



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 308 779**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **96925537 .1**

(96) Fecha de presentación : **25.07.1996**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0783577**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.1997**

(54) Título: **Receptores quiméricos y métodos para identificar compuestos activos en los receptores de glutamato metabotrópico y el uso de tales compuestos en el tratamiento de trastornos y enfermedades neurológicas.**

(30) Prioridad: **26.07.1995 US 1526**

(73) Titular/es: **AstraZeneca AB.**
151 85 Södertälje, SE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(72) Inventor/es: **Fuller, Forrest H.;**
Krapcho, Karen J. y
Hammerland, Lance G.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Receptores quiméricos y métodos para identificar compuestos activos en los receptores de glutamato metabotrópico y el uso de tales compuestos en el tratamiento de trastornos y enfermedades neurológicas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a receptores quiméricos que contienen una o más regiones homólogas a un receptor de glutamato metabotrópico y una o más regiones homólogas a un receptor de calcio.

Antecedentes de la invención

La descripción siguiente proporciona un compendio de la información relevante a la presente invención. No es un reconocimiento de que cualquiera de la información proporcionada en la misma es técnica anterior a la invención actualmente reclamada, ni que cualquiera de las publicaciones específica o implícitamente referenciadas son técnica anterior a esta invención.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro de mamíferos. El glutamato produce sus efectos sobre las neuronas centrales uniéndose y por lo tanto activando los receptores de la superficie celular. Estos receptores se han subdividido en dos clases principales, los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos, basándose en las características estructurales de las proteínas del receptor, el medio por el cual los receptores traducen las señales hacia dentro de la célula, y los perfiles farmacológicos.

Los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs, por sus siglas en inglés) son canales iónicos dependientes de ligandos que, tras unirse el glutamato, se abren para permitir la entrada selectiva de ciertos cationes monovalentes y divalentes, despolarizando así la membrana celular. Además, ciertos iGluRs con relativamente alta permeabilidad al calcio pueden activar una variedad de procesos intracelulares dependientes de calcio. Estos receptores son complejos de proteínas de subunidades múltiples que pueden ser homoméricos o heteroméricos por naturaleza. Las diversas subunidades del iGluR, todas, comparten motivos estructurales comunes, incluyendo un dominio extracelular aminoterminal (ECD, por sus siglas en inglés) relativamente grande, seguido por un dominio transmembranal múltiple (TMD, por sus siglas en inglés) que comprende dos regiones transmembranales (TMs, por sus siglas en inglés), un segundo bucle intracelular más pequeño, y una tercera TM, antes de terminar con un dominio intracelular carboxi-terminal (CT, por sus siglas en inglés). Históricamente los iGluRs primero se subdividieron farmacológicamente en tres clases basándose en la activación preferente por los antagonistas ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA, por sus siglas en inglés), kainato (KA), y N-metil-D-aspartato (NMDA). Más tarde, estudios de clonación molecular acoplados con estudios farmacológicos adicionales revelaron una mayor diversidad de los iGluRs, en los que múltiples subtipos de receptores AMPA, KA y NMDA se expresan en el SNC de mamíferos (Hollman y Heinemann, *Ann. Rev. Neurosci.* 7:31, 1994).

Los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) son receptores acoplados a proteína G capaces de activar una variedad de sistemas de segundos mensajeros intracelulares después de la unión del glutamato u otros antagonistas potentes que incluyen el quisqualato y el ácido 1-aminociclopentan-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD) (Schoepp *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 11:508, 1990; Schoepp y Conn, *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13, 1993).

La activación de diferentes subtipos del receptor de glutamato metabotrópico *in situ* provoca una o más de las siguientes respuestas: activación de la fosfolipasa C, aumentos en la hidrólisis de la fosfoinositida (PI), liberación de calcio intracelular, activación de la fosfolipasa D, activación o inhibición de la adenilil ciclasa, aumentos y disminuciones en la formación de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), activación de la guanilil ciclasa, aumentos en la formación de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), activación de la fosfolipasa A₂, aumentos en la liberación de ácido araquidónico, y aumentos o disminuciones en la actividad de canales iónicos con puerta de voltaje o de ligando (Schoepp y Conn, *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13, 1993; Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, 1995).

Hasta el momento, se han aislado 8 subtipos distintos de mGluR vía clonación molecular, y se han nombrado mGluR1 a mGluR8 según el orden en que se descubrieron (Nakanishi, *Neuron* 13:1031, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). Tiene lugar una diversidad adicional por la expresión de formas empalmadas de manera alternativa de ciertos subtipos de mGluR (Pin *et al.*, *PNAS* 89:10331, 1992; Minakami *et al.*, *BBRC* 199:1136, 1994). Todos los mGluRs son estructuralmente similares, porque proteínas de membrana de subunidad única que poseen un dominio extracelular aminoterminal (ECD) grande seguido por siete dominios transmembranales putativos (7TMD) que comprenden siete hélices que atraviesan la membrana putativas conectadas por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, y un dominio intracelular carboxiterminal de longitud variable (cola citoplásmica) (CT, por sus siglas en inglés) (véase, la Figura Esquemática 1a).

Los ocho mGluRs se han subdividido en tres grupos basados en las identidades de la secuencia de aminoácidos, los sistemas de segundo mensajero que utilizan y las características farmacológicas (Nakanishi, *Neuron* 13:1031, 1994; Pine y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). La identidad de aminoácidos entre mGluRs dentro de un grupo dado es aproximadamente 70% pero cae hasta aproximadamente 40%

entre mGluRs en grupos diferentes. Para mGluRs en el mismo grupo, esta relación es aproximadamente paralela por las similitudes en los mecanismos de transducción de señal y las características farmacológicas.

Los mGluRs del Grupo I comprenden mGluR1, mGluR5 y sus variantes de corte y empalme alternativas. La unión de los agonistas a estos receptores da como resultado la activación de la fosfolipasa C y la subsiguiente movilización del calcio intracelular. Por ejemplo, se han utilizado ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores mGluR1 recombinantes para demostrar este efecto indirectamente por medios electrofisiológicos (Masu *et al.*, Nature 349:760, 1991; Pin *et al.*, PNAS 89:10331, 1992). Se alcanzaron resultados similares con ovocitos que expresan receptores mGluR5 recombinantes (Abe *et al.*, J. Biol. Chem. 267:13361, 1992; Minakami *et al.*, BBRC 199:1136, 1994). Alternativamente, la activación agonista de los receptores mGluR1 recombinantes expresó en células ováricas de hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés) hidrólisis de PI estimulada, formación de cAMP, y liberación de ácido araquidónico como se midió por ensayos bioquímicos estándar (Aramori y Nakanishi, Neuron 8:757, 1992). En comparación, la activación de los receptores mGluR5 expresó en células CHO hidrólisis de PI estimulada y subsiguiente transito de calcio intracelular pero no se observó estimulación de la formación de cAMP o liberación de ácido araquidónico (Abe *et al.*, J. Biol. Chem. 267:13361, 1992). El perfil de potencia agonista para los mGluRs del Grupo I es quisqualato > glutamato = ibotenato > (2S,1'S,2'S)-2-carboxiciclopropil glicina (L-CCG-I) > ácido (1S,3R)-1-aminociclopentan-1,3-dicarboxílico (ACPD). El quisqualato es relativamente selectivo para los receptores del Grupo I, comparados con los mGluRs del Grupo II y del Grupo III, pero también activa potentemente receptores AMPA ionotrópicos (Pin y Duvoisin, Neuropharmacology, 34:1, Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1417, 1995).

Los mGluRs del Grupo II incluyen mGluR2 y mGluR3. La activación de estos receptores como se expresa en células CHO inhibe la actividad de la adenilil ciclasa vía la proteína G inhibitoria, G_i , en una manera sensible a la toxina de la tos ferina (Tanabe *et al.*, Neuron 8:169, 1992; Tanabe *et al.*, Neurosci. 13:1372, 1993). El perfil de potencia agonista para los receptores del Grupo II es L-CCG-I > glutamato > ACPD > ibotenato > quisqualato. Estudios preliminares sugieren que L-CCG-I y (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil)glicina (DCG-IV) son ambas agonistas relativamente selectivos para los receptores del Grupo II (Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1417, 1995).

Los mGluRs del Grupo III incluyen mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Como los receptores del Grupo II estos mGluRs se acoplan negativamente a la adenilato ciclasa para inhibir la acumulación intracelular de cAMP de una manera sensible a la toxina de la tos ferina cuando se expresa en células CHO (Tanabe *et al.*, J. Neurosci. 13:1372, 1993; Nakajima *et al.*, J. Biol. Chem. 268:11868, 1993; Okamoto *et al.*, J. Biol. Chem. 269:1231, 1994; Duvoisin *et al.*, J. Neurosci. 15:3075, 1995). Como grupo, su perfil de potencia agonista es ácido (S)-2-amino-4-fosfonobutírico (LAP4) > glutamato > ACPD > quisqualato, pero mGluR8 puede diferir ligeramente con el glutamato siendo más potente que L-AP4 (Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1417, 1995; Duvoisin *et al.*, J. Neurosci. 15:3075, 1995). Tanto L-AP4 como (S)-serina-O-fosfato (L-SOP) son agonistas relativamente selectivos para los receptores del Grupo III.

Finalmente, los ocho subtipos de mGluR tienen patrones únicos de expresión en el SNC de mamíferos que en muchos casos están solapando (Masu *et al.*, Nature 349:760, 1991; Martin *et al.*, Neuron 9:259, 1992; Ohishi *et al.*, Neurosci. 53:1009, 1993; Tanabe *et al.*, J. Neurosci. 13:1372; Ohishi *et al.*, Neuron 13:55, 1994; Abe *et al.*, J. Biol. Chem. 267:13361, 1992; Nakajima *et al.*, J. Biol. Chem. 268:11868, 1993; Okamoto *et al.*, J. Biol. Chem. 269:1231, 1994; Duvoisin *et al.*, J. Neurosci. 15:3075, 1995). Como resultado ciertas neuronas pueden expresar solamente un subtipo de mGluR particular, mientras que otras neuronas pueden expresar múltiples subtipos que pueden estar localizados en posiciones similares y/o diferentes en la célula (es decir, dendritas postsinápticas y/o cuerpos celulares versus terminaciones axonales presinápticas). Por lo tanto, las consecuencias funcionales de la activación del mGluR sobre una neurona dada dependerá de los mGluRs particulares que se expresen; las afinidades de los receptores por el glutamato y las concentraciones de glutamato a que se expone la célula; las rutas de transducción de señal activada por los receptores; y la situación de los receptores sobre la célula. Se puede introducir un nivel adicional de complejidad mediante interacciones múltiples entre neuronas que expresan mGluR en una región del cerebro dada. Como resultado de estas complejidades, y la carencia de agonistas y antagonistas de mGluR específicos para los subtipos, los papeles de mGluRs particulares en procesos fisiológicos y fisiopatológicos que afectan la función neuronal no están bien definidos. Aún así, el trabajo con los agonistas y antagonistas disponibles ha dado algunos elementos generales de comprensión sobre los mGluRs del Grupo I en comparación con los mGluRs del Grupo II y del Grupo III.

Los intentos de elucidar los papeles fisiológicos de los mGluRs del Grupo I sugieren que la activación de estos receptores provoca excitación neuronal. Diversos estudios han demostrado que el ACPD puede producir excitación postsináptica tras su aplicación a las neuronas en el hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, y tálamo así como en otras regiones del cerebro. La evidencia indica que esta excitación es debida a la activación directa de los mGluRs postsinápticos, pero también se ha sugerido que está mediada por la activación de mGluRs presinápticos que dan como resultado un aumento de liberación de neurotransmisor (Baskys, Trends Pharmacol. Sci. 15:92, 1992; Schoepp, Neurochem. Int. 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, Neuropharmacology 34:1). Los experimentos farmacológicos implican a los mGluRs del Grupo I como mediadores de esta excitación. El efecto del ACPD se puede reproducir por concentraciones bajas de quisqualato en presencia de antagonistas de iGluR (Hu y Storm, Brain Res. 568:339, 1991; Greene *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 226:279, 1992), y dos compuestos de fenilglicina conocidos por activar mGluR1, (S)-3-hidroxfenilglicina ((S)-3HPG) y (S)-3,5-dihidroxfenilglicina ((S)-DHPG), también producen la excitación (Watkins y Collingridge, Trends Pharmacol. Sci. 15:333, 1994). Además, la excitación se puede bloquear por (S)-4-carboxifenilglicina ((S)-4CPG), (S)-4-carboxi-3-hidroxfenilglicina ((S)-4C3HPG) y (+)-alfametil-4-carboxifenilglicina ((+)-MCPG), compuestos conocidos por ser antagonistas de mGluR1 (Eaton *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 244:195, 1993; Watkins y Collingridge, Trends Pharmacol. Sci. 15:333, 1994).

Otros estudios que examinan los papeles fisiológicos de los mGluRs indican que la activación de mGluRs presinápticos puede bloquear la transmisión sináptica excitatoria y la inhibitoria inhibiendo la liberación de neurotransmisor (Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1). El bloqueo presináptico de la transmisión sináptica excitatoria por ACPD se ha observado en neuronas en la corteza visual, cerebelo, hipocampo, estriado y amígdala (Pin *et al.*, *Curr. Drugs: Neurodegenerative Disorders* 1:111, 1993), mientras que el bloqueo similar de la transmisión sináptica inhibitoria se ha demostrado en el estriado y el bulbo olfativo (Calabresi *et al.*, *Neurosci. Lett.* 139:41, 1992; Hayashi *et al.*, *Nature* 366:687, 1993). Múltiples pruebas sugieren que los mGluRs del Grupo II median esta inhibición presináptica. Los mGluRs del Grupo II están fuertemente acoplados a la inhibición de la adenilil ciclasa, igual que los receptores alfa₂-adrenérgicos y SHT_{1A}-serotoninérgicos que se sabe que median la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisor en otras neuronas. Los efectos inhibitorios del ACPD también se pueden imitar por L-CCG-I y DCG-IV, que son agonistas selectivos de los mGluRs del Grupo II (Hayashi *et al.*, *Nature* 366:687, 1993; Jane *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 112:809, 1994). Además, se ha demostrado que la activación de mGluR2 puede inhibir fuertemente la actividad presináptica de canales de calcio de tipo N cuando el receptor se expresa en neuronas simpáticas (Ikeda *et al.*, *Neuron* 14:1029, 1995), y la inactivación de estos canales se sabe que inhibe la liberación de neurotransmisor. Finalmente, se ha observado que L-CCG-I, a concentraciones selectivas para los mGluRs del Grupo II, inhibe la liberación provocada por despolarización de ³H-aspartato a partir de rodajas de estriado de rata (Lombardi *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 110:1407, 1993). La evidencia de los efectos fisiológicos de la activación de mGluR del Grupo II al nivel postsináptico es limitada. Sin embargo, un estudio sugiere que las acciones postsinápticas de la L-CCG-I pueden inhibir la activación del receptor de NMDA en neuronas mesencefálicas cultivadas (Ambrosini *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 47:1057, 1995).

Estudios fisiológicos han demostrado que L-AP4 también puede inhibir la transmisión sináptica excitatoria en una variedad de neuronas del SNC. Incluidas están neuronas en la corteza, hipocampo, amígdala, bulbo olfativo y médula espinal (Koerner y Johnson, *Excitatory Amino Acid Receptors: Design of Agonists and Antagonists* p. 308, 1992, Pin *et al.*, *Curr. Drugs: Neurodegenerative Disorders* 1:111, 1993). La evidencia acumulada indica que la inhibición está medida por la activación de los mGluRs presinápticos. Puesto que los efectos de L-AP4 se pueden imitar por L-SOP, y estos dos agonistas son selectivos para los mGluRs del Grupo II, los miembros de este grupo de mGluR están implicados como mediadores de la inhibición presináptica (Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1). En las neuronas del bulbo olfativo se ha demostrado que la activación L-AP4 de los mGluRs inhibe las corrientes de calcio presinápticas (Trombley y Westbrook, *J. Neurosci.* 12:2043, 1992). Por lo tanto es probable que el mecanismo de inhibición presináptica producido por la activación de los mGluRs del Grupo III sea similar a la producida por los mGluRs del Grupo II, es decir, bloqueo de los canales de calcio de tipo N e inhibición de la liberación de neurotransmisor. También se sabe que L-AP4 actúa postsinápticamente para hiperpolarizar células bipolares ON (encendidas) en la retina. Se ha sugerido que esta acción puede ser debida a la activación de un mGluR, que se acopla a la cGMP fosfodiesterasa de estas células (Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1).

Los estudios de activación del receptor de glutamato metabotrópico utilizando agonistas, antagonistas y líneas celulares recombinantes de vertebrados que expresan mGluRs se han utilizado para evaluar los efectos celulares de la estimulación y la inhibición de diferentes receptores de glutamato metabotrópicos. Por ejemplo, la estimulación agonista del mGluR1 expresado en ovocitos de *Xenopus* demostró el acoplamiento de la activación del receptor a la movilización de calcio intracelular como se evaluó indirectamente utilizando técnicas eletrofisiológicas (Masu *et al.*, *Nature* 349:760-765, 1991). La estimulación agonista de mGluR1 expresado en células CHO estimuló la hidrólisis de PI, formación de cAMP y liberación de ácido araquidónico (Aramori y Nakanishi, *Neuron* 8:757-765, 1992). La estimulación agonista de mGluR5 expresado en células CHO también estimuló la hidrólisis de PI que se mostró que estaba asociada con un aumento transitorio en el calcio citosólico como se evaluó cargando células con el quelante de calcio fluorescente fura-2 (Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:13361-13368, 1992). La activación inducida por agonistas de mGluR1 y mGluR5 indujo hidrólisis de PI en células CHO que fue antagonizada por AP3 y AP4, que son ambos antagonistas de la hidrólisis de PI estimulada por glutamato *in situ* (Nicoletti *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1931-1935, 1986; Schoepp y Johnson, *J. Neurochem.* 53:273-278, 1989). La estimulación agonista de células CHO que expresan mGluR2 (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8:169-179, 1992) o mGluR7 (Okamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:1231-1236, 1994) dio como resultado la inhibición mediada por el receptor de la formación de cAMP y también confirmó la especificidad de ligando observada previamente *in situ*. Los estudios utilizando agonistas se llevaron a cabo en conjunción con mutagénesis dirigida para revelar los aminoácidos específicos que juegan papeles importantes en al unión al glutamato (O'Hara *et al.*, *Neuron* 11:41-52, 1993).

Se ha implicado a los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) en una variedad de patologías que incluyen apoplejía, trauma craneal, lesión de médula espinal, epilepsia, isquemia, hipoglucemia, anoxia, y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (Schoepp y Conn, *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13, 1993; Cunningham *et al.*, *Life Sci.* 54: 135, 1994; Pin *et al.*, *Neuropharmacology* 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). También se ha demostrado un papel para los receptores de glutamato metabotrópicos en la nocicepción y la analgesia (Meller *et al.*, *Neuroreport* 4:879, 1993). También se ha mostrado que los receptores de glutamato metabotrópicos son requeridos para la inducción de potenciación hipocampal a largo plazo y la depresión cerebelar a corto plazo (Bashir *et al.*, *Nature* 363:347, 1993; Bortolotto *et al.*, *Nature* 368:740, 1994; Aiba *et al.*, *Cell* 79: 365 y *Cell* 79: 377, 1994).

Se ha informado que los antagonistas del receptor de glutamato metabotrópico tienen efectos sobre diversas actividades fisiológicas. Por ejemplo, se informó que el trans-ACPD posee efectos proconvulsivantes y anticonvulsivantes (Zheng y Gallagher, *Neurosci. Lett.* 125:147, 1991; Sacaan y Schoepp, *Neurosci. Lett.* 139:77, 1992; Taschenberger *et*

al., Neuroreport 3:629, 1992; Sheardown, Neuroreport 3:916, 1992), y efectos neuroprotectores *in vitro* e *in vivo* (Pizzi *et al.*, J. Neurochem. 61:683, 1993; Koh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9431, 1991; Birrell *et al.*, Neuropharmacol. 32:1351, 1993; Siliprandi *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 219:173, 1992; Chiamulera *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 216:335, 1992). Se mostró que el antagonista del receptor de glutamato metabotrópico L-AP3 protege contra la lesión hipóxica *in vitro* (Opitz y Reymann, Neuroreport 2:455, 1991). Un estudio posterior informó de que el trans-ACPD producía neuroprotección que era antagonizada por L-AP3 (Opitz y Reymann, Neuropharmacol. 32:103, 1993). Se mostró que la (5)-4C3HPG protege contra convulsiones audiogénicas en ratones DBA/2 (Thomsen *et al.*, J. Neurochem. 62:2492, 1994). Otros efectos moduladores esperados de los moduladores del receptor de glutamato metabotrópico incluyen transmisión sináptica, muerte neuronal, desarrollo neuronal, plasticidad sináptica, aprendizaje espacial, memoria olfativa, control central de la actividad cardíaca, despertar, movimientos de control, y control del reflejo vestibulo-ocular (para revisiones, véase Nakanishi, Neuron 13:1031-37, 1994; Pin *et al.*, Neuropharmacology 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1417, 1995).

Las estructuras de mGluR-moléculas activas actualmente conocidas en la técnica se limitan a aminoácidos que parecen actuar uniéndose al sitio de unión del glutamato (Pin, *et al.*, Neuropharmacology 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1418). Esto limita el intervalo de propiedades farmacológicas y las potenciales utilidades terapéuticas de tales compuestos. Además, el intervalo de especificidades farmacológicas asociadas con estos mGluR-moléculas activas no permite la completa discriminación entre los diferentes subtipos de receptores de glutamato metabotrópicos (Pin *et al.*, Neuropharmacology 34:1, 1995 y Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1418). No se puede hacer un rápido progreso en el campo de mGluR-moléculas activas hasta que se descubran agonistas, antagonistas y moduladores de mGluR más potentes y más selectivos (Pin *et al.*, Neuropharmacology 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1418). Ciertamente, ningún mGluR-moléculas activas está actualmente bajo desarrollo clínico. El alto rendimiento del cribado funcional de compuestos y quimiotecas utilizando líneas celulares que expresan mGluRs individuales representa una aproximación importante a la identificación de tales compuestos novedosos (Knopfel *et al.*, J. Med. Chem. 38:1418).

Varios laboratorios han construido líneas celulares que expresan receptores de glutamato metabotrópicos que parecen funcionar apropiadamente (Abe *et al.*, J. Biol. Chem. 267:13361, 1992; Tanabe *et al.*, Neuron 8:169, 1992; Aramori y Nakanishi, Neuron 8:757, 1992; Nakanishi, Science 258:597, 1992; Thomsen *et al.*, Brain Res. 619:22, 1992; Thomsen *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 227:361, 1992; O'Hara *et al.*, Neuron 11:41, 1993; Nakjima *et al.*, J. Biol. Chem. 268:11868, 1993; Tanabe *et al.*, J. Neurosci. 13:1372, 1993; Saugstad *et al.*, Mol. Pharmacol. 45:367, 1994; Okamoto *et al.*, J. Biol. Chem. 269:1231, 1994; Gabellini *et al.*, Neurochem. Int. 24:533, 1994; Lin *et al.*, Soc. Neurosci. Abstr. 20:468, 1994; Flor *et al.*, Soc. Neurosci. Abstr. 20:468, 1994; Flor *et al.*, Neuropharmacology 34:149, 1994). Otros informes han indicado que la expresión de mGluR funcional que expresan líneas celulares no es predecible. Por ejemplo, Tanabe *et al.*, (Neuron 8:169, 1992) fueron incapaces de demostrar la expresión funcional de mGluR3 y mGluR4, e indicaron la dificultad de obtener la expresión de mGluR1 nativo en células CHO. Gabellini *et al.*, (Neurochem. Int. 24:533, 1994) también indicaron las dificultades con la expresión de mGluR1 en células HEK 293 y es posible que alguna de estas dificultades se pueda deber a las características de desensibilización de estos receptores. Además, las metodologías de cribado útiles para la identificación de compuestos activos en mGluRs de la Clase I no están fácilmente disponibles para la identificación de compuestos activos en mGluRs de la Clase II y III y *vice versa* debido a las diferencias en el acoplamiento del segundo mensajero. Finalmente, se ha indicado que los mGluRs se desensibilizan rápidamente tras la estimulación agonista lo que puede afectar adversamente a la viabilidad de las líneas celulares que expresan estos receptores y hace difícil el uso de mGluRs nativos para cribado.

Diferentes receptores acoplados a proteína G presentan afinidades de ligando y acoplamiento a segundos mensajeros diferentes. Todos los receptores acoplados a proteína G tienen una estructura similar: un dominio extracelular del extremo N (ECD), un dominio transmembranal 7 (TMD) que comprende siete hélices que atraviesan la membrana y que por lo tanto definen tres bucles intracelulares y tres extracelulares, y una cola citoplásmica (CT)), pero difieren en la secuencia exacta que comprende cada región. Se piensa que estas diferencias de secuencia proporcionan la especificidad de las interacciones del receptor con los ligandos de composiciones químicas diferentes y la interacción del receptor con diferentes proteínas G. La construcción de receptores quiméricos en los que se intercambian segmentos pequeños de péptidos de los receptores relacionados utilizando técnicas de recombinación de ADN ha demostrado ser una técnica útil para evaluar la participación de diferentes regiones de secuencia en la determinación de esta especificidad. Por ejemplo, el intercambio de los terceros bucles intracelulares entre diversos receptores adrenérgicos, muscarínicos de acetilcolina y angiotensina da como resultado la conversión de la especificidad del acoplamiento de proteína G. Así, los receptores cuya activación normalmente da como resultado la inhibición o activación de la adenilato ciclasa se pueden convertir en receptores con las mismas o similares propiedades de unión a ligando pero cuya activación conduce a la estimulación de la fosfolipasa-C y vice versa (Kobilka *et al.*, Science 240:1310, 1988; Wess *et al.*, FEBS Lett. 258:133, 1989; Cotecchia *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 87:2896, 1990; Lechleiter *et al.*, EMBO J. 9:4381, 1990; Wess *et al.*, Mol. Pharmacol. 38:517, 1990; Wong *et al.*, J. Biol. Chem. 265:6219, 1990; Cotecchia *et al.*, J. Biol. Chem. 267:1633, 1992; Wang *et al.*, J. Biol. Chem. 270:16677, 1995). En estos receptores que comparten el tercer bucle intracelular juega un papel importante en la determinación de la especificidad del acoplamiento de proteína G. Mientras que tales experimentos indican que el tercer bucle intracelular juega un papel importante en la determinación de la especificidad del acoplamiento de la proteína G en estos receptores relacionados, han fallado en identificar algún motivo de secuencia de aminoácidos específica que sea responsable. Además, se ha mostrado que el tercer bucle intracelular es por lo menos parcialmente responsable de la desensibilización de tales receptores (Okamoto *et al.*, Cell 67:723, 1991; Liggett *et al.*, J. Biol. Chem. 267:4740, 1992).

Los receptores de glutamato metabotrópicos están relacionados con otros receptores acoplados a proteína G en la topología global, pero no en la secuencia de aminoácidos específica. Una característica inusual de los mGluRs es sus ECDs muy grandes (aproximadamente 600 aminoácidos). En muchos otros receptores acoplados a proteína G, la unión al ligando tiene lugar dentro del 7TMD. Sin embargo, se piensa que el ECD grande de cada mGluR proporciona los determinantes de unión al ligando (Nakanishi, *Science* 258:597, 1992; O'Hara *et al.*, *Neuron* 11:41, 1993; Shigemoto *et al.*, *Neuron* 12:1245, 1994). Los mGluRs quiméricos en los que se intercambian los ECDs de los mGluRs con diferentes afinidades de ligando y acoplamiento de proteína G diferente se han utilizado para demostrar que el ECD de los mGluRs define la especificidad de ligando pero no la especificidad de proteína G (Takahashi *et al.*, *J. Bio. Chem.* 268:19341, 1993). También a diferencia de otros receptores acoplados a proteína G en los que el tercer bucle intracelular es variable en tamaño y secuencia, los terceros bucles intracelulares de los mGluRs son pequeños y extremadamente bien conservados (Brown E.M. *et al.*, *Nature* 366:575, 1993). Se han preparado mGluRs quiméricos en los que se intercambiaron los segundos bucles intracelulares y/o las colas citoplásmicas (Pin *et al.*, *EMBO J.* 13:342). Estos experimentos conducen a los investigadores a concluir que a diferencia de la mayoría de otros receptores acoplados a proteína G, "tanto el extremo C-terminal del segundo bucle intracelular como el segmento situado aguas abajo del séptimo dominio transmembranal son necesarios para la activación específica de la fosfolipasa-C por el mGluR1c" y a sugerir que el segundo bucle intracelular de los mGluRs juega el papel del tercer bucle intracelular de otros receptores acoplados a proteína G.

Se ha observado que las variantes de corte y empalme de ARNm que se dan de manera natural producen receptores de prostaglandina E3 (EP3) con propiedades de unión al ligando esencialmente idénticas pero que activan preferentemente diferentes rutas de segundo mensajero (acoplamiento a proteína G diferencial) y que exhiben propiedades de desensibilización diferentes (Namba *et al.*, *Nature* 365:166, 1993; Sgimoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:2712, 1993; Negishi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:9517, 1993). Estas isoformas variantes del receptor difieren solamente en sus colas citoplásmicas. Las isoformas con colas más largas se acoplan eficientemente a la fosfolipasa-C mientras que aquellas con las colas más cortas no lo hacen. Sin embargo, análisis de variantes de corte y empalme de ARNm que se dan de manera natural de mGluR1 y mGluR5 han indicado que sus colas citoplásmicas largas pueden no estar directamente implicadas en el acoplamiento de la proteína G (Pin *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10331, 1992; Joly *et al.*, *J. Neuroscience* 15:3970, 1995). De hecho, Pin *et al.*, (*supra*) ha establecido que "El dominio de extremo C muy largo encontrado solo en mGluRs acoplados a PLC (mGluR1 y 5) probablemente no está, sin embargo, implicado en la interacción específica con proteínas G activadoras de PLC".

Recientemente, se ha descrito el receptor de calcio (Brown E.M. *et al.*, *Nature* 366:575, 1993; Riccardi D., *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 92:131-135, 1995; Garrett J.E., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 31:12919-12925, 1995). Este CaR es el único receptor conocido que presenta homología de secuencia significativa con los mGluRs excepto por otros mGluRs. El CaR presenta aproximadamente ~25% de homología de secuencia (identidades de aminoácidos) a cualquier otro mGluR mientras que los mGluRs son >40% homólogos (identidades de aminoácidos) uno respecto a otro. El CaR está estructuralmente relacionado con los mGluRs que tienen un ECD grande que se han implicado en la función del receptor y la probable unión de ligando (Brown E.M. *et al.*, *Nature* 366:575, 1993; Pollak, M.R., *et al.*, *Cell* 75:1297-1303, 1993). Esta similitud de estructura no confiere similitud estrecha en la especificidad de unión al ligando ya que el ligando nativo para el CaR es el ion inorgánico, Ca^{2+} , y el glutamato no modula la actividad del CaR. El CaR también tiene una cola citoplásmica grande y está acoplado a la estimulación de fosfolipasa-C. Así, el CaR está estructural y funcionalmente más relacionado con mGluR1 y 5 que con otros mGluRs. Pin *et al.*, (*EMBO J.* 13:342, 1994) han observado que ciertos aminoácidos se conservan en los bucles intracelulares de los mGluRs que se acoplan a la fosfolipasa-C y diferentes aminoácidos se conservan en estas mismas posiciones en los bucles intracelulares de los mGluRs que se acoplan a la inhibición de adenilato ciclasa. Los bucles intracelulares 1 y 3 son las secuencias más altamente conservadas entre los mGluRs y el CaR (Brown E.M. *et al.*, *Nature* 366:575, 1993), pero sólo aproximadamente la mitad de estos aminoácidos se encuentran en la posición correspondiente del CaR y sólo uno de ellos es realmente el aminoácido predicho para un receptor que se acopla a fosfolipasa-C. Así, la conservación de la secuencia entre CaRs y mGluRs parece ser consistente en su mayor parte con la conservación de dominios estructurales implicados en la unión al ligando y el acoplamiento de proteína G y no proporciona evidencia para los motivos de secuencia específica en las regiones intracelulares predictivas de la especificidad de acoplamiento de proteína G. Se han obtenido y usado líneas celulares que expresan CaRs para identificar compuestos que modulan la actividad de los CaRs.

