



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 792**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98960760 .1**

86 Fecha de presentación : **04.12.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1034268**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2000**

54

Título: **Receptores asociados a proteína G y usos para los mismos.**

30

Prioridad: **04.12.1997 US 985090**
17.03.1998 US 42780

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73

Titular/es: **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, Inc.**
75 Sidney Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72

Inventor/es: **Goodearl, Andrew, D., J.;**
Glucksmann, M., Alexandra;
Xie, Michael y
Distefano, Peter

74

Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 285 792 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Receptores asociados a proteína G y usos para los mismos.

5 **Contexto de la invención***Receptores asociados a Proteína G*

10 Los receptores asociados a proteína G (GPCRs) constituyen una clase principal de proteínas responsables para convertir una señal en una células. GPCRs tienen tres dominios estructurales: un dominio extracelular de aminoácido, un dominio transmembránico que contiene siete segmentos transmembránicos, tres curvas extracelulares, y tres curvas intracelulares, y un dominio intracelular carboxi terminal. Tras la unión de un ligando con una porción extracelular de un GPCR, se convierte una señal en la célula que da como resultado un cambio en la propiedad biológica o fisiológica de la células. GPCRs, junto con proteínas G y efectores (enzimas intracelulares y canales modulados por proteínas G),
15 son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de segundos mensajeros intracelulares con las entradas extracelulares.

Los genes GPCR y los productos de genes son agentes potenciales causativos de enfermedades (Spiegel *et al.*, J. Clin. Invest. 92:1119-1125 (1993); McKusick *et al.*, J. Med. Genet. 30:1-26 (1993)). Defectos específicos en el gen rhodopsin y el gen receptor vasopresina V2 han demostrado causar varias formas de retinitis pigmentosa (Nathans *et al.*, Annu. Rev. Genet. 26:403-424 (1992)), y diabetes insípida nefrogénica (Holtzman *et al.*, Hum. Mol. Genet. 2:1201-1204 (1993)). Estos receptores son de crítica importancia para el sistema nervioso central y para los procesos fisiológicos periféricos. Los análisis evolucionarios sugieren que los ancestros de estas proteínas se desarrollaron originariamente en relación con los planes del cuerpo complejo y de los sistemas nerviosos.
25

La superfamilia de proteína GPCR puede dividirse en cinco familias: Familia I, receptores tipificados por rhodopsin y el receptor $\beta 2$ adrenérgico y actualmente representados por más de 200 miembros únicos (Dohlman *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 60:653-688 (1991)), Familia II, la familia de receptor hormona paratiroidea/calcitonina/secretina (Juppner *et al.*, Science 254:1024-1026 (1991); Lin *et al.*, Science 254:1022-1024 (1991)); Familia III, la familiar del receptor metabotrópico glutamato, importante en la quimiotaxis y desarrollo de D. Discoideum (Klein *et al.*, Science 241:1467-1472 (1988)); y Familia V, los receptores de feromona en unión fúngica como STE2 (Kurjan, Annu. Rev. Biochem. 61:1097-1129 (1992)).
30

También existen un pequeño número de otras proteínas que presentan siete segmentos hidrofóbicos putativos y parecen no estar relacionadas con GPCRs; no han demostrado asociarse con proteínas g. *Drosophila* expresa una proteína específica de fotorreceptor, novia de sin siete (boss), una proteína de siete segmentos transmembránicos que ha sido exhaustivamente estudiada y que no muestra evidencia de ser un GPCR (Hart *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5047-5051 (1993)). El gen encrespado (fz) en *Drosophila* también parece ser una proteína con siete segmentos transmembránicos. Como boss, fz no ha demostrado asociaras con proteínas G (Vinson *et al.*, Nature 338:263-264 (1989)).
40

