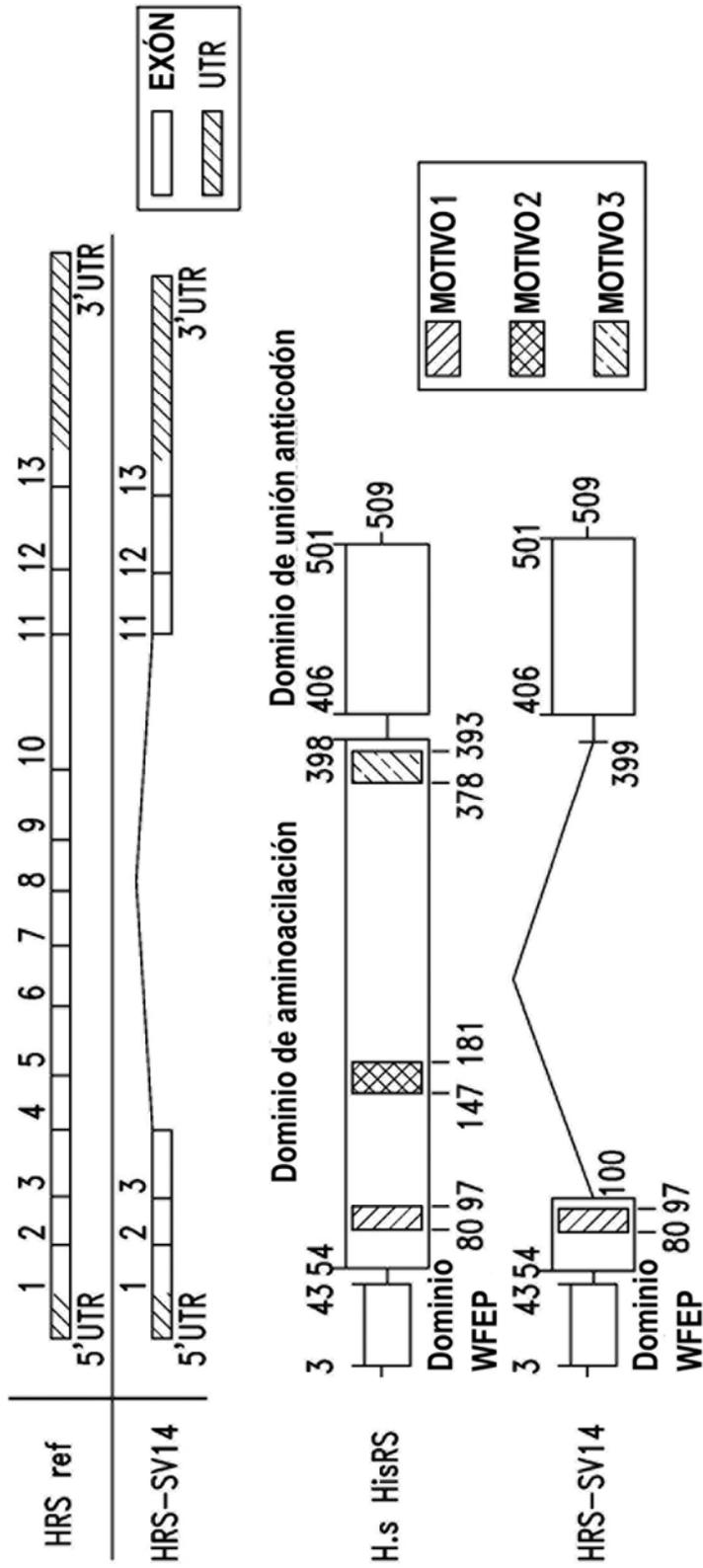


FIG. 16B



*FIG. 16C*

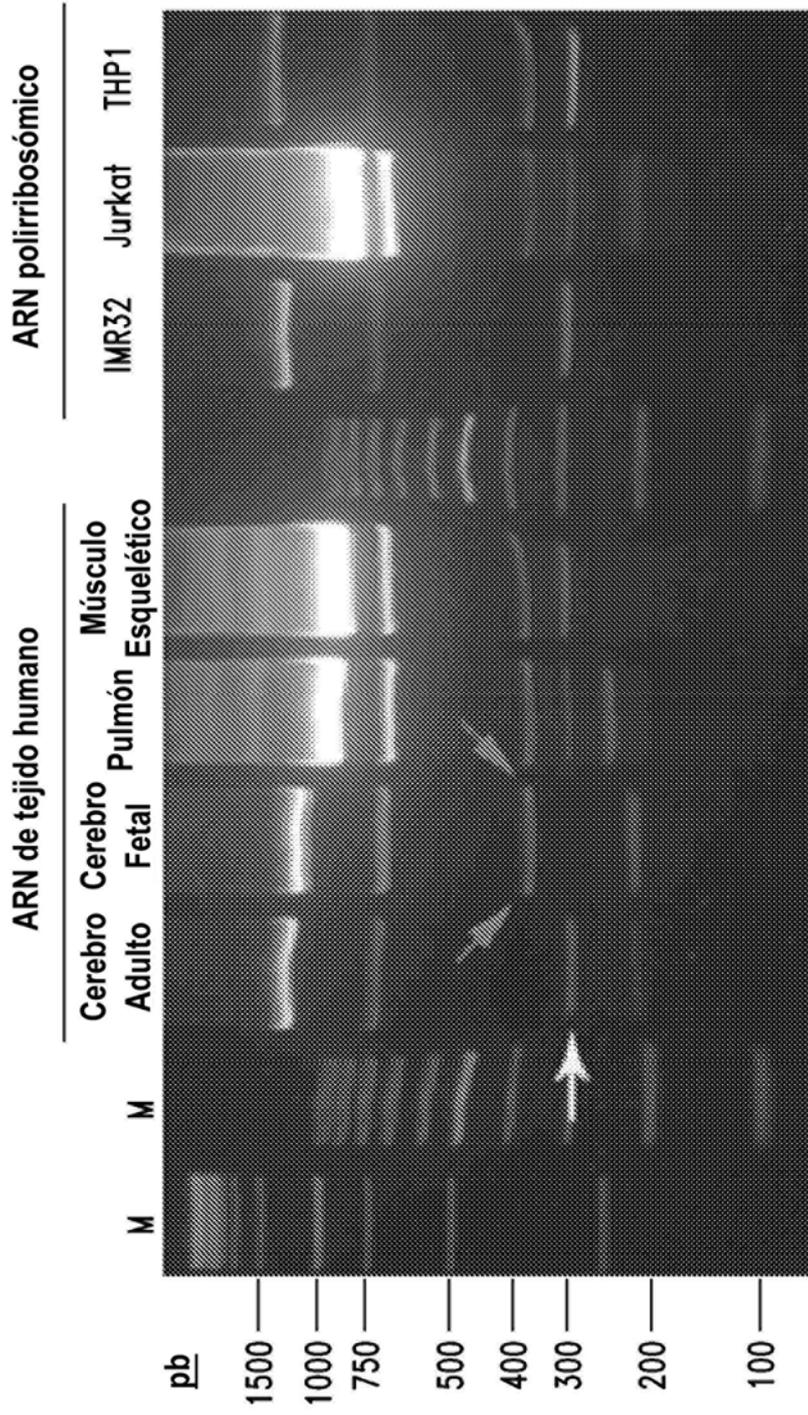