Un procedimiento de cribado ideal para identificar moléculas que afectan específicamente la actividad de diferentes mGluRs proporcionaría líneas celulares que expresan cada mGluR funcional de tal manera que cada uno se acoplará al mismo sistema de segundo mensajero y susceptible al cribado de alto rendimiento.

Ninguna de las referencias mencionadas en la presente memoria se admitirá que es técnica anterior para las reivindicaciones.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un receptor quimérico receptor de glutamato metabotrópico/receptor de calcio acoplado a proteína G (mGluR/CaR) que comprende un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y una cola citoplásmica intracelular, en el que,

un dominio o sitio de unión del ligando, sitio de acoplamiento de proteína G o sub-dominio 7TMD del CaR se sustituye con el dominio o sub-dominio homólogo del mGluR; o

un dominio o sitio de unión del ligando, sitio de acoplamiento de proteína G o sub-dominio 7TMD del mGluR se sustituye con el dominio o subdominio homólogo del CaR; y

en el que el receptor quimérico puja por un ligando natural, un agonista o antagonista del mGluR; o un ligando natural, un agonista o antagonista del CaR.

Por consiguiente, la invención concierne a (1) las proteínas del receptor quimérico que tienen secuencias de los receptores de glutamato metabotrópicos y los receptores de calcio, y fragmentos de los receptores de glutamato metabotrópicos, receptores de calcio, y receptores quiméricos; (2) los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas y fragmentos del receptor quimérico; (3) los usos de tales proteínas, fragmentos y ácidos nucleicos del receptor; (4) las líneas celulares que expresan tales ácidos nucleicos; (5) los métodos de cribado para compuestos que se unen a o modulan la actividad de los receptores de glutamato metabotrópicos o los receptores de calcio utilizando tales proteínas y fragmentos del receptor quimérico; (6) los compuestos para modular receptores de glutamato metabotrópicos o receptores de calcio identificados por tales métodos de cribado; (7) los métodos para modular receptores de glutamato metabotrópicos o receptores de calcio utilizando tales compuestos; y (8) el tratamiento de trastornos neurológicos utilizando tales compuestos.

Un uso preferido de los receptores quiméricos y los métodos de la presente invención es identificar sistemáticamente compuestos que modulan la actividad del receptor de glutamato metabotrópico. Se prevé la utilización de tales compuestos en el tratamiento de enfermedades y trastornos neurológicos.

Como se describe en los Antecedentes de la Invención más arriba, los receptores de glutamato metabotrópicos y los receptores de calcio tienen estructuras similares. Ambos tipos de receptores tienen un dominio extracelular (ECD), y dominio transmembranal siete (7TMD) y una cola citoplásmica intracelular (CT). Así, en los receptores quiméricos de la presente invención, una porción de la secuencia del receptor es la misma que u homóloga a una porción de la secuencia de un mGluR y una porción de la secuencia es la misma que u homóloga a una porción de la secuencia de un CaR. Por ejemplo, el receptor quimérico puede consistir en el ECD de un mGluR y el 7TMD y CT de un CaR. Asimismo, un receptor quimérico puede incluir el ECD y 7TMD de un mGluR y la CT de un CaR. También se pueden construir y utilizar otras combinaciones de dominios o porciones de dominios de mGluR y CaR.

Estos receptores quiméricos son de interés, en parte, porque permiten el acoplamiento de ciertos aspectos funcionales de un mGluR con ciertos aspectos funcionales de un CaR. Así, los experimentos han mostrado que ligandos conocidos en la técnica que son agonistas o antagonistas en un mGluR nativo también presentan tales actividades en receptores quiméricos en los que el dominio extracelular es procedente del mGluR. Igualmente, los experimentos han mostrado que ligandos conocidos en la técnica que modulan los mGluRs actúan sobre receptores quiméricos en los que el dominio extracelular y el 7TMD son de un mGluR. En ambos de estos casos, se espera que otros ligandos que modulan la actividad de mGluR también actuaran sobre este tipo de receptores quiméricos.

El uso de mGluRs para el cribado de compuestos activos en mGluR se ha complicado por varios factores que incluyen una desensibilización rápida del receptor tras al activación/unión del ligando y dificultades en expresar de manera estable los receptores en células recombinantes de vertebrados (véase, por ejemplo, la Fig. 8B). Algunos de los receptores quiméricos de la presente invención se pueden utilizar para superar estas dificultades técnicas y proporcionar métodos de cribado mucho mejores utilizando los aspectos más robustos de los receptores de calcio. Por ejemplo, acoplando el 7TMD y la CT del CaR con el dominio extracelular de un mGluR, o la CT del CaR al ECD y 7TMD del mGluR, el dominio extracelular del mGluR tiene el beneficio de la propiedad de acoplamiento de Gq de un CaR así como la mejora de la propiedad de una carencia de desensibilización rápida (véase, por ejemplo, la Fig. 8C). Así, un receptor quimérico tal tiene las propiedades de activación y de unión al ligando similares a las de un mGluR nativo pero teniendo el acoplamiento del segundo mensajero mejorado similar a un CaR. Por lo tanto, el receptor quimérico simplifica y posibilita cribados funcionales eficaces, prácticos y reproducibles para identificar moléculas activas del mGluR.

Para estos nuevos receptores quiméricos, no solo es novedosa la combinación de secuencias de mGluR y CaR en un receptor quimérico, sino que también es inesperado el acoplamiento exitoso de las actividades. Previamente, tal acoplamiento solo se había conseguido usando porciones de receptores con secuencias estrechamente relacionadas. En este caso la identidad de secuencia entre receptores de glutamato metabotrópicos y receptores de calcio es solo aproximadamente 19-25%, y los dos tipos de receptores comparten solamente un 25-30% de similaridad de secuencia (Brown *et al.*, Nature 366:575, 1993).

Se reconoce que los tres dominios descritos más arriba están compuestos de sub-dominios, por ejemplo, sitios de unión al ligando y sitios de acoplamiento de proteína G. Por lo tanto, para algunas aplicaciones no es necesario incluir en un receptor quimérico un dominio completo de un receptor particular para tener la actividad deseada. Por ejemplo, se puede incorporar únicamente el sitio de unión al ligando de un mGluR en un receptor quimérico en el que la mayoría o la totalidad del resto de la secuencia es homóloga a un CaR. Asimismo, en un receptor quimérico, uno de los bucles citoplásmicos del 7TMD puede ser homólogo a una secuencia de bucle de un mGluR y sustancialmente el resto de la secuencia del receptor puede ser homóloga a un CaR, o por el contrario, uno de los bucles citoplásmicos

puede ser homólogo a una secuencia de bucle de un CaR y sustancialmente el resto de la secuencia del receptor puede ser homóloga a un mGluR.

La invención también proporciona un receptor quimérico receptor de glutamato metabotrópico/receptor de calcio acoplado a proteína G (mGluR/CaR) que comprende:

- (a) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,
un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o
- (b) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,
un dominio transmembranal siete de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o
- (c) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,
un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico excepto que dicho dominio transmembranal siete comprende por lo menos un bucle citoplásmico de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o
- (d) un dominio extracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G,
un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o
- (e) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,
un dominio transmembranal siete de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o
- (f) un dominio extracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G,
un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o
- (g) un dominio extracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G,
un dominio transmembranal siete de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y
un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico.

También en realizaciones preferidas, el receptor quimérico tiene dos dominios de un receptor de glutamato metabotrópico y un dominio de un receptor de calcio, o dos dominios de un receptor de calcio y un dominio de un receptor de glutamato metabotrópico. Esto incluye cada una de las posibles combinaciones de los tres dominios. Por ejemplo, en una realización más preferida, el receptor quimérico tiene un dominio homólogo al dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio.

En otras realizaciones preferidas, el receptor quimérico tiene por lo menos un bucle citoplásmico del dominio transmembranal siete que es homólogo a un bucle citoplásmico de un receptor de glutamato metabotrópico. Igualmente, en otras realizaciones preferidas, el receptor quimérico tiene por lo menos un bucle citoplásmico homólogo a un bucle citoplásmico de un receptor de calcio.

También en otras realizaciones preferidas, el receptor quimérico tiene una secuencia de por lo menos 6 aminoácidos contiguos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio, y el resto de la secuencia del receptor quimérico es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de glutamato metabotrópico. En otras realizaciones, la secuencia homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio puede ser beneficiosamente más larga, por ejemplo por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud.

Igualmente, en otras realizaciones preferidas, el receptor quimérico tiene una secuencia de por lo menos 6 aminoácidos contiguos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de glutamato metabotrópico, y el resto de la secuencia del receptor quimérico es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio. En otras realizaciones; la secuencia homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de glutamato metabotrópico puede ser beneficiosamente más larga, por ejemplo por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición que incluye una molécula de ácido nucleico aislado, enriquecido, o purificado que codifica un receptor quimérico de la invención según se define en la presente memoria. En particular, esto incluye el ácido nucleico que codifica un receptor quimérico como se define en la presente memoria que tiene una secuencia de por lo menos 6 aminoácidos contiguos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio y una secuencia de por lo menos 6 aminoácidos contiguos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de glutamato metabotrópico. Análogamente al aspecto de más arriba, en realizaciones particulares la secuencia del receptor quimérico homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio y/o un receptor de glutamato metabotrópico puede ser beneficiosamente más larga, por ejemplo, por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud.

En realizaciones preferidas de la invención definidas en la presente memoria, el receptor quimérico tiene dos dominios homólogos a dominios de un receptor de glutamato metabotrópico y un dominio homólogo a un dominio de un receptor de calcio, o dos dominios homólogos a dominios de un receptor de calcio y un dominio homólogo a un dominio de un receptor de glutamato metabotrópico.

En otro aspecto relacionado, el ácido nucleico que codifica un receptor quimérico, según se describe más arriba, está presente en un vector de expresión replicable. Así, el vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los receptores quiméricos descritos.

También en un aspecto relacionado, la invención proporciona una célula anfitriona recombinante transformada con un vector de expresión replicable como se describe más arriba.

La invención también pone de relieve un procedimiento para la producción de un receptor quimérico; el procedimiento implica cultivar, bajo condiciones adecuadas de nutrientes, células anfitrionas procariotas o eucariotas transformadas o transfectadas con un vector de expresión replicable que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico según se describe más arriba, de una manera que permite la expresión del receptor quimérico.

Por “aislado” en referencia a un ácido nucleico se quiere decir que el ácido nucleico está presente en una forma (es decir, su asociación con otras moléculas) distinta de la encontrada en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico aislado del receptor se separa de uno o más ácidos nucleicos que están presentes en el mismo cromosoma. Preferentemente, el ácido nucleico aislado se separa de por lo menos el 90% de otros ácidos nucleicos presentes en el mismo cromosoma. Preferentemente, el ácido nucleico se proporciona como una preparación sustancialmente purificada que representa por lo menos 75%, más preferentemente 85%, lo más preferentemente 95% del total de ácidos nucleicos presentes en la preparación.

Otro ejemplo de un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico recombinante. Preferentemente, el ácido nucleico recombinante contiene ácido nucleico que codifica un receptor de glutamato metabotrópico o un fragmento de receptor de glutamato metabotrópico quimérico clonado en un vector de expresión. Un vector de expresión contiene los elementos necesarios para expresar una secuencia de ácido nucleico clonada para producir un polipéptido. Un vector de expresión contiene una región promotora (que dirige la iniciación de la transcripción del ARN) así como las secuencias de ADN que, cuando se transcriben en ARN, señalan el inicio de la síntesis. “Vector de expresión” incluye vectores que son capaces de expresar secuencias de ADN contenidas en el mismo, es decir, las secuencias de codificación están operativamente unidas a otras secuencias capaces de efectuar su expresión. Está implícito, aunque no siempre explícitamente establecido, que estos vectores de expresión deben ser replicables en el organismo anfitrión o como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Un elemento útil, pero no necesario, de un vector de expresión eficaz es una secuencia de codificación marcadora - es decir, una secuencia que codifica una proteína que da como resultado una propiedad fenotípica (por ejemplo resistencia a la tetraciclina) de las células que contienen la proteína que permite a estas células ser fácilmente identificadas. En síntesis, de “vector de expresión” se da una definición funcional, y cualquier secuencia de ADN que es capaz de efectuar la expresión de un código de ADN contenido especificado se incluye en esta terminología, ya que se aplica a la secuencia especificada. Como en la actualidad, tales vectores están frecuentemente en forma de plásmidos, así “plásmido” y “vector de expresión” se usan a menudo de manera intercambiable. Sin embargo, la invención tiene la intención de incluir esas otras formas de vectores de expresión, que incluyen vectores virales, que sirven funciones equivalentes y que pueden, de tanto en tanto, llegar a ser conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos recombinantes pueden contener ácidos nucleicos que codifican un receptor de glutamato metabotrópico quimérico, fragmento de receptor, o derivado de receptor de glutamato metabotrópico quimérico, bajo el control de sus elementos regulatorios genómicos, o bajo el control de elementos regulatorios exógenos que incluyen un promotor exógeno. Por “exógeno” se quiere decir un promotor que no está normalmente acoplado *in vivo* de manera transcripcional a la secuencia de codificación del receptor de glutamato metabotrópico o del receptor de calcio.

La invención también proporciona métodos de cribado para compuestos que se unen a y/o modulan la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico y/o un receptor de calcio. Estos métodos utilizan receptores quiméricos según se describe más arriba o secuencias de ácido nucleico que codifican tales receptores quiméricos. Tales receptores quiméricos proporcionan combinaciones útiles de características de los dos tipos de receptores, tales como combinar las características de unión de un receptor de glutamato metabotrópico con las características de señalización celular de un receptor de calcio.

Así, en otro aspecto la invención proporciona un método de cribado para un compuesto que se une a o modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico. El método implica preparar un receptor quimérico mGluR/CaR de la invención según se define en la presente memoria; introducir el receptor quimérico y un compuesto de prueba en un medio aceptable, la unión de un compuesto de prueba al receptor quimérico, o la modulación del receptor quimérico por el compuesto, que se supervisa por medios físicamente detectable para identificar los compuestos que se unen a o modulan la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico.

La invención también proporciona un método de cribado para un compuesto que se une a o modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico, utilizando un ácido nucleico que codifica un receptor quimérico. Este método implica preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor quimérico de la invención según se define en la presente memoria, insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar el receptor quimérico mGluR/CaR en una célula anfitriona, transformar una célula anfitriona con el vector, introducir la célula anfitriona transformada y un compuesto de prueba en un medio aceptable y supervisar el efecto del compuesto sobre la célula.

La célula anfitriona es preferentemente una célula eucariota.

En el contexto de los métodos de esta invención, "supervisar el efecto" del compuesto sobre una célula anfitriona se refiere a determinar los efectos del compuesto sobre uno o más procesos celulares o sobre el nivel de actividad de uno o más componentes celulares, o por detección de una interacción entre el compuesto y un componente celular.

Ciertos fragmentos del receptor son capaces de activar una o más respuestas celulares de una manera similar al receptor del que se derivó el fragmento.

La invención también proporciona un método de cribado para un compuesto que se une a o modula un receptor de glutamato metabotrópico y/o un receptor de calcio acoplado a proteína G que comprende las etapas de:

- (a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer fragmento que comprende:
 - i) el dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, o
 - ii) el dominio extracelular y el dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico,
- (b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho primer fragmento en una célula anfitriona,
- (c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),
- (d) recuperar el primer fragmento a partir de la célula anfitriona,
- (e) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo fragmento que comprende:
 - i) el dominio transmembranal siete y el dominio de la cola citoplásmica de un receptor de calcio, o
 - ii) el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio acoplado a proteína G, o
 - iii) el dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico y el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio,
- (f) insertar la secuencia de (e) en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho segundo fragmento en una célula anfitriona,
- (g) transformar una célula anfitriona con el vector de (f),
- (h) recuperar el segundo fragmento a partir de la célula anfitriona de (g), y
 - i) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) i) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) i) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional según se define en la presente memoria y dicho compuesto en un medio aceptable, o

ES 2 308 779 T3

ii) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) ii) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) ii) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional según se define en la presente memoria y dicho compuesto en un medio aceptable, o

iii) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) iii) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) iii) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional según se define en la presente memoria y dicho compuesto en un medio aceptable, o

iv) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) iii) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) iv) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(j) supervisar la unión y/o modulación del compuesto por medios físicamente detectables.

Para ciertos receptores es posible utilizar fragmentos de dos receptores diferentes para identificar sistemáticamente compuestos que se unen a o modulan un receptor.

La invención también proporciona un método de cribado para compuestos que modulan la actividad tanto de un receptor de glutamato metabotrópico como de un receptor de calcio, que comprende las etapas de:

(a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico según se define en la presente memoria,

(b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona,

(c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),

(d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula.

La invención también proporciona un método de determinar el sitio de acción de:

1) un compuesto activo del receptor de glutamato metabotrópico, que comprende las etapas de:

(a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico según se define en la presente memoria,

(b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona,

(c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),

(d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula, o

2) un compuesto activo del receptor de calcio, que comprende las etapas de:

(a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico según se define en la presente memoria,

(b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona,

(c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),

(d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula.

Así, “sitio de acción” se refiere a la(s) localización(es) sobre el receptor que están implicadas en la interacción con un ligando natural para ese receptor, o con otro compuesto de interés. Por ejemplo, para un compuesto que

modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico mediante la unión al receptor, el sitio de acción puede incluir secuencias de aminoácidos asociadas con la unión del compuesto al receptor, pero también puede incluir otras secuencias. Tales otras secuencias pueden, por ejemplo, incluir secuencias cuya estructura secundaria o terciaria se altera en respuesta a la unión del compuesto.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática de las diversas quimeras descritas en la presente memoria, que ilustra los dominios extracelulares, dominios transmembranales 7, y dominios de cola citoplásmica intracelular de las quimeras.

La Figura 2 (a-h) es una representación de la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del pmGluR1/CaR, descritas en el Ejemplo 2.

La Figura 3 (a-h) es una representación de la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del pCaR/R₁, descritas en el Ejemplo 3.

La Figura 4 (a-g) es una representación de la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del pratCH3, descritas en el Ejemplo 4.

La Figura 5 (a-g) es una representación de la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del phCH4, descritas en el Ejemplo 4.

La Figura 6 es una representación gráfica que muestra la activación del mGluR1/CaR por los antagonistas de mGluR1 quisqualato y 1-glutamato como se mide por corrientes Cl⁻ generadas en respuesta a la liberación de Ca²⁺ intracelular en el ovocito.

La Figura 7 es una representación gráfica de la activación del CaR y la quimera CaR/R1 por aumento del calcio extracelular. Se muestran las amplitudes de la respuesta (corrientes Cl⁻ en respuesta al aumento de Ca²⁺ intracelular). Los datos muestran que el CaR/R1 se activa mediante Ca²⁺ extracelular de una manera similar al CaR.

La Figura 8 es una representación gráfica que muestra que el glutamato extracelular provoca aumentos oscilatorios en la corriente Cl⁻ en ovocitos de *Xenopus* inyectados con a) ARN ratmGluR1 y b) ARN ratCH3. Sin embargo, cuando a los ovocitos se les suministra repetidamente agonista, el receptor mGluR1 de rata se desensibiliza y no activa la liberación de Ca²⁺ intracelular. El RatCH3, que codifica la cola citoplásmica del CaR no se desensibiliza como el mGluR1 de rata nativo y es así susceptible a desafíos repetidos con compuestos.

La Figura 9 es una representación gráfica que muestra aumentos en el calcio intracelular inducidos por el calcio extracelular en células HEK293 establemente transfectadas cargadas de fura-2 que expresan el pCEPCaR/R1.

Descripción detallada

Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden hacer diversas sustituciones y modificaciones a la invención descrita en la presente memoria.

I. Definiciones

Lo siguiente es una lista de algunas de las definiciones utilizadas en la presente descripción. Estas definiciones han de entenderse a la luz de toda la descripción proporcionada en la presente memoria.

Por “complemento en la anestesia general” se entiende un compuesto utilizado en conjunción con un agente anestésico que disminuye la capacidad para percibir dolor asociado con la pérdida de consciencia producida por el agente anestésico.

Por “alodinia” se entiende dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor.

Por “analgésico” se entiende un compuesto que capaz de aliviar el dolor alterando la percepción de estímulos nociceptivos sin producir anestesia que da como resultado la pérdida de consciencia.

Por “actividad analgésica” se entiende la capacidad para reducir el dolor en respuesta a un estímulo que normalmente sería doloroso.

Por “actividad anticonvulsivante” se entiende la eficacia en reducir convulsiones tales como las producidas por crisis parciales simples, crisis parciales complejas, estado epiléptico, y crisis inducidas por traumas tal como ocurre después de una lesión craneal, incluyendo la cirugía craneal.

Por “se une a o modula” se entiende que el agente puede unirse y modular la actividad de un receptor, o el agente puede o unirse a o modular la actividad de un receptor.

Por “causalgia” se entiende un trastorno doloroso asociado con la lesión de los nervios periféricos.

Por “dolor central” se entiende el dolor asociado con una lesión del sistema nervioso central.

Por “actividad de mejora de la cognición” se entiende la capacidad de mejorar la adquisición de memoria o el funcionamiento de una tarea aprendida. También por “actividad de mejora de la cognición” se entiende la capacidad de mejorar los procesos normales de pensamiento racional y el razonamiento.

Por “potenciador de la cognición” se entiende un compuesto capaz de mejorar el aprendizaje y la memoria.

Por “eficacia” se entiende que un nivel estadísticamente significativo de la actividad deseada es detectable con un compuesto elegido; por “significativo” se entiende una significación estadística al nivel de $p < 0,05$.

Por “homólogo” se entiende un equivalente funcional al dominio, la secuencia de aminoácidos, o la secuencia de ácido nucleico, que tiene la secuencia de ácido nucleico y/o aminoácidos similar y conserva, en alguna extensión, una o más actividades del receptor relacionado. Los dominios o secuencias homólogas de receptores tienen por lo menos 50% de similitud de secuencia, preferentemente 70%, más preferentemente 90%, incluso más preferentemente 95% de similitud de secuencia al receptor relacionado. “Similitud de secuencia” se refiere a la “homología” observada entre secuencias de aminoácidos en dos polipéptidos diferentes, independientemente del origen del polipéptido. Así, homólogo incluye situaciones en las que las secuencias de ácido nucleico y/o de aminoácidos son iguales. En frases relacionadas, la referencia a una secuencia, sub-dominio, o dominio que es “a partir de un receptor de glutamato metabotrópico” o “de un receptor de glutamato metabotrópico” significa que la porción es la misma que u homóloga a una porción de un receptor de glutamato metabotrópico; igual que las referencias a porciones que son “a partir de un receptor de calcio” o “de un receptor de calcio” también indican que las porciones son las mismas u homólogas a las porciones de un receptor de calcio. Estas frases se pueden utilizar en referencia a secuencias de aminoácidos y/o secuencias nucleicas.

La capacidad del dominio o secuencia homóloga de conservar alguna actividad se puede medir utilizando técnicas descritas en la presente memoria. Tales dominios homólogos también pueden ser derivados. Los derivados incluyen una modificación que ocurre durante o después de la traducción, por ejemplo, por fosforilación, glicosilación, reticulación, acilación, ruptura proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo, molécula de membrana u otro ligando (véase Ferguson *et al.*, 1988, Ann. Rev. Biochem. 57:285-320).

Los tipos específicos de derivados también incluyen alteraciones de aminoácidos tales como deleciones, sustituciones, adiciones y modificaciones de aminoácidos. Una “delección” se refiere a la ausencia de uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido en cuestión. Una “adición” se refiere a la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido en cuestión. Las adiciones y deleciones a un polipéptido pueden ser en el término amino, el término carboxi, y/o internas. “Modificación” de aminoácido se refiere a la alteración de un aminoácido que se da de manera natural para producir un aminoácido que no se da de manera natural. Una “sustitución” se refiere al reemplazo de uno o más residuo(s) de aminoácido por otro(s) residuo(s) de aminoácido en el polipéptido. Los derivados pueden contener diferentes combinaciones de alteraciones, incluyendo más que una alteración, y diferentes tipos de alteraciones.

Aunque el efecto de un cambio de aminoácido varía dependiendo de factores tales como fosforilación, glicosilación, enlaces intracadena, estructura terciaria, y el papel del aminoácido en el sitio activo o un posible sitio alostérico, se prefiere generalmente que el aminoácido sustituido sea del mismo grupo que el aminoácido que se reemplaza. Hasta cierto punto, los siguientes grupos contienen aminoácidos que son intercambiables: los aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina; los aminoácidos ácidos, ácidos aspártico y glutámico; los aminoácidos polares neutros serina, treonina, cisteína, glutamato, asparaguina y, en menor grado, metionina; los aminoácidos alifáticos no polares glicina, alanina, valina, isoleucina y leucina (no obstante, debido al tamaño, la glicina y la alanina están más estrechamente relacionadas y la valina, isoleucina y leucina están más estrechamente relacionadas); y los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. Además, aunque clasificados en categorías diferentes, la alanina, glicina y serina parecen ser intercambiables hasta cierto punto, y la cisteína adicionalmente encaja en este grupo, o se puede clasificar con los aminoácidos neutros polares.

Aunque la prolina es un aminoácido neutro no polar, su reemplazo representa dificultades, debido a sus efectos sobre la conformación. Por tanto, las sustituciones por o de prolina no son preferidas, excepto cuando se puedan obtener los mismos o similares resultados conformacionales. Las propiedades de los residuos de prolina que confieren conformación se pueden obtener si uno o más de éstos es (son) sustituido(s) por hidroxiprolina (Hyp).

Los ejemplos de aminoácidos modificados incluyen los siguientes: aminoácidos no polares neutros alterados tales como ω -aminoácidos de la fórmula $H_2N(CH_2)_nCOOH$, en la que n es 2-6, sarcosina (Sar), t-butilalanina (t-BuAla), t-butilglicina (t-BuGly), N-metilisoleucina (N-Melle), y norleucina (Nleu); aminoácidos aromáticos neutros alterados tales como fenilglicina; aminoácidos polares pero neutros alterados tales como citrulina (Cit) y sulfóxido de metionina (MSO); aminoácidos neutros y no polares alterados, tales como ciclohexilalanina (Cha); aminoácidos ácidos alterados, tales como ácido cisteico (Cya); y aminoácidos básicos alterados tales como ornitina (Orn).

Los derivados preferidos tienen una o más alteraciones de aminoácidos que no afectan significativamente a la actividad receptora de la proteína receptora en cuestión. En las regiones de la proteína del receptor no necesarias para la actividad del receptor los aminoácidos se pueden alterar, añadir o sustituir con menos riesgo de afectar a la actividad. En las regiones requeridas para la actividad del receptor, las alteraciones de aminoácidos son menos preferidas ya que hay un mayor riesgo de afectar a la actividad del receptor. Tales alteraciones deben ser alteraciones conservadoras. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácido en la secuencia se pueden sustituir por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional.

Las regiones conservadas tienden a ser más importantes para la actividad de la proteína que las regiones no conservadas. Se pueden utilizar procedimientos estándar para determinar las regiones conservadas y no conservadas importantes para la actividad del receptor utilizando técnicas de mutagénesis o análisis de delección *in vitro* y midiendo la actividad del receptor según se describe en la presente descripción.

Se pueden producir derivados usando técnicas químicas estándar y técnicas de ácidos nucleicos recombinantes. Las modificaciones a un polipéptido específico pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida a sitios y sustitución de aminoácidos durante la síntesis en fase sólida, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones en anfitriones que producen el polipéptido. Se pueden obtener polipéptidos, incluyendo derivados, usando técnicas estándar tales como las descritas en la Sección I.G.2. *supra*, y por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Por ejemplo, el Capítulo 15 de Sambrook describe procedimientos para mutagénesis dirigida a sitios de DNA clonado.

Por “hiperalgesia” se entiende un aumento de la respuesta a un estímulo que normalmente es doloroso.

Por “mínimo” se entiende que cualquier efecto secundario del fármaco es tolerado por un individuo medio, y así que el fármaco se puede utilizar para terapia de la enfermedad o trastornos elegidos como objetivo. Tales efectos secundarios son bien conocidos en la técnica. Preferentemente, efectos secundarios mínimos son los que serían considerados por la FDA como tolerables para la aprobación del fármaco para una enfermedad o trastornos elegidos como objetivo.

Por “modular” se entiende causar un aumento o disminución en una actividad de un receptor celular.

Por “modulador” se entiende un compuesto que modula un receptor, incluidos agonistas, antagonistas, moduladores alostéricos, y similares. Preferentemente, el modulador se une al receptor.

Por “relajante muscular” se entiende un compuesto que reduce la tensión muscular.

Por “neuralgia” se entiende dolor en la distribución de un nervio o nervios.

Por “enfermedad neurodegenerativa” se entiende una enfermedad neurológica que afecta a las células del sistema nervioso central dando como resultado la disminución progresiva en la capacidad de las células del sistema nervioso de funcionar correctamente. Los ejemplos se enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, y enfermedad de Parkinson.

Por “trastorno o enfermedad neurológica” se entiende un trastorno o enfermedad del sistema nervioso. Los ejemplos de trastornos o enfermedades neurológicas incluyen accidente cerebrovascular hemorrágico e isquémico focal y global, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño de la célula nerviosa inducido por hipoxia como en la parada cardíaca o sufrimiento neonatal, y epilepsia.

Por “actividad neuroprotectora” se entiende la eficacia en el tratamiento de los trastornos o enfermedades neurológicas.

Por “medios físicamente detectables” se entiende cualquier medio conocido para los expertos normales en la técnica para detectar la unión a o la modulación de los receptores mGluR o CaR, incluidos los métodos de unión y cribado descritos en la presente memoria. Así, por ejemplo, tales medios pueden incluir métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, ensayos de unión competitiva, y ensayos de una función celular particular, así como otras técnicas.

Por “potente” se entiende que el compuesto tiene un valor de EC_{50} (concentración que produce una activación la mitad de la máxima), o IC_{50} (concentración que produce la inhibición mitad de la máxima), o K_d (concentración que produce la unión mitad de la máxima) en un receptor de glutamato metabotrópico, con respecto a una o más actividades del receptor, de menos de $100\ \mu M$, más preferentemente menos de $10\ \mu M$, e incluso más preferentemente menos de $1\ \mu M$.

Por “selectivo” se entiende que el compuesto activa, inhibe la activación y/o se une a un receptor de glutamato metabotrópico a una concentración más baja que aquella en que el compuesto activa, inhibe la activación y/o se une a un receptor de glutamato ionotrópico. Preferentemente, la diferencia de concentración es un factor de 10 (10 veces), más preferentemente 50 veces, e incluso más preferentemente 100 veces.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un compuesto que produce el efecto terapéutico deseado en un paciente. Por ejemplo, en referencia a una enfermedad o trastorno, es la cantidad que reduce en algún grado uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y vuelve normales, parcial o totalmente, parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados o causales de la enfermedad o trastorno. Cuando se utiliza para tratar terapéuticamente a un paciente es una cantidad que se espera que esté entre 0,1 mg/kg a 100 mg/kg, preferentemente menos de 50 mg/kg, más preferentemente menos de 10 mg/kg, más preferentemente menos de 1 mg/kg. Preferentemente, la cantidad proporciona una concentración eficaz en un receptor de glutamato metabotrópico de aproximadamente 1 nM a 10 μ M del compuesto. La cantidad de compuesto depende de su EC_{50} (IC_{50} en el caso de un antagonista) y de la edad, tamaño, y enfermedad asociados con el paciente.