Las proteínas G representan una familia de proteínas heterotriméricas compuestas por subunidades α , β , e γ que se enlazan con nucleótidos de guanina. Estas proteínas normalmente están unidas con los receptores de superficie celular, es decir, los receptores que contienen siete segmentos de membrana. Tras el enlace del ligando con el GPCR, se transmite un cambio conformacional a la proteína G, que provoca que la subunidad α intercambie una molécula de enlace GDP por una molécula GTP y que se disasocie de las subunidades β γ . La forma enlazada a GTP de una subunidad α normalmente funciona como una molécula moduladores del efector, llevando a la producción de segundos mensajeros, como cAMP (por ejemplo, mediante la activación de adenil ciclase), diacilglicerol o inositos fosfatos. Se conocen más de 20 tipos diferentes de subunidades α en los humanos. Estas subunidades se asocian con un conjunto más pequeño de subunidades β e γ . Ejemplos de proteínas G de mamíferos incluyen Gi, Go, Gq y Gt. Las proteínas G se describen de manera extensa en Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, (Scientific American Books, Inc., New York, N.Y., 1995). GPCRs, proteínas G y efector unido a proteína G y sistemas de segundo mensajero han sido revisados y estudiados en *The G-Protein Linked Receptor Fact Book*, Watson *et al.*, eds., Academic Press (1994).
50

Los GPCRs son un objetivo principal para la acción y desarrollo de los fármacos. Por consiguiente, resulta valorable para el desarrollo del campo de la farmacéutica la identificación y caracterización de los GPCRs previamente desconocidos. La presente invención avanza el estado de la técnica al proporcionar un GPCR humano previamente sin identificar.
55

60 *Receptores Muscarínicos*

Los receptores muscarínicos, así llamados porque las acciones de acetilcolina sobre tales receptores son similares a las producidas por la muscarina alcaloide de champiñón, median la mayor parte de los efectos inhibidores y excitadores de la acetilcolina neurotransmisora en el corazón, musculatura lisa, glándulas y neuronas (tanto presinápticas como postsinápticas) en el sistema autonómico y en el sistema nervioso central (Eglen, R. and Watson, N. (1996) *Pharmacology & Toxicology* 78:59-68). Los receptores muscarínicos pertenecen a la superfamilia de receptores que asocian proteína G (Wess, J. *et al.* (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry* 3:423-491). Como el resto de receptores asociados a proteína G, los receptores muscarínicos están pronosticados para conformar un pliegue de proteína
65

genérica consistente en siete hélices de transmembrana hidrofóbica unidas por curvas intracelulares y extracelulares, un dominio extracelular amino-terminal, y un dominio citoplásmico carboxil-terminal.

Los receptores muscarínicos de los mamíferos muestra un alto grado de identidad secuencial, particularmente en los dominios transmembránicos, compartiendo aproximadamente 145 aminoácidos no variantes (Wess, J. (1993) *TIPS* 14:308-313). Además, todos los receptores muscarínicos de mamíferos contienen una enorme tercera curva citoplásmica que, salvo para las porciones próximas a la membrana, muestran virtualmente la falta de identidad de secuencia entre los diferentes miembros de la familia (Bonner, T.I. (1989) *Trends Neurosci.* 12:148-151). El enlace de ligando con el receptor parece desencadenar cambios conformacionales dentro del fajo helicoidal, que posteriormente se transmiten al dominio citoplásmico, donde se da la interacción con las proteínas G específicas.

Los estudios de clonación molecular han revelado la existencia de cinco proteínas receptores muscarínicos de mamífero molecularmente diferentes, denominados receptores M₁-M₅ (Bonner, T.I. (1989) *Trends Neurosci.* 12:148-151; y Hulme, E.C *et al* (1990) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:633-673). El receptor M₁ se expresa principalmente en el cerebro (corteza cerebral, bulba olfativa, tubérculo olfativo, prosencéfalo basal/separador, amígdala, e hipocampo) y en glándulas exocrinas (Buckley, N.J. *et al.* (1988) *J. Neurosci.* 8:4646-4652). El receptor M₂ se expresa en el cerebro (bulba olfativa, prosencéfalo basal/separador, tálamo y amígdala), y en el íleo y el corazón. El receptor M₃ se expresa en el cerebro (corteza cerebral, tubérculo olfativo, tálamo e hipocampo) el pulmón, el íleo, y en glándulas exocrinas. El receptor M₄ se expresa en el cerebro (corteza cerebral, tubérculo olfativo, hipocampo y estriado) y en el pulmón. Por último, el receptor M₅ se expresa principalmente en el cerebro (sustancia negra) (Hulme, E.C *et al.* (1990) *A Rev. Pharmac. Toxic* 30:633-673).