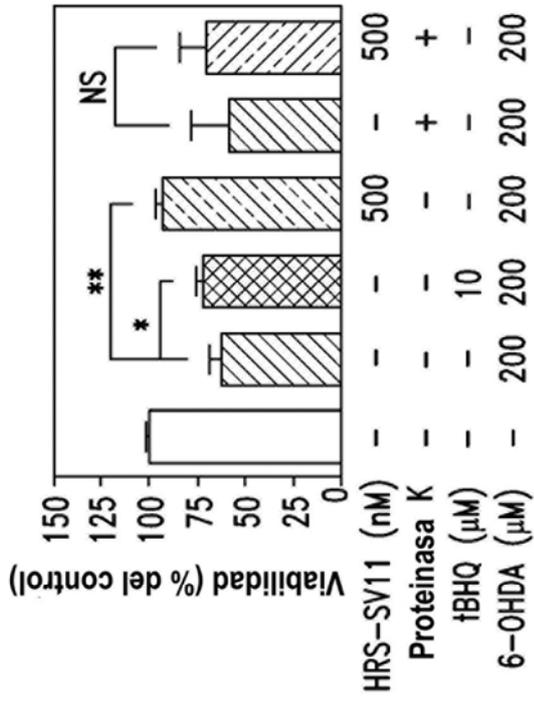
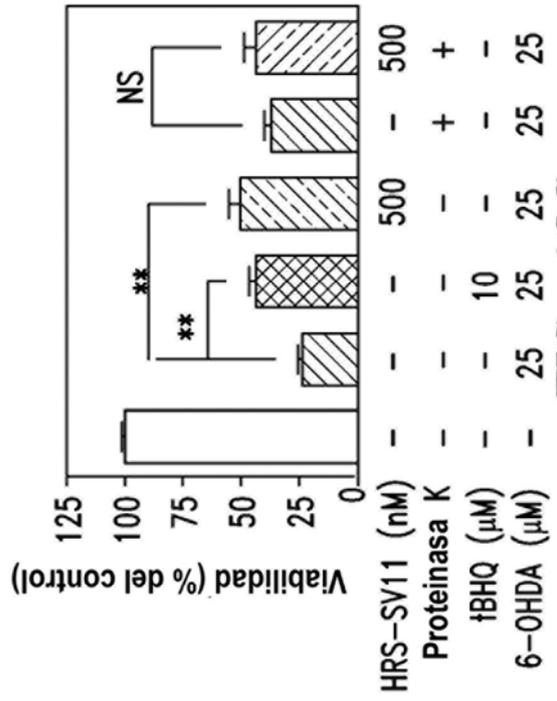