II. Técnicas

A. Receptores Quiméricos y Aproximación General a sus Usos

Como se indica en el Compendio más arriba, esta invención concierne a receptores quiméricos, que incluyen porciones de proteínas tanto del receptor de glutamato metabotrópico como del receptor de calcio. También concierne a los fragmentos de receptores de glutamato metabotrópicos y de receptores de calcio. Los aspectos relacionados incluyen los ácidos nucleicos que codifican tales receptores quiméricos y fragmentos, los usos de tales receptores, fragmentos y ácidos nucleicos, y las líneas celulares que expresan tales ácidos nucleicos. Los usos descritos incluyen métodos de cribado de compuestos que se unen a o modulan la actividad de los receptores de glutamato metabotrópicos utilizando tales receptores y fragmentos quiméricos. La invención por lo tanto permite la identificación de compuestos para modular receptores de glutamato metabotrópicos o receptores de calcio, o para tratar ciertos trastornos.

Los experimentos llevados a cabo sobre varios receptores acoplados a proteína G han sugerido el principio general de que la especificidad del acoplamiento de proteína G y la desensibilización del receptor están determinadas principalmente por secuencia de aminoácidos que son intracelulares (es decir, secuencias con uno o más de los tres bucles citoplásmicos y/o la cola citoplásmica intracelular). Recientes experimentos en los que se formaron receptores quiméricos combinando distintos segmentos de proteína de diferentes receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs), sugieren que, en estos receptores, la especificidad de unión al ligando está determinada por el dominio extracelular.

Así, las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen receptores quiméricos que consisten en el dominio extracelular (ECD) de un mGluR y el dominio transmembranal siete (7TMD) y la cola citoplásmica intracelular (CT) de un receptor de calcio (CaR) que responden a moléculas activas del mGluR por transducción de señal análoga a la observada cuando moléculas activas del CaR actúan sobre un CaR.

Igualmente, en otras realizaciones preferidas, la invención incluye receptores quiméricos en los que el dominio de cola citoplásmica C-terminal intracelular de un mGluR elegido se reemplaza por la cola C-terminal de un receptor de calcio. La cola del extremo C abarca la región citoplásmica que sigue a la región transmembranal séptima.

Las realizaciones preferidas de la invención también incluyen receptores quiméricos en los que las secuencias de péptidos abarcan todos o alguno de los dominios de bucle citoplásmico (entre las regiones transmembranales primera y segunda, la tercera y cuarta, y la quinta y sexta) de un mGluR se han reemplazado igualmente con secuencias de péptidos correspondientes de uno o más CaRs. En particular tales realizaciones incluyen receptores quiméricos que tienen el ECD de un mGluR, el 7TMD de un mGluR, y la cola del extremo C de un receptor de calcio, excepto que uno o más sub-dominios del 7TMD se sustituyen con secuencias de un CaR. Esto incluye específicamente receptores en los que uno o más de los bucles citoplásmicos del 7TMD se reemplazan con secuencias de un CaR. Tal sustitución de bucles citoplásmicos se puede hacer por separado o en cualquier combinación. En general, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales "dominios" o "sub-dominios" elegidos como objetivo se pueden "intercambiar" individualmente o en combinación.

Estos receptores quiméricos son desconocidos en la técnica y su función es inesperada porque los receptores quiméricos funcionales se habían construido con éxito previamente sólo por combinación de porciones de receptores mucho más estrechamente relacionados. Ciertamente, la identidad de secuencia entre receptores de glutamato metabotrópicos y receptores de calcio es solo aproximadamente 19-25%, y los dos tipos de receptores comparten solamente un 25-30% de similitud de secuencia (Brown E.M. *et al.*, Nature 366:575, 1993).

Los experimentos han mostrado que ligandos conocidos en la técnica que son agonistas o antagonistas sobre los mGluRs nativos también presentan tales actividades en los receptores quiméricos en los que el dominio extracelular es procedente de un mGluR. También se predice que otros ligandos que se unen al ECD y modulan la actividad de los mGluRs, por ejemplo, agonistas, antagonistas, moduladores alostéricos y similares, actúan sobre tales receptores quiméricos. Los experimentos también han mostrado que ligandos conocidos en la técnica que modulan los mGluRs actúan sobre los receptores quiméricos en los que el ECD y 7TMD son de un mGluR. También se predice que otros ligandos que modulan la actividad del mGluR actúan sobre este tipo de receptores quiméricos sin importar si se unen al ECD o al 7TMD de los mGluRs.

Los receptores quiméricos están unidos a funciones intracelulares o de segundo mensajero de un modo similar a la unión conocida para receptores de calcio no modificados. Por ejemplo, como es el caso para los CaRs, los receptores quiméricos también se acoplan a través de una(s) proteína(s) G a la activación de la fosfolipasa C, a la generación de

inositol fosfatos y/o a la liberación de iones calcio a partir de almacenamientos intracelulares. Aunque los mGluRs se desensibilizan rápidamente tras la unión/activación del ligando, los CaRs no lo hacen, permitiendo el cribado de alto rendimiento más eficaz de compuestos activos en el CaR y la expresión estable del receptor en líneas celulares recombinantes. Es importante destacar que los receptores mGluR/CaR quiméricos no se desensibilizan rápidamente tra la unión/activación del ligando y por lo tanto se pueden utilizar eficazmente para el cribado de alto rendimiento. Además, los receptores quiméricos se pueden expresar funcionalmente en líneas celulares estables.

Se pueden preparar células que expresan tales receptores quiméricos y utilizar en ensayos funcionales para identificar compuestos que modulan actividades de mGluRs seleccionados. Por ejemplo, aumentos en los niveles intracelulares de calcio que resultan de la activación del receptor se pueden seguir mediante el uso de colorantes quelantes de calcio fluorescentes. Se han descrito ensayos funcionales para identificar moléculas activas en receptores de calcio (véase por ejemplo, la solicitud de patente publicada PCT "Calcium Receptor-Active Molecules," PCT No. US93/01642 (WO94/18959)).

Una práctica cada vez más común en el descubrimiento de fármacos moderno es el uso de diversos ensayos específicos para el sitio elegido como objetivo para identificar moléculas específicas con las actividades de interés. Estos ensayos seleccionan moléculas de fármacos líderes a partir de grandes colecciones o colecciones de moléculas (por ejemplo, colecciones combinatorias, quimiotecas privadas mantenidas por grandes compañías farmacéuticas, etc.). Las moléculas líderes de fármacos se "seleccionan" cuando se unen a las dianas farmacológicas de interés y así modifican potencialmente las actividades de estas dianas. Los ensayos pueden ser de muchos tipos que incluyen ensayos de desplazamiento de unión directos o ensayos funcionales indirectos. Para desarrollar con éxito y utilizar un ensayo para aislar compuestos terapéuticos líderes, primero se debe identificar y aislar la molécula diana (por ejemplo, el receptor). Se han descrito muchos ensayos funcionales en la bibliografía para identificar moléculas activas en diversos receptores y estos proporcionan ventajas únicas sobre los ensayo de unión. No es necesario conocer, *a priori*, que ligandos modulan la actividad del receptor *in vivo*, ni es necesario saber la función fisiológica exacta del receptor. Los compuestos identificados en ensayos funcionales y en posteriores esfuerzos de química médica se pueden utilizar como compuestos de prueba experimentales para obtener tal conocimiento.

Mientras que actualmente se conocen ocho mGluRs distintos, sus funciones discretas permanecen en gran medida sin detallar. Sin embargo, se buscan moléculas activas en mGluRs por las compañías farmacéuticas porque estos receptores se encuentran en el sistema nervioso central y se sabe que están implicados en la regulación de procesos relacionados con memoria, funciones motoras, sensación de dolor, neurodegeneración y similares. Así, se pueden utilizar compuesto que modulan mGluRs en el tratamiento de trastornos o enfermedades que afectan a la memoria, cognición, y función motora (por ejemplo, en convulsiones) así como en el tratamiento del dolor y de trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, apoplejía, enfermedad de Alzheimer y similares).

Se pueden construir pruebas de detección sistemática para identificar moléculas activas en mGluRs utilizando mGluRs clonados. Sin embargo, los cribados funcionales utilizando mGluRs nativos son problemáticos. En primer lugar, la mayoría de los mGluRs se acoplan mediante proteínas G_i y esto limita su uso en ensayos funcionales porque las proteínas G_i están unidas a inhibición de adenilato ciclasa y cambios en adenilato ciclasa no se miden fácilmente en cribados funcionales de alto rendimiento diseñados para seleccionar moléculas líderes de fármacos a partir de grandes quimiotecas.

Los receptores que se acoplan a través de otras proteínas G a la activación de fosfolipasa C (por ejemplo, receptores acoplados a G_q) no padecen este inconveniente, así inicialmente se pensó que mGluR1 y mGluR5 podían encontrar utilidad en ensayos funcionales porque estos dos mGluRs se acoplan a través de proteína(s) G_q a funciones intracelulares medibles (por ejemplo, activación de fosfolipasa C, generación de inositol fosfatos y la liberación de iones calcio a partir de almacenamientos intracelulares).

Una segunda limitación se presenta aquí, sin embargo, porque estos mGluRs particulares se desensibilizan rápidamente tras la unión al agonista. Es decir, la respuesta funcional desaparece rápidamente y no se puede recuperar rápidamente (véase por ejemplo la Figura 8a). Además, no siempre ha sido posible obtener líneas celulares estables completamente funcionales que expresan mGluRs sin importar la proteína G a la que se acoplan (Tanabe *et al.*, 1992, Neuron 8:169-179; Gabellini *et al.*, 1994, Neurochem Int. 24:533-539). Así, se deben superar dificultades técnicas no triviales para utilizar mGluRs nativos de una manera óptima en ensayos de cribado funcional de alto rendimiento.

La invención descrita en la presente memoria supera estas dificultades técnicas y proporciona un método de cribado muy mejorado utilizando los aspectos más robustos de los receptores de calcio que no se desensibilizan rápidamente tras la unión/activación del ligando y se pueden expresar de manera estable en células recombinantes de vertebrados (véase por ejemplo, la Figura 8b y véase también la solicitud de patente publicada PCT "Calcium Receptor-Active Molecules," PCT No. US93/01642 (WO94/18959)).

Así, por ejemplo, acoplando el 7TMD y la CT del CaR al dominio extracelular del mGluR, o la CT del CaR al ECD y 7TMD del mGluR, el dominio extracelular del mGluR tiene el beneficio de la propiedad de acoplamiento de G_q de un CaR, así como la mejora de la propiedad de una carencia de desensibilización rápida (véase, por ejemplo, la Fig. 8c). Así, la presente invención proporciona receptores quiméricos con propiedades de unión al ligando y activación similares a las de los mGluRs nativos pero con acoplamiento de segundo mensajero mejorado similar a los CaRs.

Así, ya que los receptores quiméricos simplifican y permiten cribados funcionales eficaces, prácticos y reproducibles para identificar moléculas activas en mGluR, las composiciones y métodos de la presente invención son útiles para la identificación de moléculas que modulan la actividad del mGluR o la actividad del receptor de calcio. Estas pueden, por ejemplo, incluir agonistas, antagonistas, moduladores alostéricos, y similares. Por ejemplo, los receptores quiméricos contruados para cribar compuestos activos en receptores de glutamato metabotrópicos pueden emplear las propiedades de señalización de ciertos dominios de un receptor de calcio. Un receptor quimérico tal se aprovecharía de ciertas propiedades únicas asociadas con el acoplamiento inducido por el agonista del receptor de calcio a proteínas G que activa la fosfolipasa C y moviliza el calcio intracelular. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, la carencia de desensibilización/regulación por disminución inducida por el ligando que se asocia con la activación de ligando de los receptores de glutamato metabotrópicos. Así, las propiedades de señalización superiores del receptor de calcio se pueden transferir a receptores de glutamato metabotrópicos que normalmente no se acoplan a proteínas G que activan la fosfolipasa C y movilizan el calcio intracelular tales como los que se acoplan a G_i .

En ciertas realizaciones, se utilizan células recombinantes que expresan tales receptores quiméricos en métodos de cribado. Las células obtendrán propiedades, tales como las indicadas más arriba, que facilitan su uso en ensayos funcionales de alto rendimiento, y proporcionan así un método más eficaz de cribado para compuestos que se unen a o modulan la actividad del receptor de glutamato metabotrópico.

Generalmente, los receptores quiméricos útiles incluyen porciones de mGluRs y CaRs, de tal manera que las porciones confieren una unión, acoplamiento de señal, u otra característica funcional deseada al receptor quimérico. La longitud de una secuencia procedente de un receptor particular puede ser de tamaños diferentes en aplicaciones diferentes. Además, la secuencia de una porción procedente de un receptor particular puede ser idéntica a la secuencia correspondiente en el mGluR o CaR, o puede ser una secuencia homóloga, que conserva la función relevante de la secuencia del mGluR o CaR. Por lo tanto, los receptores quiméricos de esta invención tienen un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y un dominio de cola citoplásmica intracelular. Estos receptores quiméricos pueden tener una secuencia contigua de por lo menos 6 aminoácidos que es homóloga a una secuencia de un mGluR, y una secuencia contigua de por lo menos 6 aminoácidos que es homóloga a una secuencia de un CaR. Sin embargo, en muchos casos, las secuencias del mGluR y/o el CaR pueden ser más largas de 6 aminoácidos. Así, una u otra o ambas de tales secuencias pueden ser por lo menos de 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud.

Las porciones procedentes del mGluR y del CaR normalmente no tendrán la misma longitud. Así, por ejemplo, la secuencia de uno de estos tipos de receptor puede ser de una longitud como la indicada más arriba (por ejemplo, por lo menos 6, 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos), mientras que el resto de la secuencia del receptor quimérico es la misma que u homóloga a una secuencia del otro tipo de receptor.

En ciertas realizaciones, la porción procedente de por lo menos un tipo de receptor puede ser un subdominio. En este contexto, "subdominio" se refiere a una secuencia de aminoácidos que es menos que la secuencia entera de aminoácidos para un dominio. Los ejemplos de subdominios incluyen, pero no se limitan a, dominios de unión al ligando. Otros ejemplos incluyen uno de los bucles o regiones citoplásmicas del dominio transmembranal siete. Por lo tanto, en ciertos casos, un receptor quimérico tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y un dominio de cola citoplásmica intracelular, que incluyen subdominios. En un ejemplo de tales receptores quiméricos, por lo menos un subdominio es homólogo a un subdominio de un receptor de calcio y los subdominios y dominios restantes son homólogos a subdominios y dominios de un receptor de glutamato metabotrópico. En otro ejemplo, por lo menos un subdominio es homólogo a un subdominio de un receptor de glutamato metabotrópico y los subdominios y dominios restantes son homólogos a subdominios y dominios de un receptor de calcio.

En un ejemplo más específico, el dominio transmembranal siete de un receptor quimérico incluye tres bucles citoplásmicos; por lo menos un bucle citoplásmico es homólogo a un bucle citoplásmico de un receptor de glutamato metabotrópico; o por lo menos un bucle citoplásmico es homólogo a un bucle citoplásmico de un receptor de calcio. En otro ejemplo específico, el dominio extracelular es homólogo al dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, el dominio transmembranal siete es homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico excepto que uno o más de los bucles citoplásmicos del dominio transmembranal siete es homólogo a un bucle(s) citoplásmico(s) de un receptor de calcio, y la cola citoplásmica es homóloga a la cola citoplásmica de un receptor de calcio. Así, cualquiera de los bucles citoplásmicos 1, 2, y 3 se puede reemplazar, uno por uno o en cualquier combinación, con un bucle(s) citoplásmico(s) de un receptor de calcio.

En otros casos, el receptor quimérico tiene un dominio que tiene una secuencia que es la misma que u homóloga a la secuencia de un dominio de un mGluR, o un CaR, o preferentemente, por lo menos un dominio procedente de cada uno de un mGluR y un CaR. Más preferentemente, el receptor quimérico tiene dos dominios procedentes de un tipo de receptor y un dominio procedente del otro tipo de receptor. Las composiciones de ciertas realizaciones preferidas de tales receptores quiméricos se describen más abajo:

Una composición que comprende un receptor quimérico que tiene:

1. un dominio homólogo al dominio extracelular de un receptor de calcio, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o

2. un dominio homólogo a un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de calcio, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio; o
3. un dominio homólogo a un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de calcio, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o
4. un dominio homólogo al dominio extracelular de un receptor de calcio, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio; o
5. un dominio homólogo al dominio extracelular de un receptor de calcio, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de calcio, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o
6. un dominio homólogo al dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio; o
7. un dominio homólogo al dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, un dominio homólogo al dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico excepto que uno o más bucles citoplásmicos se reemplazan con un bucle(s) citoplásmico(s) homólogo(s) a un bucle(s) citoplásmico(s) de un receptor de calcio, y un dominio homólogo al dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio.

B. Ácidos Nucleicos que Codifican Receptores Quiméricos

Las composiciones que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican receptores quiméricos como se describe más arriba también son útiles en esta invención. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden aislar, purificar, o enriquecer. Preferentemente, el ácido nucleico se proporciona como una preparación sustancialmente purificada que representa por lo menos 75%, más preferentemente 85%, lo más preferentemente 95% del total de ácidos nucleicos presentes en la preparación.

Tales moléculas de ácido nucleico también pueden estar presentes en un vector de expresión replicable. El vector de expresión replicable se puede transformar en una célula anfitriona adecuada para proporcionar una célula anfitriona recombinante. Utilizando tales células anfitrionas transformadas, la invención también proporciona un procedimiento para la producción de un receptor quimérico, que incluye cultivar, bajo condiciones de nutrientes adecuadas, células anfitrionas procarionas o eucariotas transformadas o transfectadas con un vector de expresión replicable que comprende la molécula de ácido nucleico de una manera que permite la expresión de dicho receptor quimérico.

Los usos de ácidos nucleicos que codifican receptores quiméricos o fragmentos de receptor incluyen uno o más de lo siguiente: producir proteínas del receptor que se pueden utilizar, por ejemplo, para determinación estructural, para analizar una actividad de la molécula sobre un receptor, para cribar moléculas útiles como agentes terapéuticos y para obtener anticuerpos de unión al receptor. Las quimeras de la presente invención son útiles para identificar compuestos activos en receptores de calcio o en receptores de glutamato metabotrópicos, o en ambos. También, los fragmentos de la presente invención son útiles para identificar compuestos que se unen a o modulan receptores de calcio o receptores de glutamato metabotrópico, o ambos.

Así, la invención también incluye, por ejemplo, un ácido nucleico aislado que codifica un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico que está sustancialmente libre del dominio transmembranal siete y del dominio de cola citoplásmica intracelular de ese receptor de glutamato metabotrópico. Igualmente, el ácido nucleico aislado puede codificar un receptor de glutamato metabotrópico que está sustancialmente libre de por lo menos una porción del dominio que atraviesa la membrana. En otro ejemplo, un ácido nucleico aislado puede codificar un receptor de glutamato metabotrópico que está sustancialmente libre del dominio extracelular de ese receptor de glutamato metabotrópico.

C. Fragmentos del Receptor de Glutamato Metabotrópico y Fragmentos del Receptor de Calcio

Los fragmentos de receptor son porciones de receptores de glutamato metabotrópicos o de receptores de calcio. Los fragmentos de receptor se unen preferentemente a uno o más agentes de unión que se unen a un receptor de longitud completa. Los agentes de unión incluyen ligandos, tales como glutamato, quiscualato, agonistas y antagonistas, y anticuerpos que se unen al receptor. Los fragmentos tienen usos diferentes tales como seleccionar otras moléculas capaces de unirse al receptor. Los fragmentos se pueden generar utilizando técnicas estándar tales como expresión de secuencias parciales clonadas del ADN del receptor y escisión proteolítica de una proteína del receptor. Las proteínas se escinden específicamente mediante enzimas proteolíticas, tales como tripsina, quimiotripsina o pepsina. Cada una

de estas enzimas es específica para el tipo de enlace peptídico que ataca. La tripsina cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos cuyo grupo carbonilo es de un aminoácido básico, normalmente arginina o lisina. La pepsina y quimiotripsina catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de aminoácidos aromáticos, particularmente triptófano, tirosina y fenilalanina.

Se generan conjuntos alternativos de fragmentos escindidos de proteínas evitando la escisión en un sitio que es susceptible a una enzima proteolítica. Por ejemplo, la reacción del grupo ϵ -amino de la lisina con trifluoroacetato de etilo en disolución ligeramente básica rinde un residuo de aminoácido bloqueado cuyo enlace peptídico adyacente ya no es susceptible a la hidrólisis por tripsina. Goldberger *et al.*, *Biochemistry* 1:401, 1962). Así, el tratamiento de un polipéptido tal con tripsina se escinde solo en los residuos arginilo.

Los polipéptidos también se pueden modificar para crear uniones peptídicas que son susceptibles de hidrólisis catalizada por enzimas. Por ejemplo, la alquilación de residuos de cisteína con β -haloetilaminas rinde uniones peptídicas que se hidrolizan por tripsina. (Lindley, *Nature* 178:647, 1956).

Además, se pueden utilizar reactivos químicos que escinden cadenas de polipéptidos en residuos específicos. (Witcop, *Adv. Protein Chem.* 16:221, 1961). Por ejemplo, el bromuro de cianógeno escinde polipéptidos en residuos de metionina. (Gross y Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* 83: 1510, 1961).

Así, por tratamiento de un receptor de glutamato metabotrópico, o fragmento del mismo, con diversas combinaciones de modificadores, enzimas proteolíticas y/o reactivos químicos, se generan numerosos péptidos discretos que solapan de tamaños variables. Estos fragmentos de péptidos se pueden aislar y purificar de tales digestiones mediante métodos cromatográficos. Alternativamente, los fragmentos se pueden sintetizar utilizando un procedimiento de síntesis en estado sólido apropiado.

Se pueden seleccionar fragmentos para que tengan las actividades biológicas deseables. Por ejemplo, un fragmento puede incluir solo un sitio de unión al ligando. Tales fragmentos se identifican fácilmente por los expertos normales en la técnica utilizando métodos rutinarios para detectar la unión específica al fragmento. Por ejemplo, en el caso de un receptor de glutamato metabotrópico, el ácido nucleico que codifica un fragmento del receptor se puede expresar para producir el fragmento de polipéptido que, a continuación, se pone en contacto con un ligando del receptor bajo condiciones de asociación apropiadas para determinar si el ligando se une al fragmento. Tales fragmentos son útiles en ensayos de cribado para agonistas y antagonistas de glutamato, y para efectos terapéuticos en los que es útil eliminar glutamato del suero, u otros tejidos corporales.

Otros fragmentos útiles incluyen los que tienen solo la porción externa, porción que atraviesa la membrana, o porción intracelular del receptor. Estas porciones son fácilmente identificadas por comparación de la secuencia de aminoácidos del receptor con los receptores conocidos, o por otra metodología estándar. Estos fragmentos son útiles para formar receptores quiméricos con fragmentos de otros receptores para crear un receptor con una porción intracelular que lleva a cabo una función deseada dentro de esa célula, y una porción extracelular que causa que la célula responda a la presencia de glutamato, o aquellos agonistas o antagonistas descritos en la presente memoria. Los genes del receptor quimérico cuando se formulan apropiadamente son útiles en terapias genéticas para una variedad de enfermedades que implican disfunción de receptores o en las que la modulación de la función del receptor proporciona un efecto deseable en el paciente.

Adicionalmente, se pueden construir receptores quiméricos de manera tal que el dominio intracelular se acopla a un proceso enzimático deseado que se puede detectar fácilmente por ensayos calorimétricos, radiométricos, lumínicos, espectrofotométricos o fluorimétricos y se activa por interacción de la porción extracelular con su ligando nativo (por ejemplo, glutamato) o agonistas y/o antagonistas de la invención. Las células que expresan tales receptores quiméricos se pueden utilizar para facilitar el cribado de agonistas y antagonistas del receptor de glutamato metabotrópico, y en algunos casos agonistas y antagonistas del receptor de ion inorgánico.

Así, la invención también incluye fragmentos, o polipéptidos purificados de receptores de calcio, receptores de glutamato metabotrópicos, o receptores quiméricos que incluyen secuencias del receptor de calcio y secuencias del receptor de glutamato metabotrópico. Los fragmentos se pueden utilizar para cribar compuestos que son activos o en el receptor de glutamato metabotrópico o en el de calcio. Por ejemplo, un fragmento que incluye el dominio extracelular de un receptor de calcio o de un receptor de glutamato metabotrópico se puede utilizar en un ensayo de unión al receptor soluble para identificar que moléculas en una quimioteca combinatoria pueden unirse al receptor en de la región ensayada. Se puede predecir que tales moléculas "de unión" afectan la función del receptor. Los fragmentos de receptor preferidos incluyen los que tienen actividad de receptor funcional, un sitio de unión, epítopo para el reconocimiento de anticuerpo (típicamente por lo menos seis aminoácidos), y/o un sitio que se une a un agonista, antagonista o modulador del receptor de glutamato metabotrópico. Otros fragmentos de receptor preferidos incluyen los que tienen solo una porción extracelular, una porción transmembranal, una porción intracelular, y/o una porción transmembranal múltiple (por ejemplo, porción transmembranal siete). Tales fragmentos de receptor tienen diversos usos tales como que se utilizan para obtener anticuerpos a una región particular y que se usan para formar receptores quiméricos y fragmentos de otros receptores para crear un nuevo receptor que tiene propiedades únicas.

Los péptidos o fragmentos purificados preferentemente tienen por lo menos 6 aminoácidos contiguos de un receptor de glutamato metabotrópico o receptor de calcio o receptor quimérico. Por “purificado” en referencia a un polipéptido se entiende que el polipéptido está en una forma (es decir, su asociación con otras moléculas) distinta del polipéptido que se da de manera natural. Preferentemente, el polipéptido se proporciona como una preparación sustancialmente purificada que representa por lo menos 75%, más preferentemente 85%, lo más preferentemente 95%, del total de proteína en la preparación.

En muchas aplicaciones, es preferible que el polipéptido purificado o fragmento tenga más de 6 aminoácidos contiguos del receptor de glutamato metabotrópico o receptor de calcio o receptor quimérico. Por ejemplo, el polipéptido purificado puede tener por lo menos 12, 18, 14, 30, o 36 aminoácidos contiguos del receptor “precursor”.

Se pueden preparar otros fragmentos que incluyen solamente el dominio transmembranal siete y el dominio de cola citoplásmica de receptores de calcio, receptores de glutamato metabotrópicos, o receptores quiméricos. Tales fragmentos pueden ser útiles, por ejemplo, en ensayos funcionales para cribar compuestos cuyo sitio de acción es en el dominio transmembranal siete.

Como se ha indicado anteriormente, la invención incluye métodos de cribado para un compuesto que se une a un receptor, que utilizan fragmentos de receptor. En un ejemplo, el método incluye la etapas de: preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de un receptor; insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho fragmento en una célula anfitriona; transformar una célula anfitriona con el vector; recuperar el fragmento a partir de la célula anfitriona; introducir el fragmento y el compuesto de prueba en un medio aceptable; y supervisar la unión del compuesto al fragmento por medios físicamente detectables. En casos en los que el receptor es un receptor de glutamato metabotrópico, el fragmento preferentemente incluye un dominio extracelular del receptor de glutamato metabotrópico, o un dominio transmembranal siete del receptor de glutamato metabotrópico, o un dominio transmembranal siete y un dominio de cola citoplásmica de un receptor de glutamato metabotrópico. En casos en los que el receptor es un receptor de calcio, el fragmento preferentemente incluye un dominio extracelular del receptor de calcio, o un dominio transmembranal siete del receptor de calcio, o un dominio transmembranal siete y un dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio.

Ciertos fragmentos de receptores de glutamato metabotrópicos y receptores de calcio conservan las funciones de activar una o más de las respuestas celulares normalmente activadas por el receptor “precursor” cuando entra en contacto con un compuesto que interactúa. Así, por ejemplo, un fragmento expresado en la célula que incluye el 7TMD y CT de un mGluR o un CaR, pero no incluye el ECD, puede activar una(s) respuesta(s) celular(es) cuando entra en contacto con un compuesto que interactúa con el 7TMD. Así, la incorporación de tales fragmentos en un método basado en la célula de cribado para compuestos que se unen a o modulan un receptor de glutamato metabotrópico o un receptor de calcio, tales como los descritos en la presente memoria para receptores quiméricos, es útil para identificar compuestos activos que interactúan con el fragmento en lugar de con la secuencia suprimida.

Los fragmentos aislados de receptores de calcio, receptores de glutamato metabotrópicos, o receptores quiméricos que comprenden secuencias del receptor de calcio y secuencias del receptor de glutamato metabotrópico se pueden combinar en un ensayo funcional *in vitro* para cribar compuestos activos en cualquiera de los dos receptores. Un ensayo *in vitro* tal, por ejemplo, puede incluir un fragmento que tiene el dominio extracelular de un receptor y un fragmento que tiene el dominio transmembranal siete y el dominio de cola citoplásmica del otro receptor, en el que el dominio extracelular complementará al fragmento del dominio transmembranal siete/de cola citoplásmica *in vitro*. De esta manera, se pueden preparar receptores quiméricos funcionales que son útiles en un ensayo de cribado sin la necesidad de recombinación de los ácidos nucleicos que los codifican. En lugar de ello, estos receptores quiméricos funcionales se pueden lograr combinando, *in vitro*, porciones de diferentes receptores.

Tales combinaciones de fragmentos proporcionan métodos de cribado para compuestos que se unen a o modulan un receptor. Un ejemplo de un método tal incluye las etapas de: preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer fragmento que es un fragmento de un primer receptor; insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar ese fragmento en una célula anfitriona; transformar una célula anfitriona con el vector; recuperar el fragmento a partir de la célula anfitriona; preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo fragmento que es un fragmento de un segundo receptor; insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar el segundo fragmento en una célula anfitriona; transformar una célula anfitriona con el vector; recuperar el segundo fragmento a partir de la célula anfitriona, introducir ambos, el primer fragmento y el segundo fragmento, en un medio aceptable, y supervisar la unión y modulación del compuesto por medios físicamente detectables.

En ejemplos particularmente preferidos, el primer fragmento incluye el dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico y el segundo fragmento incluye el dominio transmembranal siete y el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio; el primer fragmento incluye el dominio extracelular de un receptor de calcio y el segundo fragmento incluye el dominio transmembranal siete y el dominio de cola citoplásmica de un receptor de glutamato metabotrópico; o el primer fragmento incluye el dominio extracelular de un receptor de calcio y el segundo fragmento incluye el dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico y el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio.

D. Procedimientos de Cribado para Identificar Compuestos que Modulan Actividades del Receptor de Glutamato Metabotrópico Utilizando Receptores Quiméricos

Los compuestos agonistas y antagonistas del mGluR descritos en la literatura científica están relacionados con el agonista endógeno, glutamato (para revisiones véase: Cockcroft *et al.*, Neurochem. Int. 23:583-594, 1993; Schoepp y Conn, TIPS 14:13-20, 1993; Hollmann y Heinemann, Annu. Rev. Neurosci. 17:31-108, 1994). Tales compuestos agonistas y antagonistas tienen un resto ácido, normalmente un ácido carboxílico, pero algunas veces un ácido fosfatídico. Presumiblemente entonces, tales compuestos se unen a los mGluRs en el mismo sitio que el aminoácido, glutamato. Esto se ha confirmado por la metilcarboxifenilglicina, que se demostró que era un antagonista competitivo del glutamato (Eaton *et al.*, Eur. J. Pharm. - Mol. Pharm. Sect. 244:195-197, 1993). Se puede suponer que compuestos activos en mGluRs, que carecen de cargas negativas, y no se asemejan al aminoácido glutamato, pueden no actuar en el sitio de unión del glutamato.

Los compuestos dirigidos al receptor de glutamato metabotrópico tienen varios usos que incluyen usos diagnósticos y uso terapéutico. Las síntesis de muchos de los compuestos se describe por Nemeth *et al.*, titulado "Calcium Receptor Active Molecule" Publicación Internacional Número WO 93/04373. Estos compuestos se unen a un receptor de glutamato metabotrópico y estos compuestos eficaces en modular la actividad de glutamato del receptor metabotrópico se pueden identificar utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria. Estos compuestos que pueden unirse selectivamente al receptor de glutamato metabotrópico se pueden utilizar de manera diagnóstica para determinar la presencia del receptor de glutamato metabotrópico frente a otros receptores de glutamato.