Las dos enzimas con las que los receptores muscarínicos interactúan más directamente son adenilato ciclasa y fosfolipasa C. Estudios con receptores clonados han demostrado que los receptores muscarínicos M₁, M₃ y M₅ se asocian con los tipos de proteínas G conocidos como G_o (una proteína estimuladora unida con fosfolipasa C) o G_q y que su activación da como resultado la activación de fosfolipasa C. Los receptores muscarínicos M₂ y M₄ se asocian con una proteína Gi (una proteína inhibidora unida a adenilato ciclasa) y su activación da como resultado la inhibición de adenilato ciclasa. Mediante las rutas de conversión de estas señales, los receptores muscarínicos son responsables de una variedad de funciones fisiológicas que incluyen la regulación de liberación neurotransmisora (incluyendo la liberación de acetilcolina) del cerebro, la regulación de enzimas digestivas y la secreción de insulina en el páncreas, la regulación de secreción de amilasa por la glándula parótida, y la regulación de contracción en musculatura cardíaca y lisa (Caulfield, M.P. (1993) *Pharmac. Ther.* 58:319-379).

Receptores Carnitina

L-carnitina (4-N-trimetilamonio-3-hidroxi-ácido butírico) juega un importante papel en la regulación de ácido graso de larga cadena en musculatura del miocardio y del esqueleto (Bremer, (1983) *Pharmacol Rev.* 63, 1420-1480; Bieber, (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:261-283; Fritz y Arrigoni-Martelli, (1993) *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 355-360). Se encuentra L-carnitina en todos los tejidos que incluyen el cerebro, donde su concentración regional varía, encontrándose la mayor parte en el cerebelo y el hipotálamo (Bresolin *et al.*, (1982) *Exp. Neurol.* 78, 285-292); Shug *et al.*, (1982) *Life Sci.* 31, 2869-2874). También se ha demostrado que hay un transporte activo de L-carnitina de la sangre al cerebro (Brooks y McIntosh, (1975) *Biochem. J.* 148, 439-445). Debido al principal paso metabólico para el proceso bionérgico del cerebro no es la oxidación de ácido graso mitocondrial, donde L-carnitina juega un papel pivotal (Biweber, (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57,261-283), se han explorado funciones alternativas fisiológicas. Un número de piezas experimentales de evidencia sugieren que este compuesto puede actuar como un electromodulador potencial (Blum *et al.*, (1971) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178, 331-338; Falchetto *et al.*, (1971) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 49, 1-7; Fariello y Shug, (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 1012-1013; Huth *et al.*, (1981) *J. Neurochem.* 36, 715-723; Shug *et al.*, (1982) *Life Sci.* 31,2869-2874; Janiri y Tempesta (1983) *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 3, 295-306; Zoccarato *et al.*, (1983) *Biochem. Biophys. Acta* 734,381-383; Hanuniemi y Kontro, (1988) *Neurochem. Res.* 3, 317-323; Janiri *et al.*, (1991) *J. Neural. Transm.* 86, 135-146), a pesar de una función directa de L-carnitina como un neurotransmisor del cerebro ha sido descartada (Shug *et al.*, (1982) *Life Sci.* 31,2869-2874). Un transporte activo de carnitina inhibida por GABA en porciones de cerebro de ratas fue propuesto por Fariello y Shug, (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 1012-1013; y Huth *et al.*, (1981) *J. Neurochem.* 36, 715-723; y también la respuesta de GABA fue inhibida por carnitina. (Hanuniemi y Kontro, (1988) *Neurochem. Res.* 3, 317-323). L-carnitina también demostró ejercer una actividad colinomimética en neuronas colinoceptivas (Tempesta *et al.*, (1982) *Neuropharmacology* 21, 1207-1210; Janiri y Tempesta (1983) *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 3, 295-306; Janiri *et al.*, (1991) *J. Neural. Transm.* 86, 135-146). L-carnitina es un importante cofactor de carnitina acetiltransferasa (CAT), una enzima que provoca la transferencia reversible de la molécula de acetil a través de membranas mitocondriales de L-carnitina a CoA (Bieber, (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 261-283); por lo tanto, carnitina puede estar involucrada en la formación de acetilcolina por medio de la regulación del transporte de grupos de acetilo de la matriz mitocondrial al citosol (White y Scates, (1990) *Neurochem. Res.* 15, 597-601). Sin embargo, la actividad CAT se localiza principalmente en la mitocondria y no muestra ninguna localización preferencial regional en el cerebro (McCaman *et al.*, (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 930-934).