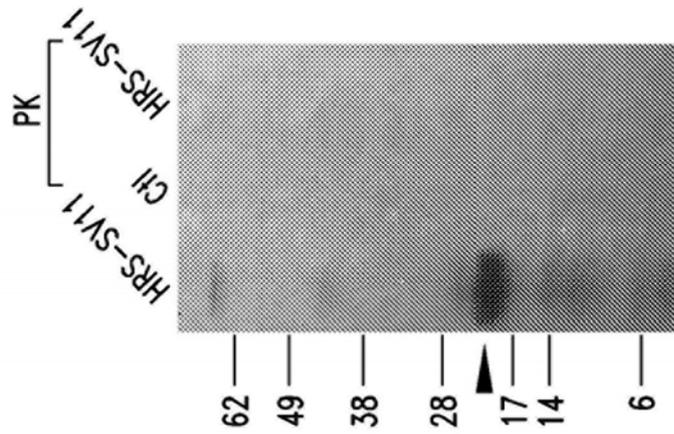
FIG. 17



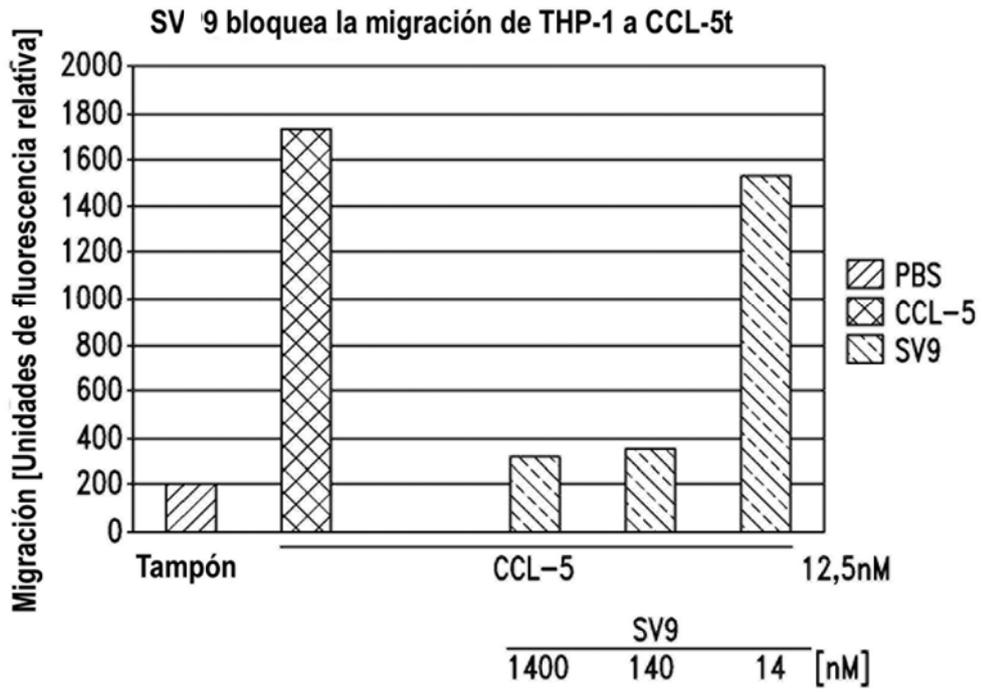