Lo siguiente es una descripción de los procedimientos que se pueden utilizar para obtener compuestos que modulan la actividad del receptor de glutamato metabotrópico. Se pueden llevar a cabo diversos procedimientos de cribado para evaluar la capacidad de un compuesto para modular la actividad de los receptores quiméricos de la invención midiendo su capacidad para tener una o más actividades de un agente modulador del receptor de glutamato metabotrópico o un agente modulador del receptor de calcio. En células que expresan los receptores quiméricos de la invención, tales actividades incluyen los efectos sobre calcio intracelular, inositol fosfatos y AMP cíclico.

Medir $[Ca^{2+}]_i$ con fura-2 proporciona un medio muy rápido de cribar nuevas moléculas orgánicas para su actividad. En una sola tarde, se pueden examinar 10-15 compuestos (o tipos de moléculas) y se pueden evaluar sus capacidades para movilizar o inhibir la movilización del Ca^{2+} intracelular en un único experimento. También se puede evaluar la sensibilidad de los aumentos observados en $[Ca^{2+}]_i$ a la depresión por PMA.

Por ejemplo, se suspenden inicialmente células recombinantes, que expresan receptores quiméricos de la invención, cargadas con fura-2 en tampón que contiene $CaCl_2$ 0,5 mM. Se añade una sustancia de prueba a la cubeta en un volumen pequeño (5-15 μ l) y se miden los cambios en la señal de fluorescencia. Se hacen aumentos acumulativos en la concentración de la sustancia de prueba en la cubeta hasta que se alcanza alguna concentración predeterminada o no se observan cambios adicionales en la fluorescencia. Si no se observan cambios en la fluorescencia, la molécula se considera inactiva y no se realiza ninguna prueba adicional.

En los estudios iniciales, se pueden probar moléculas en concentraciones tan altas como 5 o 10 mM. Según se fueron conociendo moléculas más potentes, se redujo la concentración límite. Por ejemplo, se probaron moléculas más nuevas en concentraciones no mayores de 500 μ M. Si no se observan cambios en la fluorescencia a esta concentración, la molécula se considera inactiva.

Las moléculas que causan incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ se someten a pruebas adicionales. Dos características de una molécula que se pueden considerar en el cribado para un agente modulador positivo de un receptor quimérico de la invención son la movilización de Ca^{2+} intracelular y la sensibilidad a activadores de PKC.

Una única preparación de células puede proporcionar datos sobre $[Ca^{2+}]_i$, niveles de AMP cíclico, IP y otros mensajeros intracelulares. Un procedimiento típico es cargar células con fura-2 y a continuación dividir la suspensión celular en dos; la mayoría de las células se utilizan para la medida de $[Ca^{2+}]_i$ y el resto se incuban con moléculas para evaluar sus efectos sobre el AMP cíclico.

Las mediciones de inositol fosfatos son un aspecto del cribado que requiere mucho tiempo. Sin embargo, las columnas de intercambio iónico eluidas con cloruro (en lugar de con formiato) proporcionan un medio muy rápido de cribado para la formación de IP_3 , ya que no se requiere la evaporación en rotavapor (que lleva aproximadamente 30 horas). Este método permite el procesamiento de casi 100 muestras en una sola tarde en un único experimento. Las moléculas que prueban ser interesantes, según se evalúan por medidas de $[Ca^{2+}]_i$, AMP cíclico, e IP_3 se pueden someter a un análisis más riguroso examinando la formación de diversos inositol fosfatos y evaluando sus formas isómeras por HPLC.

Lo siguiente es ilustrativo de métodos útiles en estos procedimientos de cribado.

1. Medición del AMP cíclico

Esta sección describe la medición de los niveles de AMP cíclico. Se incubaron células como más arriba y al final de la incubación, se tomaron 0,15 ml de muestra y se transfirieron a 0,85 ml de agua caliente (70°C) y se calentaron a esta temperatura durante 5-10 minutos. Los tubos posteriormente se congelaron y descongelaron varias veces y el residuo celular se sedimentó por centrifugación. Porciones del sobrenadante se acetilaron y se determinaron las concentraciones de AMP cíclico mediante radioinmunoensayo.

2. Medición de la Formación de Inositol Fosfato

Esta sección describe los procedimientos de medición de la formación de inositol fosfato. Los fosfolípidos de membrana se marcaron incubando células paratiroides con 4 μ Ci/ml de 3 H-mio-inositol durante 20-24 horas. A continuación las células se lavaron y resuspendieron en PCB que contenía CaCl_2 0,5 mM y BSA al 0,1%. La incubación se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga en ausencia o presencia de diversas concentraciones de polication orgánico durante tiempos diferentes. Las reacciones se terminaron mediante la adición de 1 ml de cloroformo-metanol-HCl 12 N (200:100:1; v/v/v). Hidrolizado acuoso de ácido fítico (200 μ l; 25/ μ g fosfato/tubo). Los tubos se centrifugaron y 600 μ l de la fase acuosa se diluyeron en 10 ml de agua.

Los inositol fosfatos se separaron por cromatografía de intercambio iónico utilizando AG1-X8 en forma de cloruro o de formiato. Cuando solo tuvieron que determinarse los niveles de IP_3 , se utilizó la forma cloruro, mientras que la forma formiato se utilizó para resolver los inositol fosfatos principales (IP_3 , IP_2 , e IP_1). Para la determinación de solo IP_3 , la muestra diluida se aplicó a la columna en forma cloruro y la columna se lavó con 10 ml de HCl 30 mM seguido por 6 ml de HCl 90 mM y el IP_3 se eluyó con 3 ml HCl 500 mM. El último eluato se diluyó y se midieron las cuentas. Para la determinación de todos los inositol fosfatos principales, la muestra diluida se aplicó a la columna en forma formiato y el IP_1 , IP_2 , e IP_3 se eluyeron secuencialmente mediante concentraciones crecientes de tampón formiato. Las muestras eluidas de las columnas de formiato se evaporaron en rotavapor, el residuo se llevó a un cóctel, y se midieron las cuentas.

Las formas isómeras de IP_3 se evaluaron por HPLC. Las reacciones se terminaron mediante la adición de 1 ml de ácido perclórico 0,45 M y se almacenaron en hielo durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se ajustó a pH 7-8 con NaHCO_3 . A continuación, el extracto se aplicó a una columna de intercambio aniónico Partisil SAX y se eluyó con un gradiente lineal de formiato amónico. Después las diversas fracciones se desalinizaron con Dowex seguido por evaporación en rotavapor antes del recuento de centelleo líquido en un LSC Packard Tri-carb 1500.

Para todos los métodos de separación de inositol fosfato, se utilizaron controles apropiados que utilizan estándares auténticos para determinar si los policationes orgánicos interferían con la separación. Si era así, las muestras se trataron con resinas de intercambio catiónico para eliminar la molécula culpable antes de la separación de los inositol fosfatos.

3. Uso de Moléculas Líderes

Midiendo sistemáticamente la capacidad de una molécula líder para imitar o antagonizar el efecto de un ligando natural, se puede identificar la importancia de diferentes grupos funcionales para los agonistas o antagonistas. De las moléculas probadas, algunas son adecuadas como candidatas a fármacos mientras que otras no son necesariamente adecuadas como candidatas a fármacos. La adecuabilidad de una molécula como un candidato a fármaco depende de factores tales como la eficacia y la toxicidad. Tales factores se pueden evaluar utilizando técnicas estándar. Así, se pueden utilizar moléculas líderes para demostrar que la hipótesis que subyace en las terapias basadas en el receptor es correcta y para determinar las características estructurales que permiten a los agentes moduladores del receptor actuar sobre el receptor y, así, obtener otras moléculas útiles en esta invención.

Los ejemplos descritos en la presente memoria demuestran el diseño general de moléculas útiles como moduladores de la actividad de mGluRs y CaRs. Estos ejemplos también describen procedimientos de cribado para obtener moléculas adicionales, tales como el cribado de quimiotecas de productos naturales. Utilizando estos procedimientos, los expertos normales en la técnica pueden identificar otros moduladores útiles de mGluRs y CaRs.

Se han obtenido líneas celulares que expresan receptores de calcio y se han descrito métodos aplicables a su uso en el cribado de alto rendimiento para identificar compuestos que modulan la actividad de receptores de calcio. Se han obtenido líneas celulares que expresan receptores de glutamato metabotrópicos y se han descrito métodos aplicables a su uso potencial para identificar compuestos que modulan la actividad de receptores de glutamato metabotrópicos (Publicación de Patente Europea N° 0 568 384 A1; Publicación de Patente Europea N° 0 569 240 A1; Publicación PCT N° WO 94/29449; y Publicación PCT N° WO 92/10583). Así, ensayos basados en células recombinantes que usan mediciones bioquímicas, espectrofotométricas u otras mediciones físicas para detectar la modulación de la actividad de un receptor expresado, especialmente midiendo cambios en los mensajeros intracelulares afectados, son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden construir de manera tal que sean adecuados para el cribado funcional de alto rendimiento de compuestos y quimiotecas. Se apreciará por los expertos en la técnica que cada ensayo funcional tiene ventajas y desventajas para el cribado de alto rendimiento que variarían dependiendo del receptor de interés, las líneas celulares empleadas, la naturaleza de las mediciones bioquímicas y físicas utilizadas para detectar la modulación de la

función del receptor, la naturaleza de la quimioteca que se va a cribar y otros parámetros diversos. Un método excepcionalmente útil y práctico es el uso de indicadores fluorescentes del Ca^{2+} intracelular para detectar la modulación de la actividad de receptores acoplados a fosfolipasa C.

El uso de [^3H]glutamato, o cualquier otro compuesto que se ha encontrado que modula el mGluR descubierto por los métodos descritos en la presente memoria, como un compuesto líder se espera que dé lugar al descubrimiento de otros compuestos que tengan una actividad similar o más potente que a su vez se pueden utilizar como compuestos líderes. Se pueden utilizar compuestos líderes tales como el [^3H]glutamato para modelización molecular utilizando procedimientos estándar y para cribar quimiotecas. Se pueden utilizar técnicas de unión de radioligando [un ensayo de unión marcado radioactivamente] para identificar compuestos que se unen al sitio de unión del glutamato. Mientras que tales ensayos de unión son útiles para encontrar nuevos compuestos que se unen al sitio de unión del glutamato en los mGluRs, la invención actual proporciona el descubrimiento de compuestos novedosos con actividades únicas y útiles en mGluRs que se pueden radiomarcarse y utilizar de manera similar en ensayos de Radioligandos para encontrar compuestos adicionales que se unen al nuevo sitio líder definido. Esta prueba de detección sistemática permite cribar un gran número de compuestos potencialmente útiles respecto a su capacidad para unirse al sitio de unión del glutamato. Se pueden idear otros ensayos rápidos para la detección de la unión al sitio de unión del glutamato en receptores de glutamato metabotrópicos utilizando técnicas de detección estándar. Se pueden identificar otros compuestos que actúan el sitio de unión del glutamato utilizando los procedimientos descritos en esta sección. Se utiliza primero un ensayo de alto rendimiento para cribar quimiotecas (por ejemplo quimiotecas de productos naturales y catálogos de compuestos) para identificar compuestos con actividad en el sitio de unión del glutamato (o del compuesto líder). A continuación estos compuestos se utilizan como estructuras químicas líderes para un programa de desarrollo de fármacos dirigidos al sitio de unión del glutamato o del compuesto líder en receptores de glutamato metabotrópicos. Se pueden llevar a cabo experimentos rutinarios, que incluyen estudios con animales, para identificar los compuestos que tienen las actividades deseadas.

El ensayo siguiente se puede utilizar como un ensayo de alto rendimiento. Se preparan membranas de cerebro de rata según el método de Williams *et al.* (Molec. Pharmacol. 36:575, 1989), con las siguientes alteraciones: Se sacrifican ratas macho Sprague-Dawley (Harlan Laboratories) que pesan 100-200 g por decapitación. Se limpian y disecan las cortezas o cerebelos de 20 ratas. El tejido cerebral resultante se homogeneiza a 4°C con un homogeneizador politron en los ajustes más bajos en 300 ml de sacarosa 0,32 M que contienen K-EDTA 5 mM (pH 7,0). El homogeneizado se centrifuga durante 10 minutos a 1.000 x g y el sobrenadante se elimina y se centrifuga a 30.000 x g durante 30 minutos. El sedimento resultante se resuspende en 250 ml de K-EDTA 5 mM (pH 7,0) se agita en hielo durante 15 minutos, y a continuación se centrifuga a 30.000 x g durante 30 minutos. El sedimento se resuspende en 300 ml de K-EDTA 5 mM (pH 7,0) y se incuba a 32°C durante 30 minutos. A continuación la suspensión se centrifuga a 100.000 x g durante 30 minutos. Las membranas se lavan por resuspensión en 500 ml de K-EDTA 5 mM (pH 7,0), se incuban a 32°C durante 30 minutos, y se centrifugan a 100.000 x g durante 30 minutos. Se repite el procedimiento de lavado, incluidos los 30 minutos de incubación. El sedimento final se resuspende en 60 ml de K-EDTA 5 mM (pH 7,0) y se almacena en alícuotas a -80°C.

Para llevar a cabo un ensayo de unión con [^3H]glutamato (como un ejemplo de un compuesto líder), se descongelan alícuotas de SPMs (membranas plasmáticas sinápticas), se resuspenden en 30 ml de EPPS 30 mM /K-EDTA 1 mM, pH 7,0, y se centrifugan a 100.000 x g durante 30 minutos. Las SPMs se resuspenden en tampón A (EPPS 30 mM/K-EDTA 1 mM, pH 7,0). El [^3H]-glutamato se añade a esta mezcla de reacción. Los ensayos de unión se llevan a cabo en tubos de ensayo de polipropileno. El volumen final de incubación es 500 μl . La unión no específica se determina en presencia de glutamato no radioactivo 100 μM . Se incubaron muestras duplicadas a 0°C durante 1 hora. Los ensayos se terminaron añadiendo 3 ml de tampón A enfriado en hielo, seguido por filtración sobre filtros de fibra de vidrio (Schleicher & Schuell No. 30) que se prehumedecen en polietilenimina (PEI) al 0,33%. Los filtros se lavan con otros 3 x 3 ml de tampón A, y se determina la radioactividad por recuento de centelleo a una eficacia de 35-40% para ^3H .

Para validar el ensayo de más arriba, también se pueden llevar a cabo los experimentos siguientes:

- (a) La cantidad de unión no específica del [^3H]glutamato a los filtros se determina pasando 500 μl de tampón A que contiene diversas concentraciones de [^3H]glutamato a través de filtros de fibra de vidrio prelavados. Los filtros se lavan con otros 4 x 3 ml de tampón A, y se determina la radioactividad unida a los filtros por recuento de centelleo a una eficacia de 35-40% para ^3H .
- (b) Se construye una curva de saturación resuspendiendo las SPMs en tampón A. El tampón de ensayo (500 μl) contiene 60 μg de proteína. Se utilizan concentraciones de [^3H]glutamato, que van de 1,0 nM a 400 μM en unidades semilogarítmicas. A partir de los datos se construye una curva de saturación, y se determina un valor de K_D aparente y un valor de B_{max} mediante análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949). Se determina la cooperatividad de la unión del [^3H]glutamato mediante la construcción de un gráfico de Hill (Hill, J. Physiol. 40:190, 1910).
- (c) Se determina la dependencia de la unión de la concentración de proteína (receptor) resuspendiendo las SPMs en tampón A. El tampón de ensayo (500 μl) contiene una concentración de [^3H]glutamato igual a su valor de K_D y concentraciones crecientes de proteína. La unión específica del [^3H]glutamato debe estar linealmente relacionada con la cantidad de proteína (receptor) presente.

- (d) Se determina la secuencia temporal de la unión ligando-receptor resuspendiendo las SPMs en tampón A. El tampón de ensayo (500 μ l) contiene una concentración de [3 H]glutamato igual a su valor de K_D y 100 μ g de proteína. Se incubaron muestras duplicadas a 0°C durante periodos variables de tiempo; se determina el tiempo en el cual se alcanza el equilibrio, y este punto temporal se utiliza rutinariamente en todos los análisis posteriores.

- (e) Se puede analizar la farmacología del sitio de unión mediante experimentos de competición. En tales experimentos, la concentración del [3 H]glutamato y la cantidad de proteína se mantienen constantes, mientras que se varía la concentración del fármaco de prueba (competidor). Este ensayo permite la determinación de una IC_{50} y un K_D aparente para el fármaco competidor (Cheng y Prusoff, J. Biochem. Pharmacol. 22:3099, 1973). La cooperatividad de la unión del fármaco competidor se determina mediante análisis de gráfico de Hill.

La unión específica del [3 H]glutamato representa la unión al sitio de unión del glutamato en los receptores de glutamato metabotrópicos. Como tales, los análogos de glutamato deben competir con la unión del [3 H] glutamato de un modo competitivo y sus potencias en este ensayo deben correlacionarse con sus potencias en un ensayo funcional de la actividad del receptor de glutamato metabotrópico (por ejemplo, evaluación electrofisiológica de la actividad de receptores de glutamato metabotrópicos expresados en ovocitos de *Xenopus*). En cambio, los compuestos que tienen actividad en sitios distintos del sitio de unión del glutamato no deben desplazar la unión del [3 H]glutamato de una manera competitiva. Por el contrario, podría tener lugar la modulación alostérica compleja de la unión del [3 H]glutamato, indicativa de interacciones no competitivas.

- (f) Se llevan a cabo estudios que estiman las cinéticas de disociación midiendo la unión del [3 H]glutamato después de que se le permite llegar al equilibrio (véase (d) más arriba), y se añade un gran exceso de fármaco competidor no radioactivo a la mezcla de reacción. A continuación se evalúa la unión del [3 H]glutamato a diversos intervalos de tiempo. Con este ensayo, se determinan las velocidades de asociación y disociación del [3 H]glutamato (Titeler, Multiple Dopamine Receptors: Receptor Binding Studies in Dopamine Pharmacology. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1983). Experimentos adicionales implican variar la temperatura de reacción (0°C a 37°C) con el fin de comprender la dependencia de la temperatura de este parámetro.

Lo siguiente es un ejemplo de un ensayo rápido de cribado para obtener compuestos que modulan la actividad del receptor de glutamato metabotrópico. El ensayo de cribado primero mide la capacidad de los compuestos para unirse a receptores recombinantes, o fragmentos de receptor que contienen el sitio de unión del glutamato. A continuación los compuestos que se unen al receptor de glutamato metabotrópico se prueban respecto a su capacidad para modular una o más actividades en un receptor de glutamato metabotrópico.

En un procedimiento, se obtiene un ADNc o clon génico que codifica el receptor quimérico o el fragmento de un receptor de glutamato metabotrópico a partir de un organismo adecuado tal como un ser humano utilizando procedimientos estándar. Los distintos fragmentos del clon se expresan en un vector de expresión apropiado para producir el polipéptido(s) más pequeño del receptor obtenible capaz de unirse al glutamato. De esta manera, se identifica el polipéptido(s) que contiene el sitio de unión del glutamato. Tales experimentos pueden facilitarse utilizando una línea celular establemente transfectada de mamífero (por ejemplo, células HEK 293) que expresa receptores de glutamato metabotrópicos.

Alternativamente, el receptor de glutamato metabotrópico se puede hacer reaccionar químicamente con glutamato químicamente modificado de manera que se modifican los residuos de aminoácidos del receptor de glutamato metabotrópico que entran en contacto (o son adyacentes a) con el compuesto seleccionado y de ese modo son identificables. El fragmento(s) del receptor de glutamato metabotrópico que contiene esos aminoácidos está determinado para interactuar con el glutamato y es suficiente para la unión al glutamato, puede entonces expresarse de manera recombinatoria utilizando técnicas estándar.

El polipéptido(s) recombinante que tiene las propiedades de unión deseadas se puede unir a un soporte de fase sólida utilizando procedimientos químicos estándar. Esta fase sólida, o matriz de afinidad, a continuación se puede poner en contacto con glutamato para demostrar que este compuesto puede unirse a la columna, y para identificar condiciones por las que un compuesto se puede eliminar de la fase sólida. Después, este procedimiento se puede repetir utilizando una quimioteca grande para determinar los compuestos que son capaces de unirse a la matriz de afinidad. A continuación, los compuestos unidos se pueden liberar de una manera similar al glutamato. Se pueden utilizar condiciones de unión y liberación alternativas para obtener compuestos capaces de unirse bajo condiciones distintas a las utilizadas para la unión del glutamato (por ejemplo, condiciones que imiten mejor las condiciones fisiológicas encontradas especialmente en estados patológicos). Los compuestos que se unen al sitio de unión del glutamato pueden seleccionarse entonces a partir de una colección muy grande de compuestos presentes en un medio líquido o extracto.

En un método alternativo, receptores quiméricos se unen a una columna u otro soporte de fase sólida. A continuación, se pueden identificar los compuestos que no son liberados de manera competitiva por los reactivos de unión al sitio de unión del glutamato en el receptor. Tales compuestos definen sitios de unión alternativos en el receptor. Tales

compuestos pueden ser estructuralmente distintos de los compuestos conocidos y pueden definir clases químicas de agonistas o antagonistas que pueden ser útiles como agentes terapéuticos.

Modular la actividad del receptor de glutamato metabotrópico causa un aumento o disminución en una respuesta celular que se produce tras la activación del receptor de glutamato metabotrópico. Las respuestas celulares a la activación del receptor de glutamato metabotrópico varían dependiendo del tipo de receptor de glutamato metabotrópico activado. Generalmente, la activación del receptor de glutamato metabotrópico provoca una o más de las actividades siguientes: (1) aumento en la hidrólisis de PI; (2) activación de la fosfolipasa C; (3) aumentos y disminuciones en la formación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP); (4) disminución en la formación de cAMP; (5) cambios en la función del canal de iones; (6) activación de la fosfolipasa D; (7) activación o inhibición de la adenilil ciclasa; (8) activación de la guanilil ciclasa; (9) aumentos en la formación de guanosín monofosfato cíclico (cGMP); (10) activación de la fosfolipasa A₂; (11) aumentos en la liberación de ácido araquidónico; (12) aumentos o disminuciones en la actividad de los canales iónicos dependientes de ligandos y del voltaje; (13) y aumento en el calcio intracelular. La inhibición de la activación del receptor de glutamato metabotrópico impide que una o más de estas actividades ocurran.

La activación de un receptor de glutamato metabotrópico particular se refiere a un acontecimiento que posteriormente causa la producción de una o más actividades asociadas con el tipo de receptor activado. La activación de mGluR1 puede dar como resultado una o más de las actividades siguientes: aumento en la hidrólisis de PI, aumento en la formación de cAMP, aumento en el calcio (Ca²⁺) intracelular y aumento en la formación de ácido araquidónico. Los compuestos pueden modular una o más actividades del receptor de glutamato metabotrópico actuando como un agonista o antagonista de la activación del sitio de unión del glutamato.

Los receptores quiméricos de la presente invención proporcionan un método de cribado para compuestos activos en mGluRs mediante la detección de las señales producidas por CaRs. Los receptores quiméricos se pueden utilizar en los procedimientos de cribado descritos en el documento PCT/US93/01642 (WO94/18959), que por el presente documento se incorpora como referencia en la presente memoria, incluidos los métodos de cribado que utilizan fura-2, y la medición del Ca²⁺ citosólico utilizando líneas celulares que expresan receptores de calcio y los métodos de cribado que utilizan la expresión de ovocitos.

Los compuestos activos identificados mediante los métodos de cribado descritos en la presente memoria, pueden ser útiles como moléculas terapéuticas para modular la actividad del receptor de glutamato metabotrópico o como agentes de diagnóstico para diagnosticar a los pacientes que padecen de una enfermedad caracterizada por una actividad anormal del receptor de glutamato metabotrópico. Preferentemente los métodos de cribado se utilizan para identificar moduladores del receptor de glutamato metabotrópico mediante el cribado de moléculas potencialmente útiles respecto a una capacidad para imitar o bloquear una actividad del glutamato extracelular o de otros agonistas del receptor de glutamato metabotrópico sobre una célula que tiene un receptor de glutamato metabotrópico y determinar si la molécula tiene unas EC₅₀ IC₅₀ de menos de o iguales a 100 μM. Más preferentemente, se probó en las moléculas su capacidad para imitar o bloquear un aumento en [Ca²⁺]; provocado por el glutamato extracelular y otros agonistas del mGluR.

La identificación de agentes moduladores del receptor de glutamato metabotrópico se facilita utilizando un sistema de cribado de alto rendimiento. El cribado de alto rendimiento permite probar un gran número de moléculas. Por ejemplo, se puede probar un gran número de moléculas individualmente utilizando técnicas automáticas rápidas o en combinación utilizando una quimioteca combinatoria. Los compuestos individuales capaces de modular la actividad del receptor de glutamato metabotrópico presentes en una quimioteca combinatoria pueden obtenerse purificando y reanalizando las fracciones de la quimioteca combinatoria. Así, se pueden cribar de miles a millones de moléculas en un solo día. Las moléculas activas se pueden utilizar como modelos para diseñar moléculas adicionales que tienen actividad equivalente o aumentada. Preferentemente los métodos de identificación utilizan un receptor de glutamato metabotrópico quimérico recombinante. Los receptores quiméricos se pueden introducir en células diferentes utilizando un vector que codifica a un receptor. Preferentemente, se prueba la actividad de las moléculas en células diferentes para identificar una molécula agonista del receptor de glutamato metabotrópico o antagonista del receptor de glutamato metabotrópico que imita o bloquea una o más actividades del glutamato en un primer tipo de receptor de glutamato metabotrópico pero no en un segundo tipo de receptor de glutamato metabotrópico.

Como se ha indicado más arriba, la presente invención proporciona un método novedoso de cribado para compuestos que modulan la actividad del receptor de glutamato metabotrópico, utilizando un receptor quimérico que tiene porciones de un receptor de glutamato metabotrópico y porciones de un receptor de calcio. En receptores particulares de este tipo, se utiliza el proceso de señalización de la porción del receptor de calcio para detectar la modulación de la actividad del mGluR, cuando diversos compuestos se prueban para su unión a la porción del mGluR. El método de cribado se puede conducir de varias maneras, tales como utilizando receptores quiméricos que tienen porciones diferentes del receptor de glutamato metabotrópico y del receptor de calcio. Ciertos ejemplos preferidos se describen más abajo.

En un ejemplo, el método de cribado para un compuesto que se une a o modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico implica preparar un receptor quimérico que tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y un dominio de cola citoplásmica intracelular. Una secuencia de por lo menos 6 aminoácidos contiguos es la misma que u homóloga a una secuencia procedente de un receptor de glutamato metabotrópico y una

secuencia de por lo menos 6 aminoácidos contiguos es la misma que u homóloga a una secuencia procedente de un receptor de calcio. El receptor quimérico y un compuesto de prueba se introducen en un medio aceptable, y la unión del compuesto de prueba al receptor o la modulación del receptor por el compuesto se supervisa por medios físicamente detectable con el fin de identificar tales compuestos que se unen o moduladores. Generalmente, los medios aceptables
5 incluirán aquellos en que un ligando natural de un mGluR y/o un CaR interactuará con un mGluR o un CaR.

A menudo será beneficioso utilizar receptores quiméricos que tienen secuencias más largas de uno u ambos del mGluR y el CaR. Por ejemplo, el receptor quimérico puede tener una secuencia de por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos la misma que u homóloga a una secuencia de uno o ambos del mGluR o el CaR. En un receptor
10 quimérico útil, un dominio es homólogo a un dominio de un receptor de glutamato metabotrópico y por lo menos un dominio es homólogo a un dominio de un receptor de calcio.

En un segundo ejemplo, el método de cribado para un compuesto que se une a o modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico utiliza una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico. El
15 ácido nucleico se expresa en una célula, y se observa la unión o modulación por un compuesto de prueba vigilando los efectos del compuesto de prueba sobre la célula. Así, generalmente el método incluye preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico. El receptor quimérico codificado tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y un dominio de cola citoplásmica intracelular. Como en el ejemplo de más arriba, el receptor quimérico tiene secuencias de por lo menos 6 aminoácidos contiguos que son las mismas que u homólogas
20 a secuencias de cada uno de un mGluR y un CaR. También como se ha indicado más arriba, las secuencias de uno o ambos del mGluR y el CaR pueden ser beneficiosamente más largas en aplicaciones particulares, por ejemplo, por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud. La secuencia de ácido nucleico se inserta dentro de un vector de expresión replicable capaz de expresar el receptor quimérico en una célula anfitriona, y se transforma una célula anfitriona con el vector. La célula anfitriona transformada y un compuesto de prueba se introducen en un medio
25 aceptable y se sigue el efecto del compuesto sobre la célula anfitriona (tal como se hace en las técnicas o ensayos descritos más arriba). Preferentemente, aunque no necesariamente, la célula anfitriona es una célula eucariota.

Las secuencias de aminoácidos del receptor quimérico se pueden seleccionar en una variedad de combinaciones en casos particulares. Así, un receptor quimérico puede incluir por lo menos un dominio que es homólogo a un dominio
30 de un receptor de glutamato metabotrópico y por lo menos un dominio que es homólogo a un dominio de un receptor de calcio. Un dominio(s) del receptor quimérico puede, por ejemplo, ser homólogo al dominio extracelular y/o el dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico.

Asimismo, un receptor quimérico que tiene tres bucles citoplásmicos puede tener por lo menos un bucle homólogo
35 a un bucle citoplásmico de un mGluR, o por lo menos un bucle homólogo a un bucle citoplásmico de un CaR, o por lo menos un bucle homólogo a un bucle citoplásmico de cada uno de esos receptores.

Igualmente, en otros receptores quiméricos, hay una porción del receptor que es homólogo a una secuencia de un tipo de receptor (CaR o mGluR), mientras que el resto del receptor quimérico es homólogo al otro tipo de receptor
40 (CaR o mGluR). Así, el receptor quimérico puede tener una secuencia de por lo menos 6, 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos contiguos que es homóloga a una secuencia de uno de los tipos de receptores con el resto de la secuencia del receptor quimérico homóloga a una secuencia del otro tipo de receptor. Esto incluye, además, casos en que por lo menos un bucle citoplásmico es de uno de los tipos de receptores, o por lo menos un dominio es de uno de los tipos
45 de receptores.

Otras combinaciones de secuencias también serán útiles en aplicaciones particulares.

Los receptores de glutamato metabotrópicos/calcio quiméricos también se pueden utilizar para cribar compuestos activos tanto en receptores de glutamato metabotrópicos como en receptores de calcio. Esto es particularmente útil
50 para el cribado de compuestos que interactúan en dominios o subdominios diferentes en un mGluR que en un CaR. Así, tales quimeras son útiles para el cribado de compuestos que, por ejemplo, actúan dentro del dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico y también actúan dentro del dominio transmembranal siete o el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio. Una quimera tal incluiría el dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico unido al dominio transmembranal siete y la cola citoplásmica de un receptor de calcio.
55

Para detectar sistemáticamente tales compuestos, activos en receptores de glutamato metabotrópicos y receptores de calcio, los compuestos se cribarían según los diversos métodos de la presente invención, contra el receptor quimérico, el receptor de calcio, y el receptor de glutamato metabotrópico. Los compuestos activos en el dominio transmembranal siete de la porción del receptor de calcio del receptor quimérico también deben ser activos cuando
60 se prueban contra el receptor de calcio propiamente dicho. Un método preferido de cribado de tales compuesto es primero cribarlos según los métodos de la presente invención contra una molécula quimérica que tiene el dominio extracelular del receptor de glutamato metabotrópico, y los dominios transmembranal siete y de cola citoplásmica del receptor de calcio y a continuación cribar los compuestos positivos contra la molécula quimérica que tiene los dominios extracelular y transmembranal siete del receptor de glutamato metabotrópico y el dominio de cola citoplásmica
65 del receptor de calcio, y el receptor de calcio propiamente dicho. Los compuestos activos en ambas moléculas serán positivos cuando se prueben contra los tres receptores quiméricos.