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona una nueva molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, aquí referido como polipéptido o proteína flh84g5, que es capaz de, por ejemplo, modular los efectos de un ligando GPCR, como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina, en

ES 2 285 792 T3

un ligando flh84g5 receptivo a las células, modulando señal/actividad fosfolipasa C. Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido flh84g5 son aquí referidas como moléculas de ácido nucleico flh84g5. Estas moléculas de ácido nucleico tienen elevada homología secuencial con la familia muscarínica de receptores. En una realización preferente, el polipéptido flh84g5 interactúa con (por ejemplo, se enlaza con) una proteína que es un miembro de la familia G de proteínas. Ejemplos de tales proteínas incluyen Go, Gi, Gs, Gq y Gt. Estas proteínas se describen en Lodish H. *et al.*, Molecular Cell Biology, (Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995); Dolphin A. C *et al.*, (1987) Trends Neurosci. 10:53; y Birnbaumer L. *et al.*, (1992) Cell 71:1069.

En una realización preferente, el polipéptido flh84g5 interactúa con (por ejemplo, se enlaza con) un ligando flh84g5. Por ejemplo, acetilcolina es el neurotransmisor predominante en las sinapsis simpáticas y parasimpáticas preganglionarias, así como en las sinapsis parasimpáticas postganglionarias y en algunas sinapsis simpáticas postganglionarias. Las sinapsis en las cuales acetilcolina es el neurotransmisor se llaman sinapsis colinérgicas. Acetilcolina actúa para regular la contracción de la musculatura lisa, ritmo del corazón, función glandular tal como secreción de ácido gástrico, y función neural como liberación de neurotransmisores del cerebro. El polipéptido flh84g5 de la presente invención enlaza con un ligando flh84g5, como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina, y sirve para mediar la señal a la célula inducida por el ligando como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina. Por lo tanto, las moléculas flh84g5 pueden usarse como objetivos para modular la función inducida por el ligando flh84g5 y por lo tanto tratar los desórdenes asociados con, por ejemplo, niveles anormales de ligando flh84g5, o actividad anormal o aberrante de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico.

Por consiguiente, un aspecto de la invención pertenece a un polipéptido aislado flh84g5 que consta de la secuencia de aminoácido SEC ID No. 2, 5, o 32.

En otra realización, la invención pertenece a un fragmento de un polipéptido que tiene una actividad flh84g5, de tal modo que cuando se expresa en oocitos, permite que L-carnitina provoque la corriente de cloruro de calcio activado, constando el fragmento de la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2; donde el fragmento consta al menos de 15 aminoácidos contiguos de SEC ID NO: 2, la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, donde el fragmento consta al menos de 15 aminoácidos contiguos de residuos de aminoácido 109-130, 152-174, 197-219, 360-380 o 396-416 de SEC ID NO: 5; o la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 32; donde el fragmento consta al menos de 15 aminoácidos contiguos de SEC ID NO: 32. El polipéptido aislado flh84g5 o porción del mismo puede modular una respuesta de ligando flh84g5 en una célula sensible al ligando flh84g5.