**FIG. 18B**



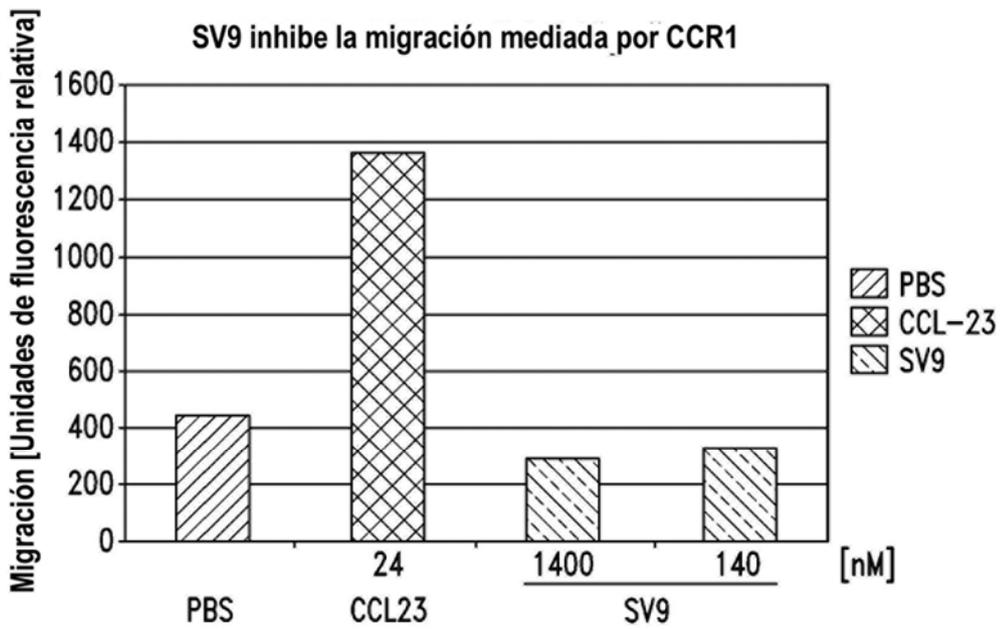
**FIG. 18C**



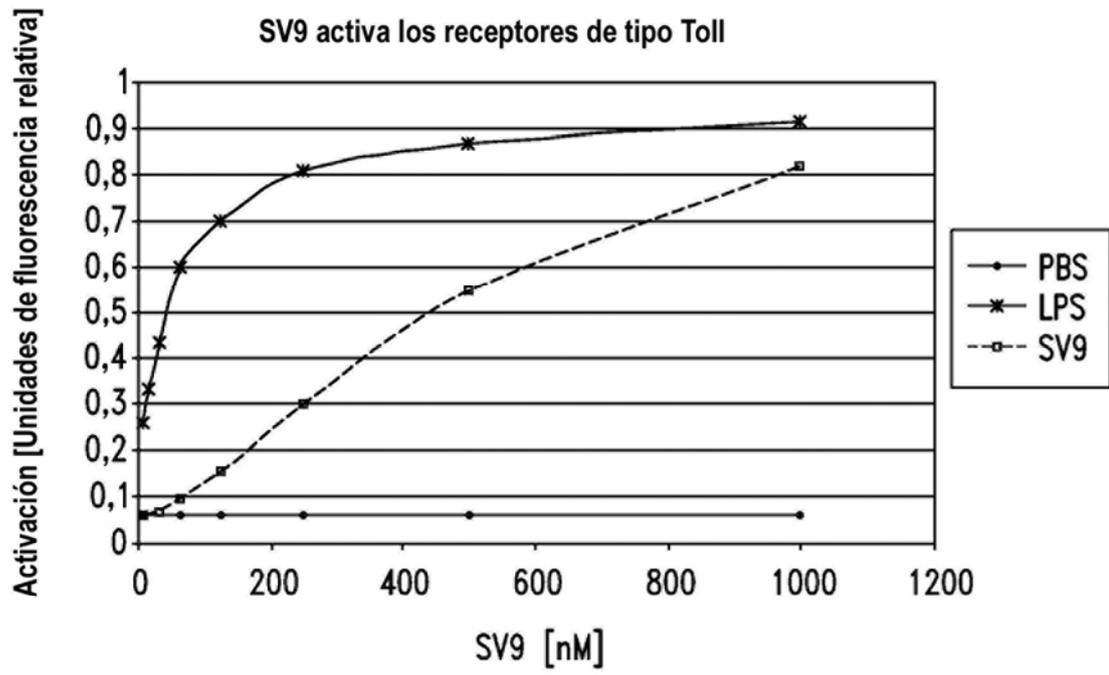