A la inversa, una quimera que incluye el dominio extracelular de un receptor de calcio unido al dominio transmembranal siete y la cola citoplásmica de un receptor de glutamato metabotrópico sería útil en el cribado para compuestos que actúan dentro del dominio transmembranal siete o la cola citoplásmica de un receptor de glutamato metabotrópico. Preferentemente, el receptor quimérico, que incluye el dominio extracelular de un receptor de calcio y el dominio transmembranal siete y la cola citoplásmica de un receptor de glutamato metabotrópico, se modifica adicionalmente para incluir porciones de la cola citoplásmica de un receptor de calcio. Esta realización más preferida obtendría así las propiedades superiores de señalización del receptor de calcio mientras que todavía es útil para el cribado de compuestos que actúan tanto en el receptor de calcio como en el receptor de glutamato metabotrópico.

Así la invención incluye un método de cribado para compuestos activos tanto en un receptor de glutamato metabotrópico como en un receptor de calcio, preparando una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico. El receptor quimérico tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y un dominio de cola citoplásmica intracelular, y por lo menos un dominio es homólogo a un dominio del receptor de glutamato metabotrópico y por lo menos un dominio es homólogo a un dominio de un receptor de calcio. La secuencia de ácido nucleico se inserta dentro de un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona, y se transforma una célula anfitriona con el vector. La célula anfitriona transformada y un compuesto de prueba se introducen en un medio aceptable, y se supervisa el efecto del compuesto de prueba sobre la célula.

En general, para cada uno de los métodos de cribado anteriores que utilizan receptores quiméricos, se seleccionan la porción del receptor quimérico homóloga a un mGluR y la porción homóloga a un CaR para proporcionar las características de unión, modulación, y/o acoplamiento de señal apropiadas para una aplicación particular.

E. Sitio de Acción

Las moléculas de receptor quimérico también son útiles en métodos para determinar el sitio de acción de compuestos ya identificados como compuestos activos del receptor de glutamato metabotrópico o receptor de calcio. Por ejemplo, las quimeras que incluyen el dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico unido al dominio transmembranal siete y la cola citoplásmica de un receptor de calcio, así como las quimeras que incluyen el dominio extracelular de un receptor de calcio unido al dominio transmembranal siete y la cola citoplásmica de un receptor de glutamato metabotrópico serían útiles para determinar el sitio de acción de compuestos activos o en el receptor de glutamato metabotrópico o en el receptor de calcio. Los expertos normales en la técnica reconocerán que estos son dos ejemplos de intercambios de grandes secuencias y que también pueden emplearse intercambios de secuencias mucho más pequeñas para refinar más la determinación del sitio de acción.

Así, la invención incluye un método para determinar el sitio de acción de un compuesto activo del receptor de glutamato metabotrópico mediante: la preparación de una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico en donde el receptor quimérico comprende por lo menos una secuencia de 6 aminoácidos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio y el resto de la secuencia de aminoácidos es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de glutamato metabotrópico; la inserción de la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar el receptor quimérico en una célula anfitriona; la transformación de una célula anfitriona con el vector; la introducción de la célula anfitriona transformada y el compuesto en un medio aceptable; y la supervisión del efecto del compuesto sobre la célula.

Como se ha indicado más arriba para los métodos de cribado, en aplicaciones particulares es ventajoso utilizar intercambios de secuencias de tamaños diferentes. Así, en otras aplicaciones, la secuencia homóloga a una secuencia de un receptor de calcio puede ser, por ejemplo, de por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud.

A la inversa, un método para determinar el sitio de acción de un compuesto activo del receptor de calcio se puede llevar a cabo de la misma manera que la descrita más arriba, pero utilizando un ácido nucleico que codifica un receptor quimérico que incluye una secuencia de por lo menos 6 aminoácidos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de glutamato metabotrópico y el resto de la secuencia de aminoácidos es homóloga a una secuencia de aminoácidos de un receptor de calcio. También de manera similar al método de más arriba, la secuencia homóloga a una secuencia de un receptor de glutamato metabotrópico puede ser de longitudes diferentes en diversas aplicaciones, por ejemplo, por lo menos 12, 18, 24, 30, 36, o más aminoácidos de longitud.

F. Modulación de la Actividad del Receptor de Glutamato Metabotrópico

La modulación de la actividad del receptor de glutamato metabotrópico se puede utilizar para producir diferentes efectos tales como efectos anticonvulsivantes, efectos neuroprotectores, efectos analgésicos, efectos de mejora de la cognición, y efectos de relajación muscular. Cada uno de estos efectos tiene aplicaciones terapéuticas. Los compuestos utilizados terapéuticamente deben tener efectos secundarios mínimos a las dosis terapéuticamente eficaces.

La capacidad de un compuesto para modular la actividad del glutamato metabotrópico se puede determinar utilizando ensayos electrofisiológicos y bioquímicos que miden una o más actividades del glutamato metabotrópico. En general, tales ensayos se puede llevar a cabo utilizando células que expresan el receptor(s) de glutamato metabotrópico(s) de interés, pero los ensayos también se pueden llevar a cabo utilizando células que expresan receptores quiméricos

de esta invención que modulan la actividad celular que se va a supervisar. Los ejemplos de tales ensayos incluyen la evaluación electrofisiológica de la función del receptor de glutamato metabotrópico en ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores de glutamato metabotrópicos clonados, la evaluación electrofisiológica de la función del receptor de glutamato metabotrópico en líneas celulares transfectadas (por ejemplo, células de CHO, células HEK 293, etc.) que expresan receptores de glutamato metabotrópicos clonados, la evaluación bioquímica de la hidrólisis de PI y la acumulación de cAMP en líneas celulares transfectadas que expresan receptores de glutamato metabotrópicos clonados, la evaluación bioquímica de la hidrólisis de PI y la acumulación de cAMP en rodajas de cerebro de rata (por ejemplo, hipocámpal, cortical, estriatal, etc.), mediciones fluorimétricas del Ca^{2+} citosólico en células granulares de cerebro de rata cultivadas, y mediciones fluorimétricas del Ca^{2+} citosólico en líneas celulares transfectadas que expresan receptores de glutamato metabotrópicos clonados.

Antes del uso terapéutico en un ser humano, los compuestos preferentemente se prueban *in vivo* utilizando modelos animales. Se pueden llevar a cabo estudios con animales para evaluar una eficacia del compuesto para tratar diferentes enfermedades o trastornos, o ejercer un efecto tal como un efecto analgésico, un efecto de mejora de la cognición, o un efecto de relajación muscular, utilizando técnicas estándar.

G. Agentes y Composiciones Farmacéuticas Novedosas

Los receptores quiméricos y métodos de cribado descritos en la presente memoria proporcionan agentes de unión al receptor de glutamato metabotrópico (por ejemplo, compuestos y composiciones farmacéuticas) descubiertos gracias a su capacidad para unirse a un receptor de glutamato metabotrópico quimérico. Tales agentes de unión son preferentemente moduladores de un receptor de glutamato metabotrópico. Ciertos de estos agentes serán compuestos novedosos identificados por los métodos de cribado descritos en la presente memoria. Además, otros de tales compuestos se derivan por metodología estándar de tales compuestos identificados cuando tales compuestos identificados se utilizan como compuestos líderes en ensayos de cribado sobre análogos de compuestos activos identificados, o en desarrollos de química médica utilizando compuestos identificados como compuestos líderes.

Además, proporcionando métodos de cribado novedosos y eficaces utilizando receptores quiméricos, esta invención proporciona un método para preparar un agente farmacéutico activo sobre un receptor de glutamato metabotrópico. Sin este método eficaz, no se identificaría a tales agentes. El método implica identificar un agente activo por cribado utilizando un receptor quimérico del tipo descrito en la presente memoria en un método de cribado como los descritos más arriba. El agente identificado o un análogo de ese agente se sintetiza en una cantidad suficiente para administrarlo a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

H. Tratamiento de Enfermedades y Trastornos

Los compuestos identificados por métodos de la invención también se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades y trastornos neurológicos. Los pacientes que padecen una enfermedad o trastorno neurológico pueden diagnosticarse por metodología clínica estándar.

Las enfermedades o trastornos neurológicos incluyen enfermedades neuronales degenerativas, excitotoxicidad de glutamato, accidente cerebrovascular hemorrágico e isquémico focal y global, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño de la célula nerviosa inducido por hipoxia, y epilepsia. Estas enfermedades y trastornos diferentes se pueden además caracterizar médicamente. Por ejemplo, las enfermedades neuronales degenerativas incluyen la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Los compuestos identificados por métodos de la invención se pueden utilizar para producir otros efectos terapéuticos en pacientes, tales como efectos analgésicos, efectos de mejora de la cognición, o efectos de relajación muscular.

Los pacientes que necesitan de tal tratamiento se pueden identificar por técnicas médicas estándar. Por ejemplo, la producción de actividad analgésica se puede utilizar para tratar pacientes que padecen de dolencias clínicas de dolor agudo y crónico que incluyen las siguientes: analgesia preoperatoria de anticipación; neuropatías periféricas tales como las que tienen lugar con diabetes mellitus y esclerosis múltiple; dolor del miembro fantasma; causalgia; neuralgias tales como las que tienen lugar con herpes zoster; dolor central tal como el que se ve con lesiones de médula espinal; hiperalgesia; y alodinia.

En el tratamiento de un paciente, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que *in vitro* modula la actividad de un receptor quimérico que tiene por lo menos el dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico. Típicamente, el compuesto modula la actividad del receptor de glutamato metabotrópico actuando como un agonista o antagonista de la activación del sitio de unión del glutamato. Preferentemente, el paciente tiene una enfermedad o trastorno neurológico, preferentemente el compuesto tiene un efecto sobre una actividad fisiológica. Tal actividad fisiológica puede ser convulsiones, neuroprotección, muerte neuronal, desarrollo neuronal, control central de la actividad cardíaca, despertar, control de los movimientos y control del reflejo vestibulo-ocular.

Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar modulando la actividad del receptor de glutamato metabotrópico incluyen uno o más de los tipos siguientes: (1) las caracterizadas por la homeostasis anormal de glutamato; (2) las

caracterizadas por una cantidad anormal de un mensajero extracelular o intracelular cuya producción puede afectarse por la actividad del receptor de glutamato metabotrópico; (3) las caracterizadas por un efecto anormal (por ejemplo, un efecto diferente en tipo o magnitud) de un mensajero intracelular o extracelular que puede mejorarse por la actividad del receptor de glutamato metabotrópico; y (4) otras enfermedades o trastornos en las que la modulación de la actividad del receptor de glutamato metabotrópico ejercerá un efecto beneficioso, por ejemplo, en enfermedades o trastornos en los que la producción de un mensajero intracelular o extracelular estimulado por la actividad del receptor compensa una cantidad anormal de un mensajero diferente.

Los compuestos y métodos también se pueden utilizar para producir otros efectos tales como un efecto analgésico, efecto de mejora de la cognición, y un efecto de relajación muscular.

Un “paciente” se refiere a un mamífero en el que la modulación de un receptor de glutamato metabotrópico tendrá un efecto beneficioso. Los pacientes que necesitan tratamiento que implica la modulación de receptores de glutamato metabotrópicos pueden identificarse utilizando técnicas estándar conocidas por los de la profesión médica. Preferentemente, un paciente es un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno caracterizado por uno o más de lo siguiente: (1) actividad anormal del receptor de glutamato (2) un nivel anormal de un mensajero cuya producción o secreción está afectada por la actividad del receptor de glutamato metabotrópico; y (3) un nivel o actividad anormal de un mensajero cuya función está afectada por la actividad del receptor de glutamato metabotrópico.

Por “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende una cantidad de un agente que alivia hasta cierto punto uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno en el paciente; o vuelve a la normalidad parcial o totalmente uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causales de la enfermedad.

La invención también permite un método para modular la actividad del receptor de glutamato metabotrópico proporcionando a una célula que tiene un receptor de glutamato metabotrópico una cantidad de una molécula moduladora del receptor de glutamato metabotrópico suficiente o para imitar uno o más efectos del glutamato en el receptor de glutamato metabotrópico, o para bloquear uno o más efectos del glutamato en el receptor de glutamato metabotrópico. El método se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*.

I. Formulación y Administración

Los compuestos activos según se identifican por los métodos de esta invención se pueden utilizar como agentes o composiciones farmacéuticas para tratar diferentes enfermedades y trastornos como se ha descrito más arriba. En este contexto, un agente o composición farmacológica se refiere a un agente o composición en una forma adecuada para su administración a un mamífero, preferentemente un ser humano.

La formulación y modo de administración óptimos de los compuestos de la presente invención a un paciente dependen de factores conocidos en la técnica tales como la enfermedad o trastorno particular, el efecto deseado, y el tipo de paciente. Aunque los compuestos se utilizarán típicamente para tratar pacientes humanos, también se pueden utilizar para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados tales como primates, animales de granja tales como cerdos, reses y aves de corral, y animales de competición y animales domésticos tales como caballos, perros y gatos.

Preferentemente, la cantidad terapéuticamente eficaz se proporciona como una composición farmacéutica. Un agente o composición farmacológica se refiere a un agente o composición en una forma adecuada para su administración en un organismo multicelular tal como un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o ruta de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, o por inyección. Tales formas deben permitir que el agente o composición alcance una célula diana, ya esté presente la célula diana en un anfitrión multicelular o en un cultivo. Por ejemplo, los agentes o composiciones farmacológicas inyectadas en la corriente sanguínea deben ser solubles. Otros factores son conocidos en la técnica, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y formas que retardan al agente o composición en ejercer su efecto.

La composiciones también se pueden formular como sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de adición de ácido) y/o complejos de las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales no tóxicas en la concentración a la cual se administran. La preparación de tales sales puede facilitar el uso farmacológico alterando las características físico-químicas de la composición sin impedir a la composición que ejerza su efecto fisiológico. Los ejemplos de las alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen disminuir el punto de fusión para facilitar la administración transmucosal e incrementar la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones más altas del fármaco.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida tales como las que contienen sulfato, hidrocloreuro, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato, ciclohexilsulfamato y quinato. (Véase por ejemplo, WO92/20642 (PCT/US92/03736)). Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener a partir de ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido ciclohexilsulfámico, y ácido quínico.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por técnicas estándar. Por ejemplo, la forma de base libre de un compuesto se disuelve en un disolvente adecuado, tal como una disolución acuosa o hidroalcohólica, que contiene el ácido apropiado y a continuación se aísla evaporando la disolución. En otro ejemplo, una sal se prepara haciendo reaccionar la base libre y el ácido en un disolvente orgánico.

También se pueden usar vehículos o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Los ejemplos de vehículos y excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares tales como lactosa, glucosa, o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y disolvente fisiológicamente compatibles. Las composiciones o composición farmacéutica que se administra mediante diferentes rutas que incluyen vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, e intramuscular, oral, tópica, o transmucosal.

Los compuestos se pueden formular para una variedad de modos de administración, que incluyen administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

Para administración sistémica, se prefiere la administración oral. Para administración oral, los compuestos se formulan en formas farmacéuticas orales convencionales tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

Alternativamente, se puede usar la inyección, p.ej., intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intratecal, o intracerebroventricular. Para inyección, los compuestos de la invención se formulan en disoluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Alternativamente, los compuestos se pueden formular en uno o más excipientes (por ejemplo, propilenglicol) que generalmente se aceptan como seguros según se define por los estándares de la USP. Además, los compuestos se pueden formular en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del uso. También están incluidas las formas liofilizadas.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos, o las moléculas se pueden administrar oralmente. Para administración transmucosal o transdérmica, se usan, en la formulación, penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, se pueden usar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosal puede ser, por ejemplo, mediante pulverizadores nasales o usando supositorios. Para administración oral, las moléculas se formulan en formas farmacéuticas orales convencionales de administración tales como cápsulas, comprimidos, y preparaciones líquidas.

Para la administración tópica, los compuestos pueden ser formulados en pomadas, bálsamos, geles o cremas, como es generalmente sabido en la técnica.

Las cantidades de diversos compuestos que se van a administrar se pueden determinar por procedimientos estándar. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz es entre aproximadamente 1 nmol y 3 μ moles de la molécula, preferentemente 0,1 nmoles y 1 μ mol dependiendo de su EC_{50} o IC_{50} y de la edad y tamaño del paciente, y la enfermedad o trastorno asociado con el paciente. En general, es una cantidad entre aproximadamente 0,1 y 50 mg/kg, preferentemente 0,01 y 20 mg/kg del animal que se va a tratar.

J. Animales Transgénicos

Se pueden producir mamíferos transgénicos no humanos que contienen un transgen que codifica un receptor quimérico, particularmente un receptor de glutamato metabotrópico quimérico. Los mamíferos transgénicos no humanos son particularmente útiles como un sistema de prueba *in vivo* para estudiar los efectos de introducir un receptor quimérico. Los sistemas de modelo experimental se pueden utilizar para estudiar los efectos en cultivos celulares y de tejidos, en animales enteros, o en células o tejidos particulares en animales enteros o sistemas de cultivo de tejidos. Los efectos se pueden estudiar durante intervalos de tiempo especificados (que incluyen durante la embriogénesis).

Los sistemas de modelo experimental se pueden utilizar para estudiar los efectos fisiológicos de los receptores. Se pueden crear sistemas de modelos que tengan grados variables de expresión del receptor. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un receptor se puede insertar en células que expresan naturalmente los receptores precursores, de manera tal que el gen quimérico se expresa en niveles mucho más altos. También, se puede utilizar un gen recombinante para inactivar el gen endógeno por recombinación homóloga, y de esa forma crear una célula, tejido o animal deficiente del receptor.

Se puede causar la inactivación de un gen, por ejemplo, utilizando un gen recombinante manipulado para que contenga una mutación por inserción (por ejemplo, el gen neo). El gen recombinante se inserta en el genoma de una célula, tejido o animal destinatarios e inactiva la transcripción del receptor. Un constructo tal se puede introducir en una célula, tal como un embriocitoblasto, por técnicas tales como transfección, transducción, e inyección. Los citoblastos que carecen de una secuencia de receptor intacta pueden generar animales transgénicos deficientes en el receptor.

Los modelos de prueba preferidos son animales transgénicos. Un animal transgénico tiene células que contienen ADN que se ha insertado artificialmente en una célula y se ha insertado en el genoma del animal que se desarrolla a

partir de esa célula. Los animales transgénicos preferidos son primates, ratones, ratas, vacas, cerdos, caballos, cabras, ovejas, perros y gatos.

Están disponibles una variedad de métodos para producir animales transgénicos. Por ejemplo, el ADN se puede inyectar en el pronúcleo de un huevo fertilizado antes de la fusión de los pronúcleos macho y hembra, o inyectar en el núcleo de una célula embrionaria (por ejemplo, los núcleos de un embrión de dos células) seguido del inicio de la división celular (Brinster *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442, 1985). A modo de otro ejemplo, los embriones pueden infectarse con virus, especialmente retrovirus, modificados para llevar secuencias de nucleótido del receptor quimérico de la presente invención.

Se pueden manipular en cultivo citoblastos pluripotes, derivados de la masa celular interior del embrión y estabilizados en cultivo, para incorporar secuencias de nucleótido de la invención. Se puede producir un animal transgénico a partir de tales citoblastos mediante la implantación en un blastocisto que se implanta en una madre adoptiva y se deja llegar a término. Se pueden obtener animales adecuados para experimentos transgénicos de fuentes comerciales estándar tales como Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), y Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN).

Los métodos para el cultivo de embriocitoblastos (células ES) y la posterior producción de animales transgénicos por la introducción de ADN en células ES utilizando métodos tales como electroporación, precipitación de fosfato cálcico/ADN e inyección directa son también bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Véase, por ejemplo, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, E.J. Robertson, ed., IRL Press (1987).

Los procedimientos para manipulaciones de embriones son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos para la manipulación del embrión de roedor y para la microinyección de ADN en el pronúcleo del cigoto son bien conocidos por los expertos normales en la técnica (Hogan *et al.*, *supra*). Los procedimientos de microinyección para huevos de pez, anfibio y pájaros se detallan en Houdebine y Chourrout (Experientia 47:897-905, 1991). Otros procedimientos para la introducción de ADN en tejidos de animales se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.945,050 (Sandford *et al.*, 30 de julio de 1990).

La transfección y aislamiento de los clones deseados se puede llevar a cabo utilizando técnicas estándar (por ejemplo, E.J. Robertson, *supra*). Por ejemplo, la integración aleatoria de genes se puede llevar a cabo co-transfectando el ácido nucleico con un gen que codifica la resistencia a los antibióticos. Alternativamente, por ejemplo, el gen que codifica la resistencia a los antibióticos se une físicamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico de la presente invención.

Las moléculas de ADN introducidas en células ES también se pueden integrar en el cromosoma a través del procedimiento de recombinación homóloga. (Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989). Los métodos para la selección positiva del acontecimiento recombinante (por ejemplo, resistencia a la neomicina) y la selección dual positiva-negativa (por ejemplo, resistencia a la neomicina y resistencia al ganciclovir) y la posterior identificación de los clones deseados por PCR se han descrito por Capecchi (*supra*), y Joyner *et al.* (Nature 338:153-156, 1989).

La fase final del procedimiento es inyectar células ES tomadas como objetivo en blastocistos y transferir los blastocistos dentro de hembras pseudopreñadas. Se cría a los animales quiméricos resultantes y las crías se analizan por el método de transferencia de Southern para identificar individuos que llevan el transgen.

Un ejemplo que describe la preparación de un ratón transgénico es como sigue. Se induce a ratones hembras a superovular y se ponen con machos. Las hembras apareadas se sacrifican por asfixia con CO₂ o por dislocación cervical y se recuperan los embriones de los oviductos extirpados. Se eliminan las células del cumulus de alrededor. A continuación los embriones pronucleares se lavan y almacenan hasta el momento de la inyección.

Ratones hembras adultas de ciclo aleatorio apareadas con machos vasectomizados sirven como receptoras para embriones implantados. Las hembras receptoras se aparean al mismo tiempo que las hembras donantes y los embriones se transfieren quirúrgicamente a las hembras receptoras.

El procedimiento para generar ratas transgénicas es similar al de ratones. (Véase Hammer *et al.*, Cell 63:1099-1112, 1990). Los procedimientos para la producción de mamíferos no roedores y otros animales transgénicos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Houdebine y Chourrout, *supra*; Pursel *et al.*, Science 244:1281-1288, 1989; y Simms *et al.*, Bio/Technology 6:179-183, 1988.

K. Líneas Celulares Transfectadas

Se puede utilizar ácido nucleico que expresa un receptor quimérico funcional para crear líneas celulares transfectadas que expresan funcionalmente un receptor quimérico específico. Tales líneas celulares tiene una variedad de usos tales como usarse para el cribado de alto rendimiento de moléculas capaces de modular la actividad del receptor de glutamato metabotrópico; y usarse para ensayar la unión a un receptor de glutamato metabotrópico.

Diversas líneas celulares son capaces de acoplar receptores expresados exógenamente a respuestas funcionales endógenas. Se pueden probar varias de estas líneas celulares (por ejemplo, NIH-3T3, HeLa, NG115, CHO, HEK 293 y COS7) para confirmar que carecen de glutamato metabotrópico endógeno. Las líneas que carezcan de una respuesta al glutamato externo se pueden utilizar para establecer líneas celulares establemente transfectadas que expresan los receptores quiméricos clonados de la invención.

La producción de estos transfectantes estables se consigue por transfección de una línea celular apropiada con un vector de expresión eucariote, tal como pMSG, en el que la secuencia de codificación del ADNc del receptor de glutamato metabotrópico quimérico se ha clonado en el sitio de clonación múltiple. Estos vectores de expresión contienen una región promotora, tal como el promotor del virus del tumor mamario del ratón (MMTV), que conduce la transcripción de alto nivel de ADNcs en diversas células de mamíferos. Además, estos vectores contienen genes para la selección de células que expresan establemente el ADNc de interés. El marcador seleccionable en el vector pMSG codifica una enzima, xantina-guanina fosforribosil transferasa (XGPRT), que confiere resistencia a un inhibidor metabólico que se añade al cultivo para matar células no transfectadas. Normalmente se evalúan diversos vectores de expresión y esquemas de selección para determinar las condiciones óptimas para la producción de líneas celulares que expresan el receptor de glutamato metabotrópico para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento.

El método más eficaz para la transfección de líneas celulares eucarióticas con ADN plasmídico varía con el tipo de célula dado. La constructo de expresión del receptor quimérico se introducirá en células cultivadas mediante la técnica apropiada, precipitación del Ca^{2+} con fosfato, transfección con DEAE-dextrano, lipofección o electroporación.

Las células que han incorporado establemente o están manteniendo episomalmente el ADN transfectado se identificarán por su resistencia a los medios de selección, según se ha descrito más arriba, y se producirán líneas celulares clónicas por la expansión de las colonias resistentes. La expresión del ADNc del receptor de glutamato metabotrópico quimérico por estas líneas celulares se valorará mediante análisis de solución de hibridación y de transferencia de Northern. La expresión funcional de la proteína del receptor se determinará midiendo la movilización del Ca^{2+} intracelular en respuesta a agonistas del receptor de calcio aplicados externamente.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, pero no limitan su alcance.

30

III. Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar diferentes aspectos y realizaciones de la presente invención. Estos ejemplos no pretenden de ningún modo limitar la invención descrita. Por el contrario, ilustran metodologías mediante las cuales se pueden construir los novedosos receptores quiméricos de la presente invención. También ilustran metodologías mediante las cuales se pueden cribar compuestos para determinar que compuestos se unen a o modulan un mGluR deseado.

40

Ejemplo 1

phPCaR4.0 y pmGluR1s

El plásmido phPCaR4.0 (Garrett *et al.*, J. Biol. Chem., 270:12919, 1995) se aisló a partir de células bacterianas de *E. coli* que contenían el plásmido cultivadas en caldo nutriente que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina (Boehringer Mannheim). Este ADN plasmídico se utilizó como fuente para el ADN que codifica el receptor de calcio humano que se clonó en el sitio EcoRI del vector pBluescript SK (Stratagene) en la orientación T7. Todas las enzimas de restricción y enzimas de modificación se compraron a New England Biolabs a menos que se indique lo contrario.

50

El plásmido p7-3/6A se montó en pBluescript SK a partir de dos subclones solapados del mGluR1 de rata obtenido a partir de una criba de oligonucleótidos de una genoteca de ADNc de bulbo olfativo de rata comercialmente disponible (Stratagene). Este ADN plasmídico se utilizó como la fuente del receptor de glutamato metabotrópico, mGluR1, también se utilizó para cribar una genoteca de ADNc cerebelar humano comercialmente disponible para el análogo humano. La genoteca cerebelar humana se cribó con un mGluR1 de rata marcado radioactivamente mediante un método descrito en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Capítulo 1, 1989. Se rescataron placas positivas utilizando el protocolo del fabricante y la cartografía de restricción para compararlos contra la secuencia del mGluR1 humano publicada (publicaciones de Patente Europea 0 569 240 A1 y 0 568 384 A1). Se ensamblaron dos subclones para crear un mGluR1 humano completo.

60

Alternativamente, se puede obtener la secuencia del mGluR1 humano de las Publicaciones de Patente Europeas N° 0 569 240 A1 y 0 568 384 A1. Las sondas preparadas utilizando esta secuencia se pueden utilizar explorar genotecas de ADNc humano para obtener el clon humano en toda su longitud. Además, las secuencias relevantes se pueden sintetizar utilizando la secuencia descrita en esos documentos.

65

Ejemplo 2

pmGluR1/CaR

Se construyeron receptores quiméricos utilizando la estrategia de PCR recombinante y de clonación multietapa. Una visión general de la PCR recombinante se presenta por R. Higuchi en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (1990) Academic Press, Inc. En el primer constructo se utilizó PCR recombinante para combinar las secuencias del mGluR1 y el CaR a través del empalme de los dominios extracelular y transmembranal. La primera quimera, pR1/CaR, contenía el dominio extracelular del mGluR1 y la región transmembranal e intracelular del receptor de calcio. La unión quimérica fue creada usando tres reacciones PCR independientes. La primera reacción utilizó dos cebadores específicos para el mGluR1 de rata, A4, un 22 mero (unidades monoméricas) que codifica los nucleótidos 1146 a 1167, y un cebador antisentido, oligoB, un 43 mero que contiene 22 bases del mGluR1 (nucleótidos -1755 a -1776) y 21 bases del CaR (nucleótidos -1837 a -1857). Estos cebadores se usaron para amplificar un fragmento de 650 pb del mGluR1 de rata. En una reacción de PCR separada, se amplificó un fragmento de 500 pb del CaR utilizando cebador híbrido C, un 43 mero que era el complemento de oligoB, y D4, un cebador antisentido que correspondía a los nucleótidos -2256 a -2279 del CaR. Estos dos productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa y se hibridaron juntos en igual relación molar en presencia de los cebadores externos A4 y D4 y la ADN polimerasa revisora, Pfu (Stratagene). El producto de PCR quimérico de 1.100 pb se digirió con Nsi I y se subclonó en pCar4.0 digerido con EcoRV y Nsi I. El subclon resultante se digirió posteriormente con Xho I y Sfi I para eliminar el dominio extracelular del CaR que a continuación se reemplazó con el fragmento Xho I- Sfi I del mGluR1 de rata. La quimera resultante, pR1/Car se validó por cartografía de restricción y secuenciación de ADN de doble hebra con Sequenase Versión 2.0 (US Biochemical). La secuencia de ADN para pR1/Car y la correspondiente secuencia de aminoácidos se representan en la Figura 2.

Ejemplo 3

pCaR/R1

Un segundo constructo, pCaR/R1, fue un recíproco de la quimera descrita en el ejemplo 2 en que codificaba el dominio extracelular del CaR y la región transmembranal e intracelular del mGluR1. El empalme quimérico se creó como se ha descrito más arriba utilizando PCR recombinante. La primera reacción utilizó dos cebadores específicos para el CaR, CRSf1, un 22 mero correspondiente a los nucleótidos 862 a 883, y un cebador antisentido, CR1794, un 36 mero con 18 bases correspondientes al CaR (nucleótidos -1777 a -1794) y 18 bases del mGluR1 (nucleótidos -2110 a -2127). Estos cebadores se usaron para amplificar un fragmento de 935 pb del CaR. En una reacción de PCR separada, se amplificó un fragmento de 360 pb del mGluR1 utilizando el cebador híbrido R12110, un 36 mero que contiene 18 bases del CaR (nucleótidos 1777 a 1794) covalentemente unido a 18 bases del mGluR1 (nucleótidos 2110 a 2127) y R1Bg1, un cebador antisentido correspondiente a los nucleótidos -2451 a -2470 del mGluR1. Estos dos productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa y se hibridaron juntos en igual relación molar en presencia de los cebadores externos CRSf1 y R1Bg1 y la ADN polimerasa revisora, Pfu (Stratagene). El producto de PCR quimérico de 1.250 pb se digirió con Sfi I y Bgl II y se subclonó en p7/3A digerido con las mismas enzimas. Un subclon se digirió posteriormente con Sal I y Sfi I para eliminar el dominio extracelular del mGluR1 que a continuación se reemplazó con el fragmento Sal I-Sfi I del CaR. La quimera resultante, pCaR/R1 se validó por cartografía de restricción y secuenciación de ADN de doble hebra utilizando Sequenase Versión 2.0 (US Biochemical). La secuencia de ADN es para pCaR/R1 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se representa en la Figura 3.

Ejemplo 4

pratCH3 y phCH4

Estas quimeras son un resultado de intercambiar la cola citoplásmica del CaR sobre los dominios extracelular y transmembranal del mGluR1 de rata o humano. La PCR recombinante se utilizó para unir la cola del extremo C del CaR sobre el mGluR1 humano (que codifica la secuencia de señal del mGluR1 de rata) después del nucleótido 2535. La primera reacción de PCR utilizó dos cebadores específicos para el mGluR1 humano, M-1rev un 24 mero correspondiente a los nucleótidos 2242 a 2265, y un cebador antisentido, CH3R1, un 36 mero compuesto de 18 bases del hmGluR1 (nucleótidos -2518 a -2535) y 18 bases del CaR (nucleótidos -2602 a -2619). Estos cebadores se usaron para amplificar un fragmento de 300 pb del hmGluR1. En una reacción de PCR separada, se amplificó un fragmento de 750 pb del CaR utilizando el cebador híbrido CH3CaR, un 36 mero que es el complemento del oligo CH3R1, y un cebador T3 comercialmente disponible (Stratagene) que ceba en el vector Bluescript en una región secuencia abajo desde el extremo 3' del CaR. Los dos productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa y se hibridaron juntos en igual relación molar en presencia de los cebadores externos M-1 rev y T3 y la ADN polimerasa revisora, Pfu (Stratagene). El producto de PCR quimérico de 1 kb se digirió con Nhe I y Not I y se subclonó en phmGluR1 digerido con las mismas enzimas. La quimera resultante, phCH4 se validó por cartografía de restricción y secuenciación de ADN de doble hebra. Para detectar la actividad funcional en el ensayo de ovocito con este clon, fue necesario intercambiar la región sin traducir 5' y la secuencia de señal del mGluR1 de rata con la misma región de este clon humano. Esto se hizo utilizando un sitio de restricción Bsu36I. Adicionalmente, se subclonó un fragmento Acc I del mGluR1 de rata dentro de phCH4 para crear una versión de rata de esta misma quimera. Esta quimera se

denomina ratCH3. La secuencia de ADN para prach3 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se representan en la Figura 4. La secuencia de ADN para phCH44 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se representan en la Figura 5.