Incluso en otra realización, el polipéptido es al menos 95% idéntico a la secuencia de aminoácido entera de SEC ID NO: 2, 5, o 32.

De manera alternativa, el polipéptido aislado flh84g5 puede comprender una secuencia de aminoácido que se codifica por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo severas condiciones SEC ID NO: 1, 4 o 31, y que, cuando se expresan en oocitos, provoca la corriente de cloruro de calcio activado, o es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácido entera de SEC ID NO: 1, 4, o 31, como las variantes alélicas y homólogas de no-humanos y no-ratas de los polipéptidos flh84g5 aquí descritos así como las variantes genéticamente alteradas generadas por metodologías de ADN recombinante. Es también preferible que las formas preferentes de flh84g5 también tengan una o más de las actividades flh84g5 aquí descritas.

Una porción biológicamente activa de flh84g5 puede incluir un dominio o motivo, preferentemente un dominio o motivo que tenga una actividad flh84g5. El dominio puede ser un dominio transmembránico. Una porción biológicamente activa de un polipéptido flh84g5 que incluye un dominio transmembránico también puede tener una de las siguientes actividades flh84g5: 1) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) un ligando flh84g5, como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina; 2) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) una proteína G u otra proteína que naturalmente se enlaza con flh84g5; 3) puede modular la actividad de un canal de ión (por ejemplo, un canal de cloruro activado de calcio o un canal de potasio o calcio); 4) puede modular ión citosólico, por ejemplo, concentración de calcio; 5) puede modular la liberación de un neurotransmisor, por ejemplo, acetilcolina o carnitina, de una neurona, por ejemplo, una neurona presináptica; 6) puede modular una respuesta de ligando flh84g5 en un ligando flh84g5 receptivo a las células (por ejemplo, una célula de músculo suave o una célula glandular) para, por ejemplo, afectar de manera beneficiosa al ligando flh84g5 receptivo a las células, por ejemplo, una neurona; 7) puede ser un ligando de señal que se enlaza por medio de movimiento fosfatidilinositol; y 8) puede modular, por ejemplo, activar o inhibir, la actividad C de fosfolipasa.

El polipéptido flh84g5 (o proteína) o una porción biológicamente activa del mismo como se ha definido anteriormente puede estar operativamente unido con un polipéptido no flh84g5 (por ejemplo, un polipéptido que comprende secuencias heterólogas de aminoácido) para formar un polipéptido de fusión. Además, el polipéptido flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo puede incorporarse a una composición farmacéutica que consta de un polipéptido y un portador farmacéuticamente aceptable.

El polipéptido flh84g5 de la invención, o porciones o fragmentos de los mismos, pueden usarse para preparar anticuerpos flh84g5. Un péptido antigénico de flh84g5 puede constar al menos de 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 30 residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácido mostrada en SEC ID no. 2, 5, o 32 y que comprende un epítipo flh84g5 de tal modo que un anticuerpo elevado contra el péptido forme un complejo inmune específico con flh84g5. La invención además proporciona un anticuerpo que específicamente se enlaza con

ES 2 285 792 T3

flh84g5. El anticuerpo puede ser monoclonal. El anticuerpo puede estar unido a una sustancia detectable. Además, el anticuerpo puede incorporarse a una composición farmacéutica que esté formada por el anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 Otro aspecto de la invención pertenece a moléculas de ácido nucleico aislado (por ejemplo, cADN) que comprenden una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido flh84g5 como se ha definido anteriormente. En realizaciones particularmente preferentes, las moléculas de ácido nucleico aislado comprenden la región codificadora de la secuencia nucleótida de SEC ID NO: 1, 4, o 31. En otras realizaciones particularmente preferentes, las moléculas de ácido nucleico aislado de la invención comprenden una secuencia nucleótida que codifica de manera natural las variante alélicas que se puedan dar, variantes alteradas genéticamente y homólogos de no humanos y no ratas de los polipéptidos flh84g5 aquí descritos. Tales moléculas de ácido nucleico comprenden una secuencia nucleótida que es al menos 95% idéntica a la secuencia nucleótida mostrada en la SEC ID NO: 1, 4 o 31 o un complemento de la misma, y codifica un polipéptido que, cuando se expresa en oocitos, permite que L-carnitina provoque la corriente de cloruro de calcio activado. Los polipéptidos preferentes flh84g5 de la presente invención también poseen preferentemente una de las actividades flh84g5 aquí descritas.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislado codifica un polipéptido donde el polipéptido incluye una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la secuencia nucleótida mostrada en la SEC ID NO: 2, 5 o 32.