**FIG. 18A**



*FIG. 19*



*FIG. 20*



*FIG. 21*

HRS-SV9 se acopla preferentemente a TLR-4

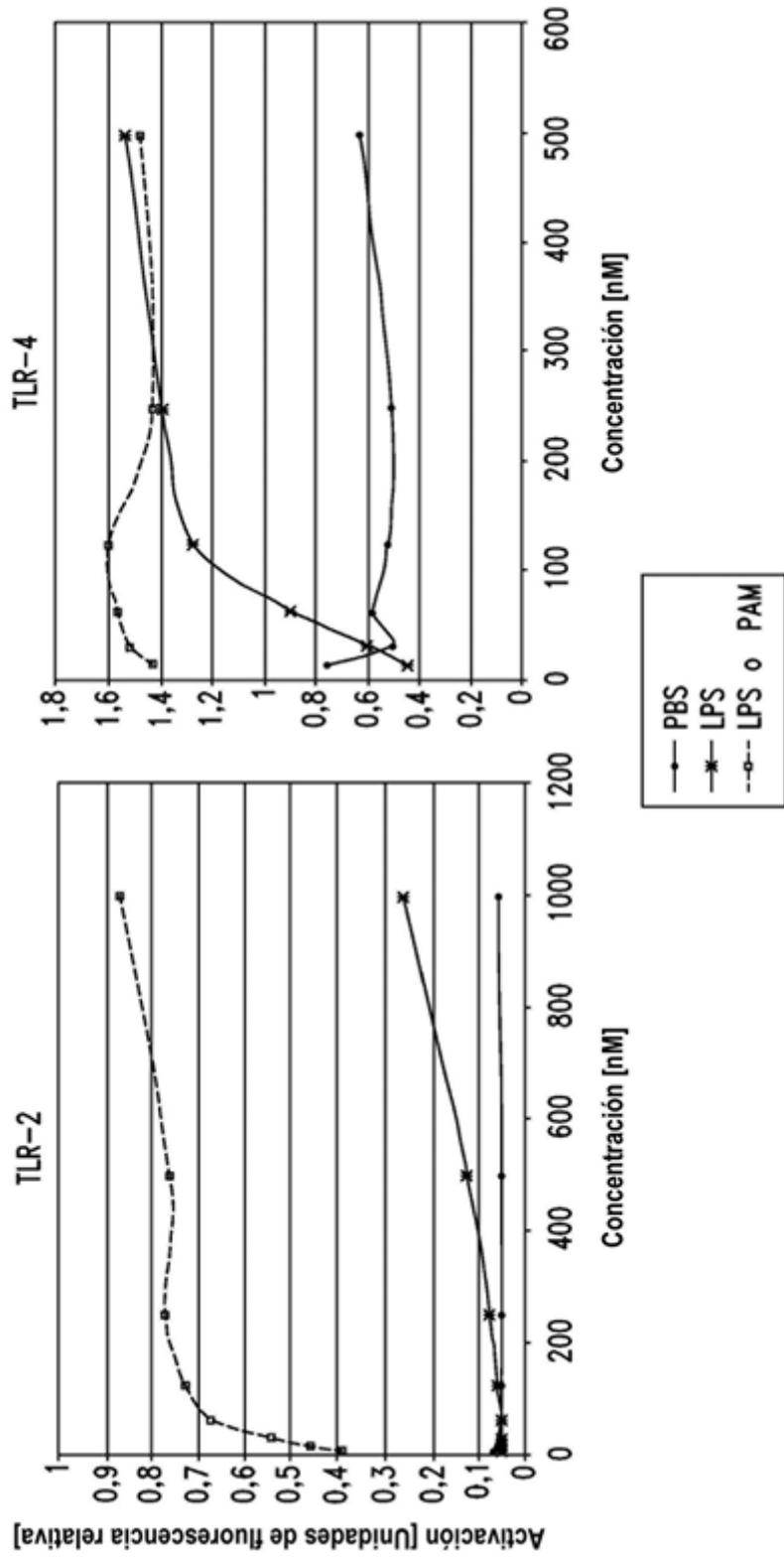
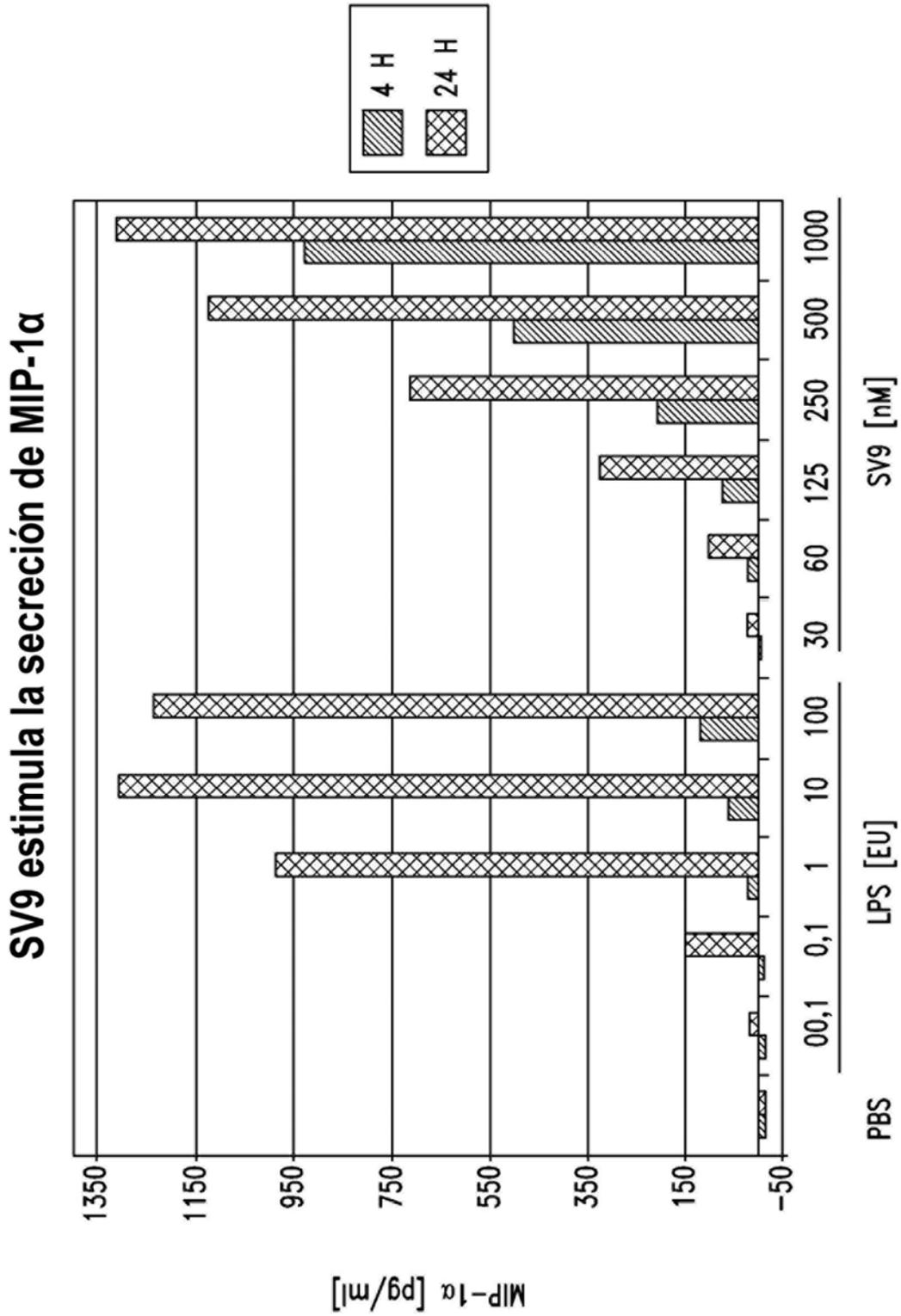


FIG. 22A

FIG. 22B



**FIG. 23**