5 Utilizando las técnicas descritas en los ejemplos anteriormente mencionados, prevemos, por lo tanto, la utilidad de construcción, evaluación y cribado de otras quimeras de mGluR/CaR. En este ejemplo hemos tomado un receptor de glutamato metabotrópico del Grupo I que, al igual que el receptor de calcio, se acopla a la activación de fosfolipasa C y la movilización de calcio intracelular, y por intercambio de la cola del extremo C, mantiene la integridad del sistema de segundo mensajero. Adicionalmente, cuando se añadió la cola del CaR al mGluR1, se perdieron las propiedades de desensibilización. Esto demuestra la viabilidad de cambiar el acoplamiento específico a proteína G de receptores de glutamato metabotrópicos por los del CaR intercambiando dominios intracelulares. Por ejemplo, mGluRs del Grupo II, tales como mGluR2 o mGluR3 que se acoplan a G_i , se podrían cambiar a receptores acoplados a G_q . Esto se puede hacer intercambiando sobre estos receptores la cola citosólica del extremo C del CaR utilizando el protocolo descrito en los ejemplos 2,3, y 4. El acoplamiento a G_q eficaz se pudo evaluar en los ovocitos como se describe en los ejemplos 15 5 y 6. La activación de un Grupo II por L-CCG-I (su agonista más potente), debe inducir la movilización del Ca^{2+} intracelular que causará la corriente hacia dentro Cl^- de rectificación detectable medida en el ovocito de voltaje fijado.

Para aumentar la eficacia de la unión a proteína G puede ser útil intercambiar uno o más bucles intracelulares (citoplásmicos) adicionales del CaR sobre el mGluR1. Por ejemplo, tal sustitución puede implicar cualquiera de: bucle intracelular 1, bucle intracelular 2, y bucle intracelular 3 de un receptor de calcio, sustituidos solos o en cualquier combinación de bucles. Tal intercambio de subdominios puede ser necesario para la transferencia más eficaz de la especificidad de unión a proteína G.

25 Ejemplo 5

Transcripción de ARN in vitro

Se produjeron transcripciones de ARN que codifican los receptores descritos en los ejemplos 1 a 4 mediante transcripción enzimática a partir de moldes plasmídicos utilizando T7 polimerasa suministrada con la mMessage mMachine™ (Ambion). Se trató a cada plásmido con una enzima de restricción para hacer un único corte distal al extremo 3' del ADNc insertado para linealizar el molde. Este ADN se incubó con T7 ARN polimerasa en presencia de nucleótido capuchón ("cap") GpppG, rATP, rCTP, rUTP y rGTP. La transcripción sintética de ARN se purificó por tratamiento con desoxirribonucleasa de la mezcla de reacción y posterior precipitación en alcohol. El ARN se 35 cuantificó por espectroscopía de absorbancia (OD_{260}) y se visualizó sobre un gel de formaldehído al 1,2% teñido con etidio.

40 Ejemplo 6

Expresión funcional en ovocitos

Se obtuvieron ovocitos adecuados para inyección a partir de sapos hembras de *Xenopus laevis* utilizando los procedimientos descritos en C. J. Marcus-Sekura y M. J. M. Hitchcock, Methods in Enzymology, Vol. 152 (1987). Se incubaron piezas de lóbulo ovárico durante 30 minutos en solución Salina de Barths Modificada (MBS, por sus siglas en inglés) libre de Ca^{2+} que contenía 1,5 mg/ml de colagenasa tipo IA (Worthington). Posteriormente, se inyectaron en cada ovocito 5 ng de la transcripción de ARN preparada como se ha descrito en el Ejemplo 5. Después de la inyección, se incubaron los ovocitos a 16°C en MBS que contenía $CaCl_2$ 0,5 mM durante 2-7 días antes del examen electrofisiológico.

Se determinó la capacidad de cada receptor quimérico de funcionar mediante el registro del voltaje de los por los que pasa la corriente a través de la membrana del ovocito en respuesta a los agonistas del receptor de glutamato y de calcio. Se fijó el voltaje de los ovocitos a una diferencia de potencial sostenida de -60 mV con un amplificador Axoclamp 2A (Axon Instruments, Foster City, CA) utilizando técnicas estándar de fijación de voltaje de dos electrodos. Las corrientes se registraron en un registrador gráfico. La solución salina de control estándar era MBS que contenía $CaCl_2$ 0,3 mM y 0,8 $MgCl_2$. Se aplicaron las sustancias de prueba mediante perfusión a un caudal de aproximadamente 5 ml/min. Todos los experimentos se hicieron a temperatura ambiente. La corriente sostenida fue estable en un ovocito dado y varió entre +10 a -200 nA para diferentes ovocitos. La activación de I_{Cl} en respuesta a la activación de los receptores y posterior aumento en el Ca^{2+} intracelular ($[Ca]_{in}$) se cuantificó midiendo la corriente máxima hacia el interior estimulada por el agonista o fármaco, relativa a la corriente sostenida de -60 mV.

Figura 6 pR1/CaR vs. mGluR1 de rata (glutamato y quisqualato).

Figura 7 CaR/R1 vs. hPCar (calcio)

Figura 8 prach3 vs. mGluR1 de rata y CaR (indicios de desensibilización)

Ejemplo 7

Construcción de pCEPCaR/R1 a partir de pCaR/R1

- 5 El ADN del plásmido pCaR/R1 se digirió y clonó en un vector de expresión episomal de mamífero comercialmente disponible, pCEP4 (Invitrogen), utilizando las enzimas de restricción Kpn I y Not I. Los productos de ligación se transfectoron en células DH5a que se habían hecho competentes para la transformación de ADN. Estas células se sembraron en placas con Medio de Luria-Bertani (LB) (descrito en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Se seleccionó un clon de las colonias que crecieron. Este clon, pCEPCaR/R1 se caracterizó mediante digestión con enzima de restricción.

Ejemplo 8

15 *Transfección y crecimiento de HEK293/pCEPCaR/R1*

- Se cultivaron células de riñón embrionario Humano (293, ATCC, CRL 1573) de una manera rutinaria. Se sembraron células en placas de cultivo celular de 10 cm en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) que contenía suero fetal bovino (FCS, por sus siglas en inglés) al 10% y 1 X Penicilina-Estreptomicina (PS (por sus siglas en inglés), Life Technologies) de manera que serían ~70% confluentes después de una incubación durante toda la noche. Para preparar ADN por transfección, el plásmido pCEPCaR/R1 se precipitó con etanol, se aclaró y resuspendió en agua estéril a una concentración de 1 µg/µl. Catorce microgramos de ADN se incubaron con la formulación de liposoma LipofectAMINE™ (Life Technologies) durante 20 minutos en Opti-MEM® (Life Technologies) libre de suero. Después de la incubación a temperatura ambiente, se añadieron 6,8 ml de Opti-MEM® a la mezcla de transfección. Esta disolución se añadió a las células que se habían enjuagado con lavados de 2X5 ml de Opti-MEM® libre de suero. Las células y la mezcla de transfección se incubaron a 37°C durante 5 horas, momento en el cual se añadieron más medio y suero fetal bovino para llevar la concentración de suero al 10%. Después de toda la noche de incubación el medio se cambió de nuevo a D-MEM con FCS al 10% y 1 x PS. Después de una incubación adicional de 24 horas, se desprendieron las células con tripsina y se volvieron a sembrar en medio que contenía 200 µg/ml de higromicina (Boehringer Mannheim). Las células que crecieron contenían pCEPCaR/R1 que codifica el gen resistente a la higromicina. Se recuperaron clones individuales y se propagaron utilizando técnicas estándar de cultivo tisular. Se prepararon subcultivos de clones individuales y reunidos por disociación en medios recientes de cultivo de tejidos, y se sembraron en placas de cultivo recientes a 1/10º del volumen original.

35 Ejemplo 9

Ensayo del Fura de HEK293/pCEPCaR/R1

- Se cuantifican las mediciones de la liberación de calcio intracelular en respuesta a aumentos en calcio extracelular utilizando el ensayo del Fura (Parks *et al.* 1989). Células establemente transfectadas que contienen pCEPCaR/R1 se cargan con acetoximetil éster del Fura-2 2 µM por incubación durante 20-30 minutos a 37°C en SPF-PCB (NaCl 126 mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 20 mM, pH 7,4), que contiene CaCl₂ 1,25 mM, 1 mg/ml de glucosa, BSA¹ al 0,5%. A continuación las células se lavan 1 a 2 veces en SPF-PCB que contiene CaCl₂ 0,5 mM, BSA al 0,5% y se resuspenden a una densidad de 4 a 5 millones de células/ml y se guardan a 22°C en un vaso de precipitados de plástico. Para registrar las señales de fluorescencia, las células se diluyen cinco veces en una cubeta de cuarzo con SPF-PCB libre de BSA a 37°C para alcanzar una concentración final de BSA de 0,1% (1,2 ml de SPF-PCB libre de BSA a 37°C + 0,3 ml de suspensión de células). Se llevan a cabo mediciones de fluorescencia a 37°C con agitación constante utilizando un espectrofluorímetro hecho de encargo (Biomedical Instrumentation Group, Universidad de Pensilvania). Las longitudes de onda de excitación y emisión son 340 nm y 510 nm, respectivamente. Para calibrar las señales de fluorescencia, se añadió digitonina (Sigma, St. Louis, MO; catálogo # D 5628; 50 µg/ml, final) para obtener $F_{\max}$, y la $F_{\min}$ aparente se determina añadiendo EGTA (10 mM, final) y Tris base (pH ~ 10, final). Las concentraciones de Ca²⁺ intracelular liberado se calculan utilizando una constante de disociación (Kd) de 224 nM y la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = (F - F_{\min}/F_{\max} - F) \times Kd$$

Los resultados se representan gráficamente en la Figura 9.

60 Ejemplo 10

Ensayo de Unión al Receptor Recombinante

- Lo siguiente es un ejemplo de un ensayo rápido de cribado para obtener compuestos que modulan la actividad del receptor de glutamato metabotrópico. El ensayo de cribado primero mide la capacidad de los compuestos para unirse a receptores quiméricos recombinantes, o fragmentos de receptor o mGluR, CaR o receptores quiméricos. A continuación los compuestos que se unen a tales receptores o fragmentos se prueban respecto a su capacidad para modular una o más actividades en un receptor de glutamato metabotrópico.

ES 2 308 779 T3

En un procedimiento, se obtiene un ADNc o clon de gen que codifica un receptor de glutamato metabotrópico. Los distintos fragmentos del clon se expresan en un vector de expresión apropiado para producir el polipéptido(s) más pequeño del receptor obtenible capaz de unirse al glutamato. Tales experimentos pueden facilitarse utilizando una línea celular establemente transfectada de mamífero (por ejemplo, células HEK 293) que expresa el receptor de glutamato metabotrópico.

El polipéptido(s) recombinante que tiene las propiedades de unión deseadas se puede unir a un soporte de fase sólida utilizando procedimientos químicos estándar. Esta fase sólida, o matriz de afinidad, a continuación se puede poner en contacto con glutamato para demostrar que el glutamato puede unirse a la columna, y para identificar condiciones por las que el glutamato se puede separar de la fase sólida. Después, este procedimiento se puede repetir utilizando una quinioteca grande para determinar los compuestos que son capaces de unirse a la matriz de afinidad. A continuación, los compuestos unidos se pueden liberar de una manera similar al glutamato. Se pueden utilizar condiciones de unión y liberación alternativas para obtener compuestos capaces de unirse bajo condiciones distintas a las utilizadas para la unión del glutamato (por ejemplo, condiciones que imiten mejor las condiciones fisiológicas encontradas especialmente en estados patológicos). Los compuestos que se unen al mGluR pueden seleccionarse así a partir de una colección muy grande de compuestos presentes en un medio o extracto líquido.

En un método alternativo, receptores de glutamato metabotrópico/calcio quiméricos se unen a una columna u otro soporte de fase sólida. A continuación, se pueden identificar los compuestos que no son liberados de manera competitiva por los reactivos de unión al sitio de unión del glutamato en el receptor. Tales compuestos definen sitios de unión alternativos en el receptor. Tales compuestos pueden ser estructuralmente distintos de los compuestos conocidos y pueden definir clases químicas de agonistas o antagonistas que pueden ser útiles como agentes terapéuticos.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor quimérico de receptor de glutamato metabotrópico/receptor de calcio acoplado a proteína G (mGluR/CaR), comprendiendo el receptor quimérico un dominio extracelular, un dominio transmembranal siete, y una cola citoplásmica intracelular, en el que:

un dominio o sitio de unión del ligando, sitio de acoplamiento de proteína G o sub-dominio 7TMD del CaR se sustituye con el dominio o sub-dominio homólogo del mGluR; o

un dominio o sitio de unión del ligando, sitio de acoplamiento de proteína G o sub-dominio 7TMD del mGluR se sustituye con el dominio o subdominio homólogo del CaR; y

en el que el receptor quimérico se une a un ligando natural, un agonista o antagonista del mGluR; o un ligando natural, un agonista o antagonista del CaR.

2. Un receptor quimérico de receptor de glutamato metabotrópico/receptor de calcio acoplado a proteína G (mGluR/CaR) que comprende:

(a) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,

un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o

(b) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,

un dominio transmembranal siete de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o

(c) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,

un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico excepto que dicho dominio transmembranal siete comprende por lo menos un bucle citoplásmico de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o

(d) un dominio extracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G,

un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o

(e) un dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico,

un dominio transmembranal siete de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico; o

(f) un dominio extracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G,

un dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G; o

(g) un dominio extracelular de un receptor de calcio acoplado a proteína G,

un dominio transmembranal siete de un receptor de calcio acoplado a proteína G, y

un dominio de cola citoplásmica intracelular de un receptor de glutamato metabotrópico.

3. Una molécula de ácido nucleico enriquecida, purificada o aislada que codifica a un receptor mGluR/CaR quimérico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

4. Un ácido nucleico que codifica al receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

5. Un vector de expresión replicable que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica al receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

6. Una célula anfitriona recombinante transformada con el vector de la reivindicación 5.

7. Un procedimiento para la producción de un receptor mGluR/CaR quimérico, comprendiendo dicho procedimiento:

cultivar, bajo condiciones nutrientes adecuadas, células anfitrionas procariotas o eucariotas transformadas o transfectadas con el vector de expresión de la reivindicación 5, de una manera que permite la expresión de dicho receptor mGluR/CaR quimérico.

8. Un método de cribado para un compuesto que se une a o modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico que comprende:

- (a) preparar un receptor mGluR/CaR quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,
- (b) introducir dicho receptor mGluR/CaR quimérico y dicho compuesto en un medio aceptable, y
- (c) supervisar la unión o modulación por medios físicamente detectables identificando de ese modo los compuestos que se unen a o modulan la actividad de dicho receptor de glutamato metabotrópico.

9. Un método de cribado para un compuesto que se une a o modula la actividad de un receptor de glutamato metabotrópico que comprende las etapas de:

- (a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,
- (b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor mGluR/CaR quimérico en una célula anfitriona,
- (c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),
- (d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y
- (e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula anfitriona.

10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha célula anfitriona es una célula eucariota.

11. Un método de cribado para un compuesto que se une a o modula un receptor de glutamato metabotrópico y/o un receptor de calcio acoplado a proteína G, que comprende las etapas de:

- (a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer fragmento que comprende:
 - i) el dominio extracelular de un receptor de glutamato metabotrópico, o
 - ii) el dominio extracelular y el dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico,
- (b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho primer fragmento en una célula anfitriona,
- (c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),
- (d) recuperar el primer fragmento a partir de la célula anfitriona,
- (e) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo fragmento que comprende:
 - i) el dominio transmembranal siete y el dominio de la cola citoplásmica de un receptor de calcio, o
 - ii) el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio acoplado a proteína G, o
 - iii) el dominio transmembranal siete de un receptor de glutamato metabotrópico y el dominio de cola citoplásmica de un receptor de calcio,
- (f) insertar la secuencia de (e) en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho segundo fragmento en una célula anfitriona,

(g) transformar una célula anfitriona con el vector de (f),

(h) recuperar el segundo fragmento a partir de la célula anfitriona de (g), y

(i)

i) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) i) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) i) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y dicho compuesto en un medio aceptable, o

ii) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) ii) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) ii) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional de la reivindicación 1 y dicho compuesto en un medio aceptable, o

iii) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) iii) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) iii) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional de la reivindicación 1 y dicho compuesto en un medio aceptable, o

iv) introducir el primer fragmento codificado por el ácido nucleico de (a) iii) y el segundo fragmento codificado por el ácido nucleico de (e) iv) para formar un receptor quimérico mGluR/CaR funcional y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(j) supervisar la unión y/o modulación del compuesto por medios físicamente detectables.

12. Un método de cribado para compuestos que modulan la actividad tanto de un receptor de glutamato metabotrópico como de un receptor de calcio, que comprende las etapas de:

(a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,

(b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona,

(c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),

(d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula.

13. Un método de determinar el sitio de acción de:

1) un compuesto activo del receptor de glutamato metabotrópico, que comprende las etapas de:

(a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,

(b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona,

(c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),

(d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula, o

2) un compuesto activo del receptor de calcio, que comprende las etapas de:

(a) preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,

(b) insertar la secuencia en un vector de expresión replicable capaz de expresar dicho receptor quimérico en una célula anfitriona,

(c) transformar una célula anfitriona con el vector de (b),

(d) introducir dicha célula anfitriona transformada y dicho compuesto en un medio aceptable, y

(e) supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula.

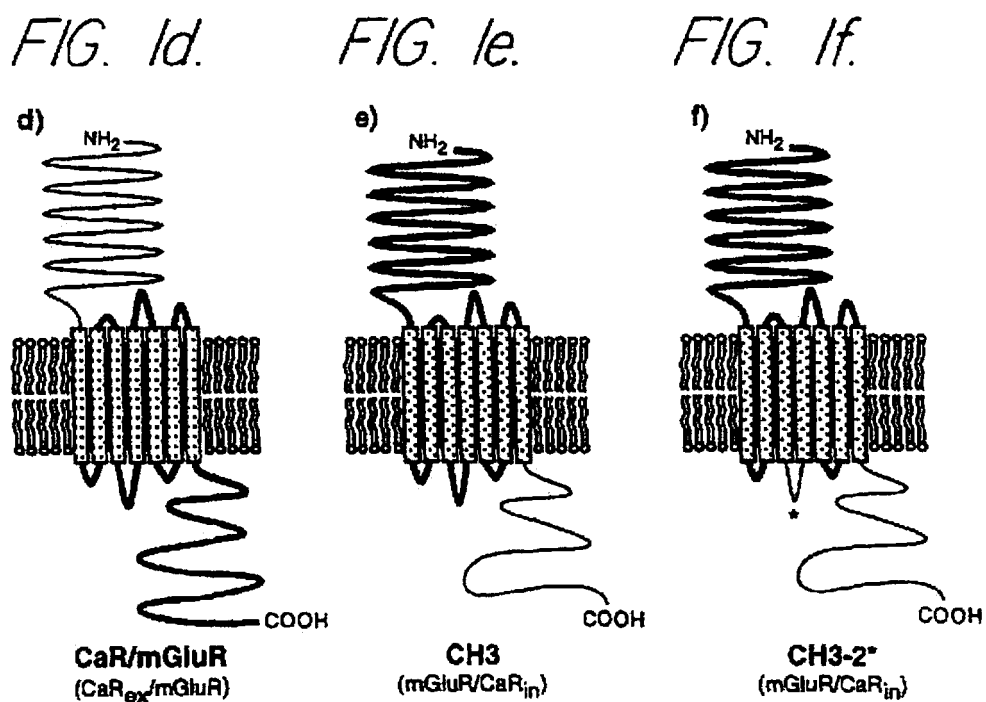
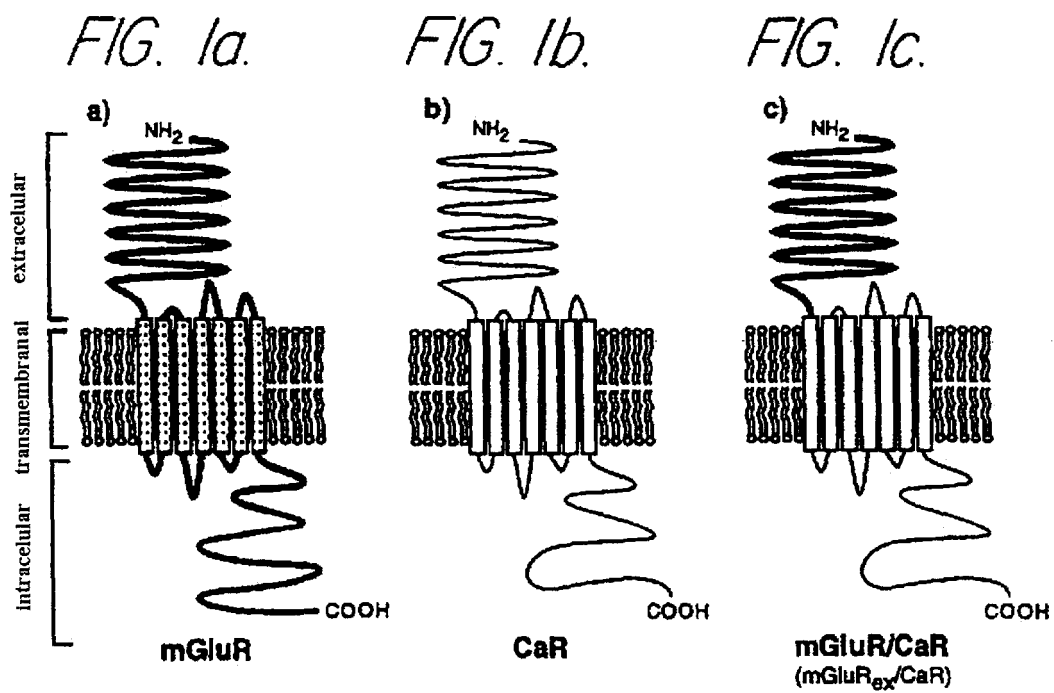


FIG. 2a.

Intervalo de secuencia: -7 to 3379

```

      3      13      23      33
      *      *      *      *
CGCCACA ATG GTC CGG CTC CTC TTG ATT TTC TTC CCA ATG ATC TTT TTG
Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro Met Ile Phe Leu>
b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b >
a a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 30 a a a40 >

43      53      63      73      83
*      *      *      *      *
GAG ATG TCC ATT TTG CCC AGG ATG CCT GAC AGA AAA GTA TTG CTG GCA
Glu Met Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys Val Leu Leu Ala>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a a 50a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a 80a a a >

93      103      113      123      133
*      *      *      *      *
GGT GCC TCG TCC CAG CGC TCC GTG GCG AGA ATG GAC GGA GAT GTC ATC
Gly Ala Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp Gly Asp Val Ile>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
90 a a 100 a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a a 130 a a >

143      153      163      173      183
*      *      *      *      *
ATC GGA GCC CTC TTC TCA GTC CAT CAC CAG CCT CCA GCC GAG AAG GTA
Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro Ala Glu Lys Val>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
140a a a 150 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a a 180 a a >

193      203      213      223      233
*      *      *      *      *
CCC GAA AGG AAG TGT GGG GAG ATC AGG GAA CAG TAT GGT ATC CAG AGG
Pro Glu Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
190 a a a20 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 20 a a a230a >

243      253      263      273
*      *      *      *      *
GTG GAG GCC ATG TTC CAC ACG TTG GAT AAG ATT AAC GCG GAC CCG GTG
Val Glu Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn Ala Asp Pro Val>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a 240 a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 270 a a 280 >

283      293      303      313      323
*      *      *      *      *
CTC CTG CCC AAC ATC ACT CTG GGC AGT GAG ATC CGG GAC TCC TGC TGG
Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a a290a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a320a a a >

333      343      353      363      373
*      *      *      *      *
CAC TCT TCA GTG GCT CTC GAA CAG AGC ATC GAA TTC ATC AGA GAC TCC
His Ser Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
330 a a 340 a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a a 370 a a >

383      393      403      413      423
*      *      *      *      *
CTG ATT TCC ATC CGA GAT GAG AAG GAT GGG CTG AAC CGA TGC CTG CCT
Leu Ile Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Leu Asn Arg Cys Leu Pro>

```

FIG. 2b.

```

b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
380a a a 390 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a a 420 a >

      433      443      453      463      473
      *      *      *      *      *
GAT GGC CAG ACC CTG CCC CCT GGC AGG ACT AAG AAG CCT ATT GCT GGA
Asp Gly Gln Thr Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys Pro Ile Ala Gly>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
430 a a a44 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 60 a a a470a >

      483      493      503      513
      *      *      *      *
GTG ATC GGC CCT GGC TCC AGC TCT GTG GCC ATT CAA GTC CAG AAT CTT
Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn Leu>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a 480 a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 510 a a 520 >

523      533      543      553      563
*      *      *      *      *
CTC CAG CTG TTC GAC ATC CCA CAG ATC GCC TAT TCT GCC ACA AGC ATA
Leu Gln Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser Ile>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a a530a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a560a a a >

573      583      593      603      613
*      *      *      *      *
GAC CTG AGT GAC AAA ACT TTG TAC AAA TAC TTC CTG AGG GTG GTC CCT
Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu Arg Val Val Pro>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
570 a a 580 a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a a 610 a a >

623      633      643      653      663
*      *      *      *      *
TCT GAC ACT TTG CAG GCA AGG GCG ATG CTC GAC ATA GTC AAG CGT TAC
Ser Asp Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile Val Lys Arg Tyr>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
620a a a 630 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a a 660 a >

673      683      693      703      713
*      *      *      *      *
AAC TGG ACC TAT GTC TCA GCA GTC CAC ACA GAA GGG AAT TAC GGC GAG
Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly Glu>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
670 a a a68 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 00 a a a710a >

723      733      743      753
*      *      *      *
AGT GGA ATG GAT GCT TTC AAA GAA CTG GCT GCC CAG GAA GGC CTC TGC
Ser Gly Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln Glu Gly Leu Cys>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a 720 a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 750 a a 760 >

763      773      783      793      803
*      *      *      *      *
ATC GCA CAC TCG GAC AAA ATC TAC AGC AAT GCT GGC GAG AAG AGC TTT
Ile Ala His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Lys Ser Phe>
b b QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776 b b >
a a770a a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a800a a a >

813      823      833      843      853
*      *      *      *      *
GAC CGG CTC CTG CGT AAA CTC CGG GAG CGG CTT CCC AAG GCC AGG GTT

```

FIG. 2c.

```

Asp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
810 a  a  820 a  -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 a  a  850 a  a  >

      863      873      883      893      903
      *      *      *      *      *
GTG GTC TGC TTC TGC GAG GGC ATG ACA GTG CGG GGC TTA CTG AGT GCC
Val Val Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Ser Ala>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
860a a  a  870 -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 a  a  900 a  a  >

      913      923      933      943      953
      *      *      *      *      *
ATG CGC CGC CTG GGC GTC GTG GGC GAG TTC TCA CTC ATT GGA AGT GAT
Met Arg Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu Ile Gly Ser Asp>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
910 a  a  a92 -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 40 a  a  a950a  >

      963      973      983      993
      *      *      *      *      *
GGA TGG GCA GAC AGA GAT GAA GTC ATC GAA GGC TAT GAG GTG GAA GCC
Gly Trp Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Glu Val Glu Ala>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
a 960 a  a  -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 990 a  a  1000 >

1003      1013      1023      1033      1043
  *      *      *      *      *
AAC GGA GGG ATC ACA ATA AAG CTT CAG TCT CCA GAG GTC AGG TCA TTT
Asn Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu Val Arg Ser Phe>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
a 1010a a  a  -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 1040a a  a  >

1053      1063      1073      1083      1093
  *      *      *      *      *
GAT GAC TAC TTC CTG AAG CTG AGG CTG GAC ACC AAC ACA AGG AAT CCT
Asp Asp Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn Thr Arg Asn Pro>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1050 a  a  1060 a -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 a  a  1090 a  a  >

      1103      1113      1123      1133      1143
      *      *      *      *      *
TGG TTC CCT GAG TTC TGG CAA CAT CGC TTC CAG TGT CGC CTA CCT GGA
Trp Phe Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Pro Gly>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1100a a  a  1110 -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 a  a  a 1140 a  >

      1153      1163      1173      1183      1193
      *      *      *      *      *
CAC CTC TTG GAA AAC CCC AAC TTT AAG AAA GTG TGC ACA GGA AAT GAA
His Leu Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Lys Val Cys Thr Gly Asn Glu>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1150 a  a  116 -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 80 a  a  1190a  >

      1203      1213      1223      1233
      *      *      *      *      *
AGC TTG GAA GAA AAC TAT GTC CAG GAC AGC AAA ATG GGA TTT GTC ATC
Ser Leu Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val Ile>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
a 1200 a  a  -8 A  1775 ))) MCRATMGL-1 1230 a  a  1240 >

1243      1253      1263      1273      1283
  *      *      *      *      *

```

FIG. 2d.

```

AAT GCC ATC TAT GCC ATG GCA CAT GGG CTG CAG AAC ATG CAC CAT GCT
Asn Ala Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn Met His His Ala>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
  a 1250a  a  -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 1280a  a  a  >

1293      1303      1313      1323      1333
*          *          *          *          *
CTG TGT CCC GGC CAT GTG GGC CTG TGT GAT GCT ATG AAA CCC ATT GAT
Leu Cys Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile Asp>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1290 a  a 1300 a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a  a 1330 a  a  >

1343      1353      1363      1373      1383
*          *          *          *          *
GGC AGG AAG CTC CTG GAT TTC CTC ATC AAA TCC TCT TTT GTC GGA GTG
Gly Arg Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser Phe Val Gly Val>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1340a a  a 1350 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a  a  a 1380 a  >

1393      1403      1413      1423      1433
*          *          *          *          *
TCT GGA GAG GAG GTG TGG TTC GAT GAG AAG GGG GAT GCT CCC GGA AGG
Ser Gly Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp Ala Pro Gly Arg>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1390 a  a 140 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 20 a  a 1430a  >

1443      1453      1463      1473
*          *          *          *          *
TAT GAC ATT ATG AAT CTG CAG TAC ACA GAA GCT AAT CGC TAT GAC TAT
Tyr Asp Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
  a 1440 a  a  -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 1470 a  a 1480 >

1483      1493      1503      1513      1523
*          *          *          *          *
GTC CAC GTG GGG ACC TGG CAT GAA GGA GTG CTG AAT ATT GAT GAT TAC
Val His Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn Ile Asp Asp Tyr>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
  a 1490a  a  -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 1520a  a  a  >

1533      1543      1553      1563      1573
*          *          *          *          *
AAA ATC CAG ATG AAC AAA AGC GGA ATG GTA CGA TCT GTG TGC AGT GAG
Lys Ile Gln Met Asn Lys Ser Gly Met Val Arg Ser Val Cys Ser Glu>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1530 a  a 1540 a -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a  a 1570 a  a  >

1583      1593      1603      1613      1623
*          *          *          *          *
CCT TGC TTA AAG GGT CAG ATT AAG GTC ATA CGG AAA GGA GAA GTG AGC
Pro Cys Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val Ser>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1580a a  a 1590 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 a  a  a 1620 a  >

1633      1643      1653      1663      1673
*          *          *          *          *
TGC TGC TGG ATC TGC ACG GCC TGC AAA GAG AAT GAG TTT GTG CAG GAC
Cys Cys Trp Ile Cys Thr Ala Cys Lys Glu Asn Glu Phe Val Gln Asp>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1630 a  a 164 -8 A 1775 DE MCRATMGL-1 60 a  a 1670a  >

1683      1693      1703      1713

```

FIG. 2e.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
GAG TTC ACC TGC AGA GCC TGT GAC CTG GGG TGG TGG CCC AAC GCA GAG
Glu Phe Thr Cys Arg Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp Pro Asn Ala Glu>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
a 1680 a  a  -8 A 1775 DE MCRATHMGL-1 1710 a  a 1720 >

1723      1733      1743      1753      1763
      *      *      *      *      *      *      *
CTC ACA GGC TGT GAG CCC ATT CCT GTC CGT TAT CTT GAG TGG AGT GAC
Leu Thr Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu Glu Trp Ser Asp>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
a 1730a a  -8 A 1775 DE MCRATHMGL-1 1760a a  a  >

1773      1783      1793      1803      1813
      *      *      *      *      *      *      *
ATA GAA GGG ATC GCA CTC ACC CTC TTT GCC GTG CTG GGC ATT TTC CTG
Ile Glu Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Ala Val Leu Gly Ile Phe Leu>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1770 a  >
      1840 c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c  c  >

1823      1833      1843      1853      1863
      *      *      *      *      *      *      *
ACA GCC TTT GTG CTG GGT GTG TTT ATC AAG TTC CGC AAC ACA CCC ATT
Thr Ala Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr Pro Ile>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1880 c  c  1 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 1920c c  >

1873      1883      1893      1903      1913
      *      *      *      *      *      *      *
GTC AAG GCC ACC AAC CGA GAG CTC TCC TAC CTC CTC CTC TTC TCC CTG
Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1930 c  c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c 1970 c  >

1923      1933      1943      1953
      *      *      *      *      *      *      *
CTC TGC TGC TTC TCC AGC TCC CTG TTC TTC ATC GGG GAG CCC CAG GAC
Leu Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
1980c c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c  c 2020 >

1963      1973      1983      1993      2003
      *      *      *      *      *      *      *
TGG ACG TGC CGC CTG CGC CAG CCG GCC TTT GGC ATC AGC TTC GTG CTC
Trp Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe Val Leu>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
c 2030 c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c  c 2070>

2013      2023      2033      2043      2053
      *      *      *      *      *      *      *
TGC ATC TCA TGC ATC CTG GTG AAA ACC AAC CGT GTC CTC CTG GTG TTT
Cys Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu Val Phe>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
c  c 2080 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2110 c  c  >

2063      2073      2083      2093      2103
      *      *      *      *      *      *      *
GAG GCC AAG ATC CCC ACC AGC TTC CAC CGC AAG TGG TGG GGC CTC AAC
Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Phe His Arg Lys Trp Trp Gly Leu Asn>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776  b  b  >
2120 c  c  2 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2160c c  >

```

FIG. 2f

```

      2113      2123      2133      2143      2153
      *      *      *      *      *
CTG CAG TTC CTG CTG GTT TTC CTC TGC ACC TTC ATG CAG ATT GTC ATC
Leu Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Thr Phe Met Gln Ile Val Ile>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
2170 c  c  1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c 2210 c  >

      2163      2173      2183      2193
      *      *      *      *      *
TGT GTG ATC TGG CTC TAC ACC GCG CCC CCC TCA AGC TAC CGC AAC CAG
Cys Val Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg Asn Gln>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
2220c c  c  1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c c 2260 >

2203      2213      2223      2233      2243
      *      *      *      *      *
GAG CTG GAG GAT GAG ATC ATC TTC ATC ACG TGC CAC GAG GGC TCC CTC
Glu Leu Glu Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys His Glu Gly Ser Leu>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
c 2270 c  c  1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c c 2310>

2253      2263      2273      2283      2293
      *      *      *      *      *
ATG GCC CTG GGC TTC CTG ATC GGC TAC ACC TGC CTG CTG GCT GCC ATC
Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala Ala Ile>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
c c 2320 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2350 c c >

2303      2313      2323      2333      2343
      *      *      *      *      *
TGC TTC TTC TTT GCC TTC AAG TCC CGG AAG CTG CCG GAG AAC TTC AAT
Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn Phe Asn>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
2360 c c 2 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2400c c >

2353      2363      2373      2383      2393
      *      *      *      *      *
GAA GCC AAG TTC ATC ACC TTC AGC ATG CTC ATC TTC TTC ATC GTC TGG
Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile Val Trp>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
2410 c c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c 2450 c >

2403      2413      2423      2433
      *      *      *      *      *
ATC TCC TTC ATT CCA GCC TAT GCC AGC ACC TAT GGC AAG TTT GTC TCT
Ile Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Ala Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Val Ser>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
2460c c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c c 2500 >

2443      2453      2463      2473      2483
      *      *      *      *      *
GCC GTA GAG GTG ATT GCC ATC CTG GCA GCC AGC TTT GGC TTG CTG GCG
Ala Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gly Leu Leu Ala>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
c 2510 c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c c 2550>

2493      2503      2513      2523      2533
      *      *      *      *      *
TGC ATC TTC TTC AAC AAG ATC TAC ATC ATT CTC TTC AAG CCA TCC CGC
Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro Ser Arg>
  b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >

```

FIG. 2g.

```

c   c 2560 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2590 c   c   >

2543      2553      2563      2573      2583
*         *         *         *         *
AAC ACC ATC GAG GAG GTG CGT TGC AGC ACC GCA GCT CAC GCT TTC AAG
Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala Phe Lys>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
2600 c   c   2 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2640c   c   >

2593      2603      2613      2623      2633
*         *         *         *         *
GTG GCT GCC CGG GCC ACG CTG CGC CGC AGC AAC GTC TCC CGC AAG CGG
Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg Lys Arg>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
2650 c   c   1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2690 c   c   >

2643      2653      2663      2673
*         *         *         *         *
TCC AGC AGC CTT GGA GGC TCC ACG GGA TCC ACC CCC TCC TCC TCC ATC
Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ile>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
2700c   c   1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2740 c   c   >

2683      2693      2703      2713      2723
*         *         *         *         *
AGC AGC AAG AGC AAC AGC GAA GAC CCA TTC CCA CAG CCC GAG AGG CAG
Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu Arg Gln>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
c   2750 c   1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c   c   2790>

2733      2743      2753      2763      2773
*         *         *         *         *
AAG CAG CAG CAG CCG CTG GCC CTA ACC CAG CAA GAG CAG CAG CAG CAG
Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
c   c   2800 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2830 c   c   >

2783      2793      2803      2813      2823
*         *         *         *         *
CCC CTG ACC CTC CCA CAG CAG CAA CGA TCT CAG CAG CAG CCC AGA TGC
Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro Arg Cys>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
2840 c   c   2 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2880c   c   >

2833      2843      2853      2863      2873
*         *         *         *         *
AAG CAG AAG GTC ATC TTT GGC AGC GGC ACG GTC ACC TTC TCA CTG AGC
Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser Leu Ser>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
2890 c   c   1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2930 c   c   >

2883      2893      2903      2913
*         *         *         *         *
TTT GAT GAG CCT CAG AAG AAC GCC ATG GCC CAC GGG AAT TCT ACG CAC
Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Gly Asn Ser Thr His>
b   b   QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776   b   b   >
2940c   c   1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 2980 c   c   >

2923      2933      2943      2953      2963
*         *         *         *         *
CAG AAC TCC CTG GAG GCC CAG AAA AGC AGC GAT ACG CTG ACC CGA CAC
Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr Arg His>

```

FIG. 2h.

```

b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
c 2990 c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c  c 3030>

2973      2983      2993      3003      3013
*          *          *          *          *
CAG CCA TTA CTC CCG CTG CAG TGC GGG GAA ACG GAC TTA GAT CTG ACC
Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu Asp Leu Thr>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
c  c 3040 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 3070 c  c  >

3023      3033      3043      3053      3063
*          *          *          *          *
GTC CAG GAA ACA GGT CTG CAA GGA CCT GTG GGT GGA GAC CAG CGG CCA
Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly Asp Gln Arg Pro>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
3080 c  c 3 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 3120c c  >

3073      3083      3093      3103      3113
*          *          *          *          *
GAG GTG GAG GAC CCT GAA GAG TTG TCC CCA GCA CTT GTA GTG TCC AGT
Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala Leu Val Val Ser Ser>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
3130 c  c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c 3170 c  >

3123      3133      3143      3153
*          *          *          *          *
TCA CAG AGC TTT GTC ATC AGT GGT GGA GGC AGC ACT GTT ACA GAA AAC
Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Val Thr Glu Asn>
b  b  QUIMERA DE SECUENCIA CODIFICANTE: UNIÓN NUC. 1776      b  b  >
3180c c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c  c 3220 >

3163      3173      3183      3193      3203      3213
*          *          *          *          *          *
GTA GTG AAT TCA T AAAATGGA AGGAGAAGAC TGGGCTAGGG AGAATGCAGA
Val Val Asn Ser Xxx>
SECUENCIA CODIFICANTE b >
c 3230 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c 3270 >

3223      3233      3243      3253      3263      3273
*          *          *          *          *          *
GAGGTTTCCTT GGGGTCCCAG GGATGAGGAA TCGCCCCAGA CTCCTTTCCT CTGAGGAAGA
3280 c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c 3330 >

3283      3293      3303      3313      3323      3333
*          *          *          *          *          *
AGGGATAATA GACACATCAA ATGCCCCGAA TTTAGTCACA CCATCTTAA TGACAGTGAA
3340 c 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL 0 c 3390 >

3343      3353      3363      3373
*          *          *          *          *          *
TTGACCCATG TTCCCTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAGCGG CCGC--
34 1837 A 3437 DE MCPHUPCAR4.0 FINAL c  >

```

FIG. 3a.

Intervalo de secuencia: -40 a 3960

```

      -31      -21      -11      -1      10
      *      *      *      *      *
CTAGCTGTCT CATCCCTTGC CCTGGAGAGA CGGCAGAACC ATG GCA TTT TAT AGC
                               Met Ala Phe Tyr Ser>
                               TRADUCCIÓN >

      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *
TGC TGC TGG GTC CTC TTG GCA CTC ACC TGG CAC ACC TCT GCC TAC GGG
Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His Thr Ser Ala Tyr Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      70      80      90      100      110
      *      *      *      *      *
CCA GAC CAG CGA GCC CAA AAG AAG GGG GAC ATT ATC CTT GGG GGG CTC
Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Gly Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      120      130      140      150
      *      *      *      *
TTT CCT ATT CAT TTT GGA GTA GCA GCT AAA GAT CAA GAT CTC AAA TCA
Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp Gln Asp Leu Lys Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

160      170      180      190      200
      *      *      *      *      *
AGG CCG GAG TCT GTG GAA TGT ATC AGG TAT AAT TTC CGT GGG TTT CGC
Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

210      220      230      240      250
      *      *      *      *      *
TGG TTA CAG GCT ATG ATA TTT GCC ATA GAG GAG ATA AAC AGC AGC CCA
Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu Ile Asn Ser Ser Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *
GCC CTT CTT CCC AAC TTG ACG CTG GGA TAC AGG ATA TTT GAC ACT TGC
Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Thr Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *
AAC ACC GTT TCT AAG GCC TTG GAA GCC ACC CTG AGT TTT GTT GCT CAA
Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

360      370      380      390
      *      *      *      *
AAC AAA ATT GAT TCT TTG AAC CTT GAT GAG TTC TGC AAC TGC TCA GAG
Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe Cys Asn Cys Ser Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

400      410      420      430      440
      *      *      *      *      *
CAC ATT CCC TCT ACG ATT GCT GTG GTG GGA GCA ACT GGC TCA GGC GTC
His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala Thr Gly Ser Gly Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

```

FIG. 3b.

```

450          460          470          480          490
*           *           *           *           *
TCC ACG GCA GTG GCA AAT CTG CTG GGG CTC TTC TAC ATT CCC CAG GTC
Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe Tyr Ile Pro Gln Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

500          510          520          530          540
*           *           *           *           *
AGT TAT GCC TCC TCC AGC AGA CTC CTC AGC AAC AAG AAT CAA TTC AAG
Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn Lys Asn Gln Phe Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

550          560          570          580          590
*           *           *           *           *
TCT TTC CTC CGA ACC ATC CCC AAT GAT GAG CAC CAG GCC ACT GCC ATG
Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His Gln Ala Thr Ala Met>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

600          610          620          630
*           *           *           *           *
GCA GAC ATC ATC GAG TAT TTC CGC TGG AAC TGG GTG GGC ACA ATT GCA
Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp Val Gly Thr Ile Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

640          650          660          670          680
*           *           *           *           *
GCT GAT GAC GAC TAT GGG CGG CCG GGG ATT GAG AAA TTC CGA GAG GAA
Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu Lys Phe Arg Glu Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

690          700          710          720          730
*           *           *           *           *
GCT GAG GAA AGG GAT ATC TGC ATC GAC TTC AGT GAA CTC ATC TCC CAG
Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser Glu Leu Ile Ser Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

740          750          760          770          780
*           *           *           *           *
TAC TCT GAT GAG GAA GAG ATC CAG CAT GTG GTA GAG GTG ATT CAA AAT
Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val Glu Val Ile Gln Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

790          800          810          820          830
*           *           *           *           *
TCC ACG GCC AAA GTC ATC GTG GTT TTC TCC AGT GGC CCA GAT CTT GAG
Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser Gly Pro Asp Leu Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

840          850          860          870
*           *           *           *           *
CCC CTC ATC AAG GAG ATT GTC CGG CGC AAT ATC ACG GGC AAG ATC TGG
Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile Thr Gly Lys Ile Trp>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

880          890          900          910          920
*           *           *           *           *
CTG GCC AGC GAG GCC TGG GCC AGC TCC TCC CTG ATC GCC ATG CCT CAG
Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu Ile Ala Met Pro Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

930          940          950          960          970
*           *           *           *           *

```

FIG. 3c.

```

TAC TTC CAC GTG GTT GGC GGC ACC ATT GGA TTC GCT CTG AAG GCT GGG
Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe Ala Leu Lys Ala Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

980          990          1000          1010          1020
*           *           *           *           *
CAG ATC CCA GGC TTC CGG GAA TTC CTG AAG AAG GTC CAT CCC AGG AAG
Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys Val His Pro Arg Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1030          1040          1050          1060          1070
*           *           *           *           *
TCT GTC CAC AAT GGT TTT GCC AAG GAG TTT TGG GAA GAA ACA TTT AAC
Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp Glu Glu Thr Phe Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1080          1090          1100          1110
*           *           *           *
TGC CAC CTC CAA GAA GGT GCA AAA GGA CCT TTA CCT GTG GAC ACC TTT
Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu Pro Val Asp Thr Phe>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1120          1130          1140          1150          1160
*           *           *           *           *
CTG AGA GGT CAC GAA GAA AGT GGC GAC AGG TTT AGC AAC AGC TCG ACA
Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe Ser Asn Ser Ser Thr>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1170          1180          1190          1200          1210
*           *           *           *           *
GCC TTC CGA CCC CTC TGT ACA GGG GAT GAG AAC ATC AGC AGT GTC GAG
Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn Ile Ser Ser Val Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1220          1230          1240          1250          1260
*           *           *           *           *
ACC CCT TAC ATA GAT TAC ACG CAT TTA CGG ATA TCC TAC AAT GTG TAC
Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile Ser Tyr Asn Val Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1270          1280          1290          1300          1310
*           *           *           *           *
TTA GCA GTC TAC TCC ATT GCC CAC GCC TTG CAA GAT ATA TAT ACC TGC
Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln Asp Ile Tyr Thr Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1320          1330          1340          1350
*           *           *           *
TTA CCT GGG AGA GGG CTC TTC ACC AAT GGC TCC TGT GCA GAC ATC AAG
Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser Cys Ala Asp Ile Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1360          1370          1380          1390          1400
*           *           *           *           *
AAA GTT GAG GCG TGG CAG GTC CTG AAG CAC CTA CGG CAT CTA AAC TTT
Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu Arg His Leu Asn Phe>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1410          1420          1430          1440          1450
*           *           *           *           *
ACA AAC AAT ATG GGG GAG CAG GTG ACC TTT GAT GAG TGT GGT GAC CTG
Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp Glu Cys Gly Asp Leu>

```

FIG. 3d.

```

a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1460      1470      1480      1490      1500
*          *          *          *          *
GTG GGG AAC TAT TCC ATC ATC AAC TGG CAC CTC TCC CCA GAG GAT GGC
Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu Ser Pro Glu Asp Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1510      1520      1530      1540      1550
*          *          *          *          *
TCC ATC GTG TTT AAG GAA GTC GGG TAT TAC AAC GTC TAT GCC AAG AAG
Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn Val Tyr Ala Lys Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1560      1570      1580      1590
*          *          *          *          *
GGA GAA AGA CTC TTC ATC AAC GAG GAG AAA ATC CTG TGG AGT GGG TTC
Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile Leu Trp Ser Gly Phe>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1600      1610      1620      1630      1640
*          *          *          *          *
TCC AGG GAG GTG CCC TTC TCC AAC TGC AGC CGA GAC TGC CTG GCA GGG
Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg Asp Cys Leu Ala Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1650      1660      1670      1680      1690
*          *          *          *          *
ACC AGG AAA GGG ATC ATT GAG GGG GAG CCC ACC TGC TGC TTT GAG TGT
Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr Cys Cys Phe Glu Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1700      1710      1720      1730      1740
*          *          *          *          *
GTG GAG TGT CCT GAT GGG GAG TAT AGT GAT GAG ACA GAT GCC AGT GCC
Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu Thr Asp Ala Ser Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1750      1760      1770      1780      1790
*          *          *          *          *
TGT AAC AAG TGC CCA GAT GAC TTC TGG TCC AAT GAG AAC CAC ACC TCC
Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn Glu Asn His Thr Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1800      1810      1820      1830
*          *          *          *          *
TGC GAG CCC ATT CCT GTC CGT TAT CTT GAG TGG AGT GAC ATA GAA TCT
Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu Glu Trp Ser Asp Ile Glu Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1840      1850      1860      1870      1880
*          *          *          *          *
ATC ATA GCC ATC GCC TTT TCT TGC CTG GGC ATC CTC GTG ACG CTG TTT
Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser Cys Leu Gly Ile Leu Val Thr Leu Phe>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

1890      1900      1910      1920      1930
*          *          *          *          *
GTC ACC CTC ATC TTC GTT CTG TAC CGG GAC ACA CCC GTG GTC AAA TCC
Val Thr Leu Ile Phe Val Leu Tyr Arg Asp Thr Pro Val Val Lys Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

```

FIG. 3e.

```

1940      1950      1960      1970      1980
*          *          *          *          *
TCC AGT AGG GAG CTC TGC TAT ATC ATT CTG GCT GGT ATT TTC CTC GGC
Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala Gly Ile Phe Leu Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      1990      2000      2010      2020      2030
*          *          *          *          *
TAT GTG TGC CCT TTC ACC CTC ATC GCC AAA CCT ACT ACC ACA TCC TGC
Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu Ile Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ser Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      2040      2050      2060      2070
*          *          *          *          *
TAC CTC CAG CGC CTC CTA GTT GGC CTC TCT TCT GCC ATG TGC TAC TCT
Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu Ser Ser Ala Met Cys Tyr Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

2080      2090      2100      2110      2120
*          *          *          *          *
GCT TTA GTG ACC AAA ACC AAT CGT ATT GCA CGC ATC CTG GCT GGC AGC
Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg Ile Leu Ala Gly Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

2130      2140      2150      2160      2170
*          *          *          *          *
AAG AAG AAG ATC TGC ACC CGG AAG CCC AGA TTC ATG AGC GCT TGG GCC
Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg Lys Pro Arg Phe Met Ser Ala Trp Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      2180      2190      2200      2210      2220
*          *          *          *          *
CAA GTG ATC ATA GCC TCC ATT CTG ATT AGT GTA CAG CTA ACA CTA GTG
Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ile Ser Val Gln Leu Thr Leu Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      2230      2240      2250      2260      2270
*          *          *          *          *
GTG ACC TTG ATC ATC ATG GAG CCT CCC ATG CCC ATT TTG TCC TAC CCG
Val Thr Leu Ile Ile Met Glu Pro Pro Met Pro Ile Leu Ser Tyr Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      2280      2290      2300      2310
*          *          *          *          *
AGT ATC AAG GAA GTC TAC CTT ATC TGC AAT ACC AGC AAC CTG GGT GTA
Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr Ser Asn Leu Gly Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

2320      2330      2340      2350      2360
*          *          *          *          *
GTG GCC CCT GTG GGT TAC AAT GGA CTC CTC ATC ATG AGC TGT ACC TAC
Val Ala Pro Val Gly Tyr Asn Gly Leu Leu Ile Met Ser Cys Thr Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

2370      2380      2390      2400      2410
*          *          *          *          *
TAT GCC TTC AAG ACC CGC AAC GTG CCG GCC AAC TTC AAT GAG GCT AAA
Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn Phe Asn Glu Ala Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

      2420      2430      2440      2450      2460
*          *          *          *          *

```

FIG. 3f

```

TAC ATC GCC TTC ACC ATG TAC ACT ACC TGC ATC ATC TGG CTG GCT TTC
Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

      2470      2480      2490      2500      2510
      *      *      *      *      *
GTT CCC ATT TAC TTT GGG AGC AAC TAC AAG ATC ATC ACT ACC TGC TTC
Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile Ile Thr Thr Cys Phe>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

      2520      2530      2540      2550
      *      *      *      *
GCG GTG AGC CTC AGT GTG ACG GTG GCC CTG GGG TGC ATG TTT ACT CCG
Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val Ala Leu Gly Cys Met Phe Thr Pro>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

2560      2570      2580      2590      2600
      *      *      *      *      *
AAG ATG TAC ATC ATC ATT GCC AAA CCT GAG AGG AAC GTC CGC AGT GCC
Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala Lys Pro Glu Arg Asn Val Arg Ser Ala>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

2610      2620      2630      2640      2650
      *      *      *      *      *
TTC ACG ACC TCT GAT GTT GTC CGC ATG CAC GTC GGT GAT GGC AAA CTG
Phe Thr Thr Ser Asp Val Val Arg Met His Val Gly Asp Gly Lys Leu>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

      2660      2670      2680      2690      2700
      *      *      *      *      *
CCG TGC CGC TCC AAC ACC TTC CTC AAC ATT TTC CGG AGA AAG AAG CCC
Pro Cys Arg Ser Asn Thr Phe Leu Asn Ile Phe Arg Arg Lys Lys Pro>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

      2710      2720      2730      2740      2750
      *      *      *      *      *
GGG GCA GGG AAT GCC AAT TCT AAC GGC AAG TCT GTG TCA TGG TCT GAA
Gly Ala Gly Asn Ala Asn Ser Asn Gly Lys Ser Val Ser Trp Ser Glu>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

      2760      2770      2780      2790
      *      *      *      *
CCA GGT GGA AGA CAG GCG CCC AAG GGA CAG CAC GTG TGG CAG CGC CTC
Pro Gly Gly Arg Gln Ala Pro Lys Gly Gln His Val Trp Gln Arg Leu>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

2800      2810      2820      2830      2840
      *      *      *      *      *
TCT GTG CAC GTG AAG ACC AAC GAG ACG GCC TGT AAC CAA ACA GCC GTA
Ser Val His Val Lys Thr Asn Glu Thr Ala Cys Asn Gln Thr Ala Val>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

2850      2860      2870      2880      2890
      *      *      *      *      *
ATC AAA CCC CTC ACT AAA AGT TAC CAA GGC TCT GGC AAG AGC CTG ACC
Ile Lys Pro Leu Thr Lys Ser Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Ser Leu Thr>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A]  a  a  a  a  >

      2900      2910      2920      2930      2940
      *      *      *      *      *
TTT TCA GAT GCC AGC ACC AAG ACC CTT TAC AAT GTG GAA GAA GAG GAC
Phe Ser Asp Ala Ser Thr Lys Thr Leu Tyr Asn Val Glu Glu Glu Asp>

```

FIG. 3g.

```

a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

2950      2960      2970      2980      2990
* * * * *
AAT ACC CCT TCT GCT CAC TTC AGC CCT CCC AGC AGC CCT TCT ATG GTG
Asn Thr Pro Ser Ala His Phe Ser Pro Pro Ser Ser Pro Ser Met Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3000      3010      3020      3030
* * * * *
GTG CAC CGA CGC GGG CCA CCC GTG GCC ACC ACA CCA CCT CTG CCA GCC
Val His Arg Arg Gly Pro Pro Val Ala Thr Thr Pro Pro Leu Pro Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3040      3050      3060      3070      3080
* * * * *
CAT CTG ACC GCA GAA GAG ACC CCC CTG TTC CTG GCT GAT TCC GTC ATC
His Leu Thr Ala Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala Asp Ser Val Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3090      3100      3110      3120      3130
* * * * *
CCC AAG GGC TTG CCT CCT CCT CTC CCG CAG CAG CAG CCA CAG CAG CCG
Pro Lys Gly Leu Pro Pro Pro Leu Pro Gln Gln Gln Pro Gln Gln Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3140      3150      3160      3170      3180
* * * * *
CCC CCT CAG CAG CCC CCG CAG CAG CCC AAG TCC CTG ATG GAC CAG CTG
Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Lys Ser Leu Met Asp Gln Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3190      3200      3210      3220      3230
* * * * *
CAA GGC GTA GTC ACC AAC TTC GGT TCG GGG ATT CCA GAT TTC CAT GCG
Gln Gly Val Val Thr Asn Phe Gly Ser Gly Ile Pro Asp Phe His Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3240      3250      3260      3270
* * * * *
GTG CTG GCA GGC CCG GGG ACA CCA GGA AAC AGC CTG CGC TCT CTG TAC
Val Leu Ala Gly Pro Gly Thr Pro Gly Asn Ser Leu Arg Ser Leu Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3280      3290      3300      3310      3320
* * * * *
CCG CCC CCG CCT CCG CCG CAA CAC CTG CAG ATG CTG CCC CTG CAC CTG
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln His Leu Gln Met Leu Pro Leu His Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3330      3340      3350      3360      3370
* * * * *
AGC ACC TTC CAG GAG GAG TCC ATC TCC CCT CCT GGG GAG GAC ATC GAT
Ser Thr Phe Gln Glu Glu Ser Ile Ser Pro Pro Gly Glu Asp Ile Asp>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

3380      3390      3400      3410      3420
* * * * *
GAT GAC AGT GAG AGA TTC AAG CTC CTG CAG GAG TTC GTG TAC GAG CGC
Asp Asp Ser Glu Arg Phe Lys Leu Leu Gln Glu Phe Val Tyr Glu Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE CAR/R1 [A] a a a a >

```


FIG. 4a.

Intervalo de secuencia: -24 a 3195

```

      -15      -5      6      16      26
      *      *      *      *      *
GCGGTGGACC GCGTCTTCGC CACA ATG GTC CGG CTC CTC TTG ATT TTC TTC CCA
      Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro>
      a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a >

      36      46      56      66      76
      *      *      *      *      *
ATG ATC TTT TTG GAG ATG TCC ATT TTG CCC AGG ATG CCT GAC AGA AAA
Met Ile Phe Leu Glu Met Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      86      96      106      116      126
      *      *      *      *      *
GTA TTG CTG GCA GGT GCC TCG TCC CAG CGC TCC GTG GCG AGA ATG GAC
Val Leu Leu Ala Gly Ala Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      136      146      156      166
      *      *      *      *      *
GGA GAT GTC ATC ATC GGA GCC CTC TTC TCA GTC CAT CAC CAG CCT CCA
Gly Asp Val Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

176      186      196      206      216
      *      *      *      *      *
GCC GAG AAG GTA CCC GAA AGG AAG TGT GGG GAG ATC AGG GAA CAG TAT
Ala Glu Lys Val Pro Glu Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      226      236      246      256      266
      *      *      *      *      *
GGT ATC CAG AGG GTG GAG GCC ATG TTC CAC ACG TTG GAT AAG ATT AAC
Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      276      286      296      306      316
      *      *      *      *      *
GCG GAC CCG GTG CTC CTG CCC AAC ATC ACT CTG GGC AGT GAG ATC CCG
Ala Asp Pro Val Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      326      336      346      356      366
      *      *      *      *      *
GAC TCC TGC TGG CAC TCT TCA GTG GCT CTC GAA CAG AGC ATC GAA TTC
Asp Ser Cys Trp His Ser Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      376      386      396      406
      *      *      *      *      *
ATC AGA GAC TCC CTG ATT TCC ATC CGA GAT GAG AAG GAT GGG CTG AAC
Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Leu Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

416      426      436      446      456
      *      *      *      *      *
CGA TGC CTG CCT GAT GGC CAG ACC CTG CCC CCT GGC AGG ACT AAG AAG
Arg Cys Leu Pro Asp Gly Gln Thr Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

```

FIG. 4b

```

466      476      486      496      506
*      *      *      *      *
CCT ATT GCT GGA GTG ATC GGC CCT GGC TCC AGC TCT GTG GCC ATT CAA
Pro Ile Ala Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

516      526      536      546      556
*      *      *      *      *
GTC CAG AAT CTT CTC CAG CTG TTC GAC ATC CCA CAG ATC GCC TAT TCT
Val Gln Asn Leu Leu Gln Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

566      576      586      596      606
*      *      *      *      *
GCC ACA AGC ATA GAC CTG AGT GAC AAA ACT TTG TAC AAA TAC TTC CTG
Ala Thr Ser Ile Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

616      626      636      646
*      *      *      *
AGG GTG GTC CCT TCT GAC ACT TTG CAG GCA AGG GCG ATG CTC GAC ATA
Arg Val Val Pro Ser Asp Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

656      666      676      686      696
*      *      *      *      *
GTC AAG CGT TAC AAC TGG ACC TAT GTC TCA GCA GTC CAC ACA GAA GGG
Val Lys Arg Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

706      716      726      736      746
*      *      *      *      *
AAT TAC GGC GAG AGT GGA ATG GAT GCT TTC AAA GAA CTG GCT GCC CAG
Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

756      766      776      786      796
*      *      *      *      *
GAA GGC CTC TGC ATC GCA CAC TCG GAC AAA ATC TAC AGC AAT GCT GGC
Glu Gly Leu Cys Ile Ala His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

806      816      826      836      846
*      *      *      *      *
GAG AAG AGC TTT GAC CGG CTC CTG CGT AAA CTC CGG GAG CGG CTT CCC
Glu Lys Ser Phe Asp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

856      866      876      886
*      *      *      *
AAG GCC AGG GTT GTG GTC TGC TTC TGC GAG GGC ATG ACA GTG CGG GGC
Lys Ala Arg Val Val Val Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

896      906      916      926      936
*      *      *      *      *
TTA CTG AGT GCC ATG CGC CGC CTG GGC GTC GTG GGC GAG TTC TCA CTC
Leu Leu Ser Ala Met Arg Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

946      956      966      976      986
*      *      *      *      *

```

FIG. 4c.

```

ATT GGA AGT GAT GGA TGG GCA GAC AGA GAT GAA GTC ATC GAA GGC TAT
Ile Gly Ser Asp Gly Trp Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

996      1006      1016      1026      1036
*      *      *      *      *
GAG GTG GAA GCC AAC GGA GGG ATC ACA ATA AAG CTT CAG TCT CCA GAG
Glu Val Glu Ala Asn Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1046      1056      1066      1076      1086
*      *      *      *      *
GTC AGG TCA TTT GAT GAC TAC TTC CTG AAG CTG AGG CTG GAC ACC AAC
Val Arg Ser Phe Asp Asp Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1096      1106      1116      1126
*      *      *      *
ACA AGG AAT CCT TGG TTC CCT GAG TTC TGG CAA CAT CGC TTC CAG TGT
Thr Arg Asn Pro Trp Phe Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1136      1146      1156      1166      1176
*      *      *      *      *
CGC CTA CCT GGA CAC CTC TTG GAA AAC CCC AAC TTT AAG AAA GTG TGC
Arg Leu Pro Gly His Leu Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Lys Val Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1186      1196      1206      1216      1226
*      *      *      *      *
ACA GGA AAT GAA AGC TTG GAA GAA AAC TAT GTC CAG GAC AGC AAA ATG
Thr Gly Asn Glu Ser Leu Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1236      1246      1256      1266      1276
*      *      *      *      *
GGA TTT GTC ATC AAT GCC ATC TAT GCC ATG GCA CAT GGG CTG CAG AAC
Gly Phe Val Ile Asn Ala Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1286      1296      1306      1316      1326
*      *      *      *      *
ATG CAC CAT GCT CTG TGT CCC GGC CAT GTG GGC CTG TGT GAT GCT ATG
Met His His Ala Leu Cys Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1336      1346      1356      1366
*      *      *      *
AAA CCC ATT GAT GGC AGG AAG CTC CTG GAT TTC CTC ATC AAA TCC TCT
Lys Pro Ile Asp Gly Arg Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1376      1386      1396      1406      1416
*      *      *      *      *
TTT GTC GGA GTG TCT GGA GAG GAG GTG TGG TTC GAT GAG AAG GGG GAT
Phe Val Gly Val Ser Gly Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1426      1436      1446      1456      1466
*      *      *      *      *
GCT CCC GGA AGG TAT GAC ATT ATG AAT CTG CAG TAC ACA GAA GCT AAT
Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn>

```

FIG. 4d.

```

a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1476      1486      1496      1506      1516
*          *          *          *          *
CGC TAT GAC TAT GTC CAC GTG GGG ACC TGG CAT GAA GGA GTG CTG AAT
Arg Tyr Asp Tyr Val His Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1526      1536      1546      1556      1566
*          *          *          *          *
ATT GAT GAT TAC AAA ATC CAG ATG AAC AAA AGC GGA ATG GTA CGA TCT
Ile Asp Asp Tyr Lys Ile Gln Met Asn Lys Ser Gly Met Val Arg Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1576      1586      1596      1606
*          *          *          *          *
GTG TGC AGT GAG CCT TGC TTA AAG GGT CAG ATT AAG GTC ATA CGG AAA
Val Cys Ser Glu Pro Cys Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1616      1626      1636      1646      1656
*          *          *          *          *
GGA GAA GTG AGC TGC TGC TGG ATC TGC ACG GCC TGC AAA GAG AAT GAG
Gly Glu Val Ser Cys Cys Trp Ile Cys Thr Ala Cys Lys Glu Asn Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1666      1676      1686      1696      1706
*          *          *          *          *
TTT GTG CAG GAC GAG TTC ACC TGC AGA GCC TGT GAC CTG GGG TGG TGG
Phe Val Gln Asp Glu Phe Thr Cys Arg Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1716      1726      1736      1746      1756
*          *          *          *          *
CCC AAC GCA GAG CTC ACA GGC TGT GAG CCC ATT CCT GTC CGT TAT CTT
Pro Asn Ala Glu Leu Thr Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1766      1776      1786      1796      1806
*          *          *          *          *
GAG TGG AGT GAC ATA GAA TCT ATC ATA GCC ATC GCC TTT TCT TGC CTG
Glu Trp Ser Asp Ile Glu Ser Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser Cys Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1816      1826      1836      1846
*          *          *          *          *
GGC ATC CTC GTG ACG CTG TTT GTC ACC CTC ATC TTC GTT CTG TAC CGG
Gly Ile Leu Val Thr Leu Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu Tyr Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1856      1866      1876      1886      1896
*          *          *          *          *
GAC ACA CCC GTG GTC AAA TCC TCC AGT AGG GAG CTC TGC TAT ATC ATT
Asp Thr Pro Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

1906      1916      1926      1936      1946
*          *          *          *          *
CTG GCT GGT ATT TTC CTC GGC TAT GTG TGC CCT TTC ACC CTC ATC GCC
Leu Ala Gly Ile Phe Leu Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu Ile Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

```

FIG. 4e.

```

      1956      1966      1976      1986      1996
      *      *      *      *      *
AAA CCT ACT ACC ACA TCC TGC TAC CTC CAG CGC CTC CTA GTT GGC CTC
Lys Pro Thr Thr Thr Ser Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2006      2016      2026      2036      2046
      *      *      *      *      *
TCT TCT GCC ATG TGC TAC TCT GCT TTA GTG ACC AAA ACC AAT CGT ATT
Ser Ser Ala Met Cys Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2056      2066      2076      2086
      *      *      *      *
GCA CGC ATC CTG GCT GGC AGC AAG AAG AAG ATC TGC ACC CGG AAG CCC
Ala Arg Ile Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg Lys Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

2096      2106      2116      2126      2136
      *      *      *      *      *
AGA TTC ATG AGC GCT TGG GCC CAA GTG ATC ATA GCC TCC ATT CTG ATT
Arg Phe Met Ser Ala Trp Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2146      2156      2166      2176      2186
      *      *      *      *      *
AGT GTA CAG CTA ACA CTA GTG GTG ACC TTG ATC ATC ATG GAG CCT CCC
Ser Val Gln Leu Thr Leu Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu Pro Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2196      2206      2216      2226      2236
      *      *      *      *      *
ATG CCC ATT TTG TCC TAC CCG AGT ATC AAG GAA GTC TAC CTT ATC TGC
Met Pro Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu Ile Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2246      2256      2266      2276      2286
      *      *      *      *      *
AAT ACC AGC AAC CTG GGT GTG GTG GCC CCT TTG GGC TAC AAT GGA CTC
Asn Thr Ser Asn Leu Gly Val Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asn Gly Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2296      2306      2316      2326
      *      *      *      *
CTC ATC ATG AGC TGT ACC TAC TAT GCC TTC AAG ACC CGC AAC GTG CCC
Leu Ile Met Ser Cys Thr Tyr Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

2336      2346      2356      2366      2376
      *      *      *      *      *
GCC AAC TTC AAC GAG GCC AAA TAT ATC GCG TTC ACC ATG TAC ACC ACC
Ala Asn Phe Asn Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2386      2396      2406      2416      2426
      *      *      *      *      *
TGT ATC ATC TGG CTA GCT TTT GTG CCC ATT TAC TTT GGG AGC AAC TAC
Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

      2436      2446      2456      2466      2476
      *      *      *      *      *

```

FIG. 4f

```

AAG ATC ATC ACA ACT TGC TTT GCA GTG AGT CTC AGT GTA ACA GTG GCT
Lys Ile Ile Thr Thr Cys Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val Ala>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2486      2496      2506      2516      2526
      *      *      *      *      *
CTG GGG TGC ATG TTC ACT CCC AAG ATG TAC ATC ATT ATT GCC AAG CCT
Leu Gly Cys Met Phe Thr Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala Lys Pro>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2536      2546      2556      2566
      *      *      *      *
GAG AGG AAT ACC ATC GAG GAG GTG CGT TGC AGC ACC GCA GCT CAC GCT
Glu Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

2576      2586      2596      2606      2616
*      *      *      *      *
TTC AAG GTG GCT GCC CGG GCC ACG CTG CGC CGC AGC AAC GTC TCC CGC
Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2626      2636      2646      2656      2666
      *      *      *      *      *
AAG CGG TCC AGC AGC CTT GGA GGC TCC ACG GGA TCC ACC CCC TCC TCC
Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2676      2686      2696      2706      2716
      *      *      *      *      *
TCC ATC AGC AGC AAG AGC AAC AGC GAA GAC CCA TTC CCA CAG CCC GAG
Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2726      2736      2746      2756      2766
      *      *      *      *      *
AGG CAG AAG CAG CAG CAG CCG CTG GCC CTA ACC CAG CAA GAG CAG CAG
Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2776      2786      2796      2806
      *      *      *      *
CAG CAG CCC CTG ACC CTC CCA CAG CAG CAA CGA TCT CAG CAG CAG CCC
Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

2816      2826      2836      2846      2856
*      *      *      *      *
AGA TGC AAG CAG AAG GTC ATC TTT GGC AGC GGC ACG GTC ACC TTC TCA
Arg Cys Lys Lys Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2866      2876      2886      2896      2906
      *      *      *      *      *
CTG AGC TTT GAT GAG CCT CAG AAG AAC GCC ATG GCC CAC GGG AAT TCT
Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Gly Asn Ser>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A]  a  a  a  a  >

      2916      2926      2936      2946      2956
      *      *      *      *      *
ACG CAC CAG AAC TCC CTG GAG GCC CAG AAA AGC AGC GAT ACG CTG ACC
Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr>

```

FIG. 4g.

```

a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

    2966      2976      2986      2996      3006
    *      *      *      *      *      *      *
CGA CAC CAG CCA TTA CTC CCG CTG CAG TGC GGG GAA ACG GAC TTA GAT
Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu Asp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

    3016      3026      3036      3046
    *      *      *      *      *      *      *
CTG ACC GTC CAG GAA ACA GGT CTG CAA GGA CCT GTG GGT GGA GAC CAG
Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly Asp Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

3056      3066      3076      3086      3096
    *      *      *      *      *      *      *
CGG CCA GAG GTG GAG GAC CCT GAA GAG TTG TCC CCA GCA CTT GTA GTG
Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala Leu Val Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

    3106      3116      3126      3136      3146
    *      *      *      *      *      *      *
TCC AGT TCA CAG AGC TTT GTC ATC AGT GGT GGA GGC AGC ACT GTT ACA
Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Val Thr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PRATCH3 [A] a a a a >

    3156      3166      3176      3186
    *      *      *      *      *      *      *
GAA AAC GTA GTG AAT TCA TAAAATGG AAGGAGAAGA CTGGGCTAG
Glu Asn Val Val Asn Ser>
TRADUCCIÓN DE P >

```

FIG. 5a

Intervalo de secuencia: -24 a 3195

```

      -15      -5      6      16      26
      *      *      *      *      *
GCGGTGGACC GCGTCTTCGC CACA ATG GTC CGG CTC CTC TTG ATT TTC TTC CCA
                        Met Val Arg Leu Leu Leu Ile Phe Phe Pro>
                        a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a >

      36      46      56      66      76
      *      *      *      *      *
ATG ATC TTT TTG GAG ATG TCC ATT TTG CCC AGG ATG CCT GAC AGA AAA
Met Ile Phe Leu Glu Met Ser Ile Leu Pro Arg Met Pro Asp Arg Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      86      96      106      116      126
      *      *      *      *      *
GTA TTG CTG GCA GGT GCC TCG TCC CAG CGC TCC GTG GCG AGA ATG GAC
Val Leu Leu Ala Gly Ala Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      136      146      156      166
      *      *      *      *
GGA GAT GTC ATC ATC GGA GCC CTC TTC TCA GTC CAT CAC CAG CCT CCA
Gly Asp Val Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

176      186      196      206      216
      *      *      *      *      *
GCC GAG AAG GTA CCC GAA AGG AAG TGT GGG GAG ATC AGG GAA CAG TAT
Ala Glu Lys Val Pro Glu Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      226      236      246      256      266
      *      *      *      *      *
GGT ATC CAG AGG GTG GAG GCC ATG TTC CAC ACG TTG GAT AAG ATT AAC
Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      276      286      296      306      316
      *      *      *      *      *
GCG GAC CCG GTG CTC CTG CCC AAC ATC ACT CTG GGC AGT GAG ATC CGG
Ala Asp Pro Val Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      326      336      346      356      366
      *      *      *      *      *
GAC TCC TGC TGG CAC TCT TCA GTG GCT CTC GAA CAG AGC ATC GAA TTC
Asp Ser Cys Trp His Ser Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      376      386      396      406
      *      *      *      *
ATC AGA GAC TCC CTG ATT TCC ATC CGA GAT GAG AAG GAT GGG MTS AAC
Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Xxx Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

416      426      436      446      456
      *      *      *      *      *
CGA TGC CTG CCT GAT GGC CAG WCC CTG CCC CCT GGC AGG ACT AAG AAG
Arg Cys Leu Pro Asp Gly Gln Xxx Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

```

FIG. 5b.

```

466      476      486      496      506
*      *      *      *      *
CCT ATT GCT GGA GTG ATC GGC CCT GGC TCC AGC TCT GTG GCC ATT CAA
Pro Ile Ala Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

516      526      536      546      556
*      *      *      *      *
GTC CAG AAT CTT CTC CAG CTG TTC GAC ATC CCA CAG ATC GCC TAT TCT
Val Gln Asn Leu Leu Gln Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

566      576      586      596      606
*      *      *      *      *
GCC ACA AGC ATA GAC CTG AGT GAC AAA ACT TTG TAC AAA TAC TTC CTG
Ala Thr Ser Ile Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

616      626      636      646
*      *      *      *
AGG GTT GTC CCT TCT GAC ACT TTG CAG GCA AGG GCC ATG CTT GAC ATA
Arg Val Val Pro Ser Asp Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

656      666      676      686      696
*      *      *      *      *
GTC AAA CGT TAC AAT TGG ACC TAT GTC TCT GCA GTC CAC ACG GAA GGG
Val Lys Arg Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

706      716      726      736      746
*      *      *      *      *
AAT TAT GGG GAG AGC GGA ATG GAC GCT TTC AAA GAG CTG GCT GCC CAG
Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

756      766      776      786      796
*      *      *      *      *
GAA GGC CTC TGT ATC GCC CAT TCT GAC AAA ATC TAC AGC AAC GCT GGG
Glu Gly Leu Cys Ile Ala His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

806      816      826      836      846
*      *      *      *      *
GAG AAG AGC TTT GAC CGA CTC TTG CGC AAA CTC CGA GAG AGG CTT CCC
Glu Lys Ser Phe Asp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

856      866      876      886
*      *      *      *
AAG GCT AGA GTG GTG GTC TGC TTC TGT GAA GGC ATG ACA GTG CGA GGA
Lys Ala Arg Val Val Val Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

896      906      916      926      936
*      *      *      *      *
CTC CTG AGC GCC ATG CGG CGC CTT GGC GTC GTG GGC GAG TTC TCA CTC
Leu Leu Ser Ala Met Arg Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

946      956      966      976      986
*      *      *      *      *

```

FIG. 5c.

```

ATT GGA AGT GAT GGA TGG GCA GAC AGA GAT GAA GTC ATT GAA GGT TAT
Ile Gly Ser Asp Gly Trp Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    996          1006          1016          1026          1036
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
GAG GTG GAA GCC AAC GGG GGA ATC ACG ATA AAG CTG CAG TCT CCA GAG
Glu Val Glu Ala Asn Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1046          1056          1066          1076          1086
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
GTC AGG TCA TTT GAT GAT TAT TTC CTG AAA CTG AGG CTG GAC ACT AAC
Val Arg Ser Phe Asp Asp Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1096          1106          1116          1126
  *      *      *      *      *      *      *      *
ACG AGG AAT CCC TGG TTC CCT GAG TTC TGG CAA CAT CGG TTC CAG TGC
Thr Arg Asn Pro Trp Phe Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

1136          1146          1156          1166          1176
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
CGC CTT CCA GGA CAC CTT CTG GAA AAT CCC AAC TTT AAA CGA ATC TGC
Arg Leu Pro Gly His Leu Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Arg Ile Cys>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1186          1196          1206          1216          1226
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
ACA GGC AAT GAA AGC TTA GAA GAA AAC TAT GTC CAG GAC AGT AAG ATG
Thr Gly Asn Glu Ser Leu Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1236          1246          1256          1266          1276
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
GGG TTT GTC ATC AAT GCC ATC TAT GCC ATG GCA CAT GGG CTG CAG AAC
Gly Phe Val Ile Asn Ala Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1286          1296          1306          1316          1326
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
ATG CAC CAT GCC CTC TGC CCT GGC CAC GTG GGC CTC TGC GAT GCC ATG
Met His His Ala Leu Cys Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1336          1346          1356          1366
  *      *      *      *      *      *      *      *
AAG CCC ATC GAC GGC AGC AAG CTG CTG GAC TTC CTC ATC AAG TCC TCA
Lys Pro Ile Asp Gly Ser Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

1376          1386          1396          1406          1416
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
TTC ATT GGA GTA TCT GGA GAG GAG GTG TGG TTT GAT GAG AAA GGA GAC
Phe Ile Gly Val Ser Gly Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp>
  a  a  a  a  TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A]  a  a  a  a  >

    1426          1436          1446          1456          1466
  *      *      *      *      *      *      *      *      *
GCT CCT GGA AGG TAT GAT ATC ATG AAT CTG CAG TAC ACT GAA GCT AAT
Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn>

```

FIG. 5d.

```

a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1476      1486      1496      1506      1516
* * * * *
CGC TAT GAC TAT GTG CAC GTT GGA ACC TGG CAT GAA GGA GTG CTG AAC
Arg Tyr Asp Tyr Val His Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1526      1536      1546      1556      1566
* * * * *
ATT GAT GAT TAC AAA ATC CAG ATG AAC AAG AGT GGA GTG GTG CGG TCT
Ile Asp Asp Tyr Lys Ile Gln Met Asn Lys Ser Gly Val Val Arg Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1576      1586      1596      1606
* * * * *
GTG TGC AGT GAG CCT TGC TTA AAG GGC CAG ATT AAG GTT ATA CGG AAA
Val Cys Ser Glu Pro Cys Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1616      1626      1636      1646      1656
* * * * *
GGA GAA GTG AGC TGC TGC TGG ATT TGC ACG GCC TGC AAA GAG AAT GAA
Gly Glu Val Ser Cys Cys Trp Ile Cys Thr Ala Cys Lys Glu Asn Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1666      1676      1686      1696      1706
* * * * *
TAT GTG CAA GAT GAG TTC ACC TGC AAA GCT TGT GAC TTG GGA TGG TGG
Tyr Val Gln Asp Glu Phe Thr Cys Lys Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1716      1726      1736      1746      1756
* * * * *
CCC AAT GCA GAT CTA ACA GGC TGT GAG CCC ATT CCT GTG CGC TAT CTT
Pro Asn Ala Asp Leu Thr Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1766      1776      1786      1796      1806
* * * * *
GAG TGG AGC AAC ATC GAA CCC ATT ATA GCC ATC GCC TTT TCA TGC CTG
Glu Trp Ser Asn Ile Glu Pro Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser Cys Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1816      1826      1836      1846
* * * * *
GGA ATC CTT GTT ACC TTG TTT GTC ACC CTA ATC TTT GTA CTG TAC CGG
Gly Ile Leu Val Thr Leu Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu Tyr Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1856      1866      1876      1886      1896
* * * * *
GAC ACA CCA GTG GTC AAA TCC TCC AGT CGG GAG CTC TGC TAC ATC ATC
Asp Thr Pro Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

1906      1916      1926      1936      1946
* * * * *
CTA GCT GGC ATC TTC CTT GGT TAT GTG TGC CCA TTC ACT CTC ATT GCC
Leu Ala Gly Ile Phe Leu Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu Ile Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

```

FIG. 5e.

```

      1956      1966      1976      1986      1996
      *      *      *      *      *
AAA CCT ACT ACC ACC TCC TGC TAC CTC CAG CGC CTC TTG GTT GGC CTC
Lys Pro Thr Thr Thr Ser Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2006      2016      2026      2036      2046
      *      *      *      *      *
TCC TCT GCG ATG TGC TAC TCT GCT TTA GTG ACT AAA ACC AAT CGT ATT
Ser Ser Ala Met Cys Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2056      2066      2076      2086
      *      *      *      *
GCA CGC ATC CTG GCT GGC AGC AAG AAG AAG ATC TGC ACC CGG AAG CCC
Ala Arg Ile Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg Lys Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

2096      2106      2116      2126      2136
*      *      *      *      *
AGG TTC ATG AGT GCC TGG GCT CAG GTG ATC ATT GCC TCA ATT CTG ATT
Arg Phe Met Ser Ala Trp Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ile>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2146      2156      2166      2176      2186
      *      *      *      *      *
AGT GTG CAA CTA ACC CTG GTG GTA ACC CTG ATC ATC ATG GAA CCC CCT
Ser Val Gln Leu Thr Leu Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu Pro Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2196      2206      2216      2226      2236
      *      *      *      *      *
ATG CCC ATT CTG TCC TAC CCA AGT ATC AAG GAA GTC TAC CTT ATC TGC
Met Pro Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu Ile Cys>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2246      2256      2266      2276      2286
      *      *      *      *      *
AAT ACC AGC AAC CTG GGT GTG GTG GCC CCT TTG GGC TAC AAT GGA CTC
Asn Thr Ser Asn Leu Gly Val Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asn Gly Leu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2296      2306      2316      2326
      *      *      *      *
CTC ATC ATG AGC TGT ACC TAC TAT GCC TTC AAG ACC CGC AAC GTG CCC
Leu Ile Met Ser Cys Thr Tyr Phe Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

2336      2346      2356      2366      2376
*      *      *      *      *
GCC AAC TTC AAC GAG GCC AAA TAT ATC GCG TTC ACC ATG TAC ACC ACC
Ala Asn Phe Asn Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2386      2396      2406      2416      2426
      *      *      *      *      *
TGT ATC ATC TGG CTA GCT TTT GTG CCC ATT TAC TTT GGG AGC AAC TAC
Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2436      2446      2456      2466      2476
      *      *      *      *      *

```

FIG. 5f.

```

AAG ATC ATC ACA ACT TGC TTT GCA GTG AGT CTC AGT GTA ACA GTG GCT
Lys Ile Ile Thr Thr Cys Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2486      2496      2506      2516      2526
      *      *      *      *      *
CTG GGG TGC ATG TTC ACT CCC AAG ATG TAC ATC ATT ATT GCC AAG CCT
Leu Gly Cys Met Phe Thr Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala Lys Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2536      2546      2556      2566
      *      *      *      *
GAG AGG AAT ACC ATC GAG GAG GTG CGT TGC AGC ACC GCA GCT CAC GCT
Glu Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

2576      2586      2596      2606      2616
      *      *      *      *      *
TTC AAG GTG GCT GCC CGG GCC ACG CTG CGC AGC AAC GTC TCC CGC
Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2626      2636      2646      2656      2666
      *      *      *      *      *
AAG CGG TCC AGC AGC CTT GGA GGC TCC ACG GGA TCC ACC CCC TCC TCC
Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2676      2686      2696      2706      2716
      *      *      *      *      *
TCC ATC AGC AGC AAG AGC AAC AGC GAA GAC CCA TTC CCA CAG CCC GAG
Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2726      2736      2746      2756      2766
      *      *      *      *      *
AGG CAG AAG CAG CAG CAG CCG CTG GCC CTA ACC CAG CAA GAG CAG CAG
Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2776      2786      2796      2806
      *      *      *      *
CAG CAG CCC CTG ACC CTC CCA CAG CAG CAA CGA TCT CAG CAG CAG CCC
Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

2816      2826      2836      2846      2856
      *      *      *      *      *
AGA TGC AAG CAG AAG GTC ATC TTT GGC AGC GGC ACG GTC ACC TTC TCA
Arg Cys Lys Lys Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2866      2876      2886      2896      2906
      *      *      *      *      *
CTG AGC TTT GAT GAG CCT CAG AAG AAC GCC ATG GCC CAC GGG AAT TCT
Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Gly Asn Ser>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

      2916      2926      2936      2946      2956
      *      *      *      *      *
ACG CAC CAG AAC TCC CTG GAG GCC CAG AAA AGC AGC GAT ACG CTG ACC
Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr>

```

FIG. 5g.

```

a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

2966      2976      2986      2996      3006
* * * * *
CGA CAC CAG CCA TTA CTC CCG CTG CAG TGC GGG GAA ACG GAC TTA GAT
Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu Asp>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

3016      3026      3036      3046
* * * * *
CTG ACC GTC CAG GAA ACA GGT CTG CAA GGA CCT GTG GGT GGA GAC CAG
Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly Asp Gln>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

3056      3066      3076      3086      3096
* * * * *
CGG CCA GAG GTG GAG GAC CCT GAA GAG TTG TCC CCA GCA CTT GTA GTG
Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala Leu Val Val>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

3106      3116      3126      3136      3146
* * * * *
TCC AGT TCA CAG AGC TTT GTC ATC AGT GGT GGA GGC AGC ACT GTT ACA
Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Val Thr>
a a a a TRADUCCIÓN DE PHCH4 [A] a a a a >

3156      3166      3176      3186
* * * * *
GAA AAC GTA GTG AAT TCA T AAAATGG AAGGAGAAGA CTGGGCTAG
Glu Asn Val Val Asn Ser Xxx>
TRADUCCIÓN DE PHC a >

```

FIG. 6.

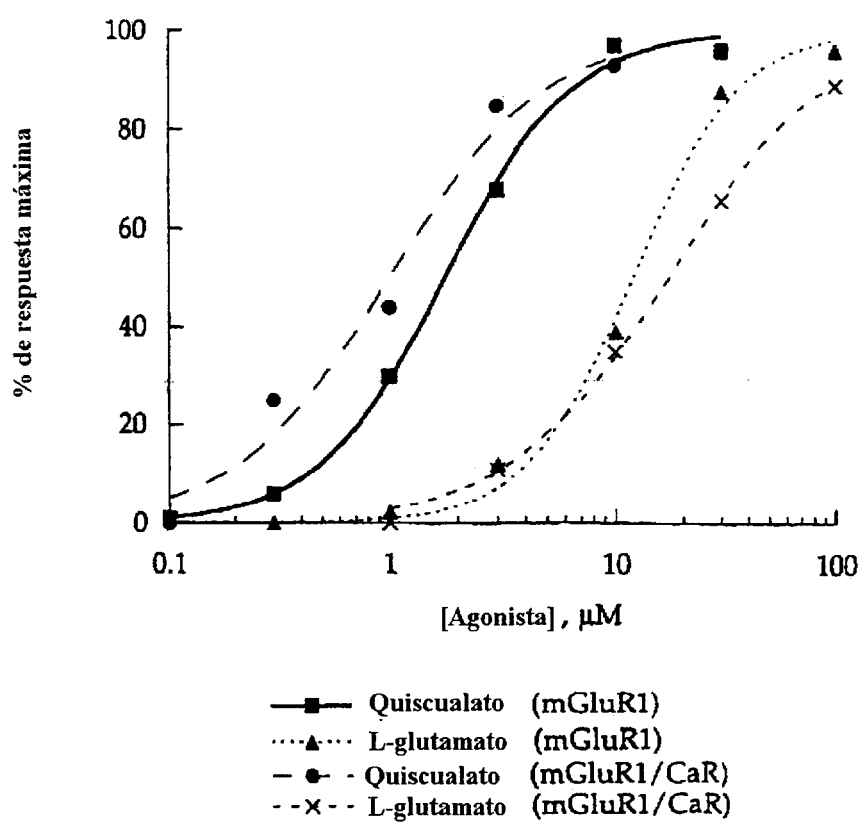


FIG. 7.

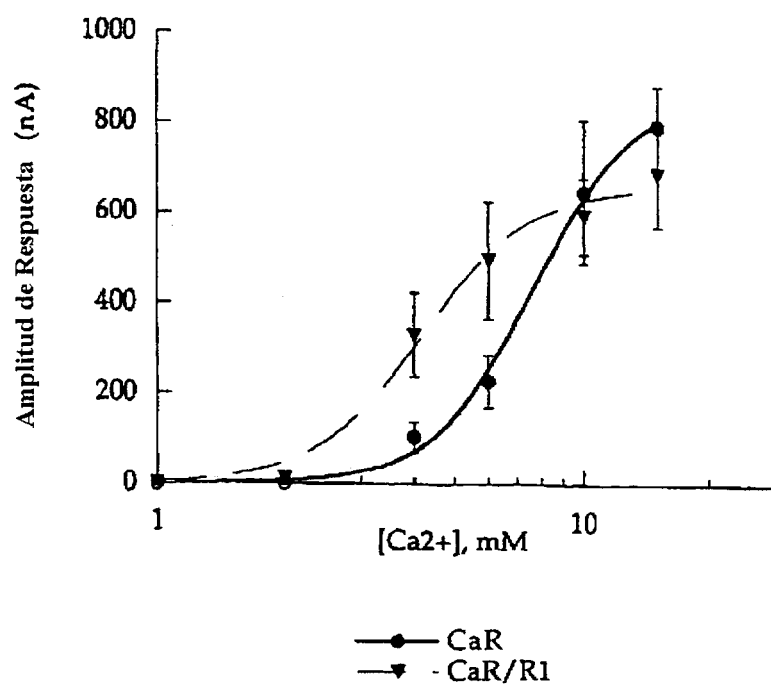


FIG. 8a.

a) pmGluR1

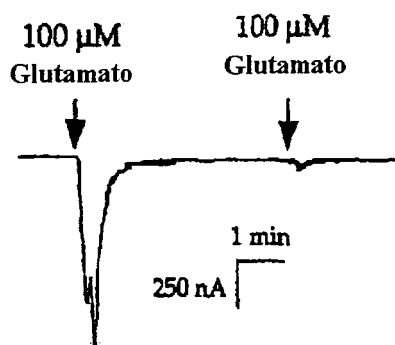


FIG. 8b

b) hCaR

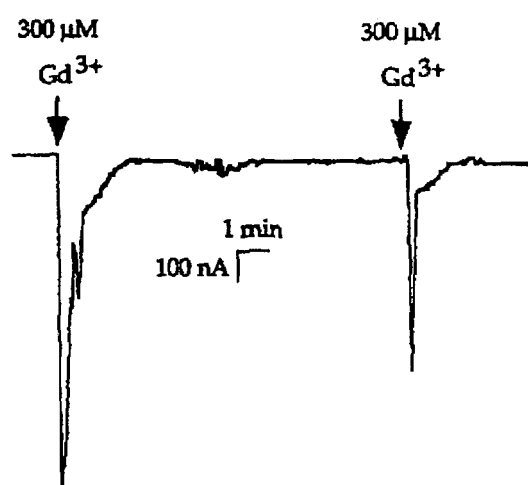


FIG. 8c.

c) pCH3

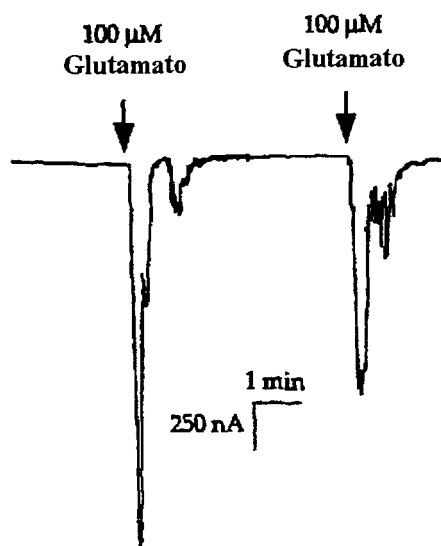
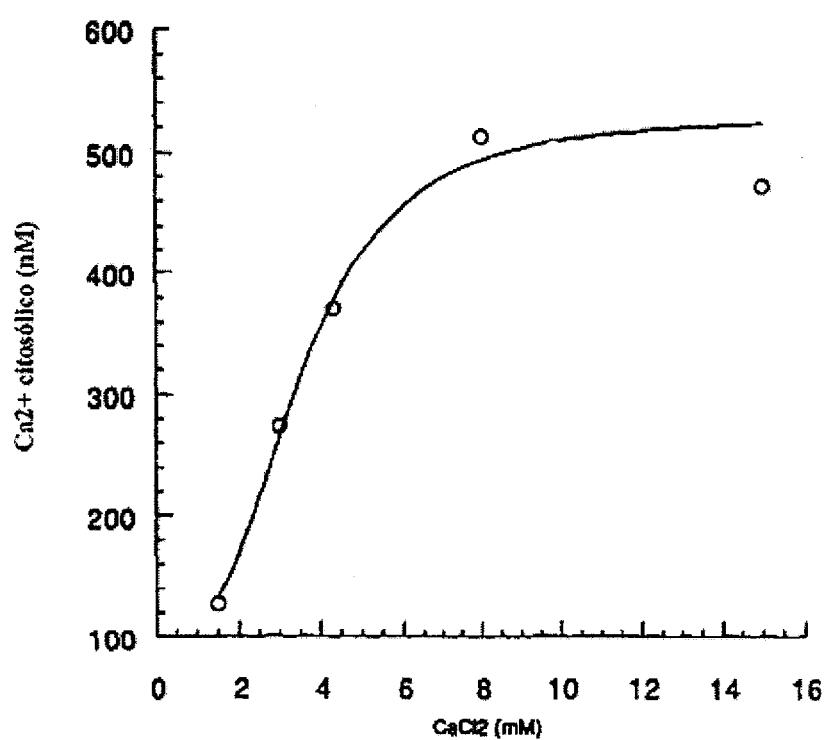


FIG. 9.



$y = (m1 - 99.8) / (1 + (m2/m0)^{m3})$		
	Valor	Error
m1	529.94	26.745
m2	3.5223	0.30124
m3	2.9298	0.63546
Chisq	5476.2	NA
R	0.98433	NA