20 En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislado codifica un polipéptido, cuando se expresa en oocitos, permite que L-carnitina provoque la corriente de cloruro de calcio activado y que incluye un dominio transmembránico que comprende residuos de aminoácido 34-59, 73-91, 109-130, 152-174, 197-219, 360-380 o 396-416 de SEC ID NO: 2 que se muestran como secuencias separadas designadas SEC ID Nos: 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 (dominios transmembránicos humanos), respectivamente, o residuos de aminoácido 34-59, 73-91, 109-130, 152-174, 197-219, 360-380 o 396-416 de SEC ID NO: 5 (dominios transmembránicos de rata) que se muestran como secuencias separadas designadas SEC ID Nos: 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20, o residuos de aminoácido 1-8, 26-47, 69-91, 114-136, 277-297, 0 313-333 de SEC ID NO: 32 que se muestran como secuencias separadas designadas SEC ID Nos: 34, 35, 36, 37, 38 o 39, respectivamente.

30 La molécula de ácido nucleico aislado puede codificar un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de fusión flh84g5 como un polipéptido flh84g5 fusionado con un polipéptido homólogo que tiene una o más de las siguientes actividades flh84g5: 1) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) un ligando flh84g5, como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina; 2) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) una proteína G u otra proteína que naturalmente se enlaza con flh84g5; 3) puede modular la actividad de un canal de ión (por ejemplo, un canal de cloruro activado de calcio o un canal de potasio o calcio); 4) puede modular ión citosólico, por ejemplo, concentración de calcio; 5) puede modular la liberación de un neurotransmisor, por ejemplo, acetilcolina o carnitina, de una neurona, por ejemplo, una neurona presináptica; 6) puede modular una respuesta de ligando flh84g5 en un ligando flh84g5 receptivo a las células (por ejemplo, una célula de músculo suave o una célula glandular) para, por ejemplo, afectar de manera beneficiosa al ligando flh84g5 receptivo a las células, por ejemplo, una neurona; 7) puede ser un ligando de señal que se enlaza por medio de movimiento fosfatidilinositol; y 8) puede modular, por ejemplo, activar o inhibir, la actividad C de fosfolipasa.

45 Otro aspecto de la invención pertenece a vectores, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes, que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención y células huésped en las cuales se han introducidos tales vectores. En una realización, dicha célula huésped se emplea para producir un polipéptido flh84g5 cultivando la célula huésped en un medio adecuado. Si se desea, el polipéptido flh84g5 puede aislarse del medio o la célula huésped. Los animales no humanos transgénicos pueden producirse de tal modo que un gen flh84g5 haya sido introducido o alterado. El genoma del animal no humano puede alterarse mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico de la invención que codifica flh84g5 como un transgen, o un gen endógeno flh84g5 dentro del genoma del animal no humano puede alterarse, por ejemplo, funcionalmente interrumpido, por recombinación homóloga.

55 También se describen métodos para modular una actividad celular mediada por flh84g5, por ejemplo, procesos biológicos mediados por movimiento de fosfatidilinosito y señalización; secreción de una molécula, por ejemplo, un neurotransmisor de una célula del cerebro, o una enzima de una célula glandular; o contracción de una célula de musculatura lisa, por ejemplo, una célula de musculatura lisa ílea o célula cardíaca, por ejemplo, un cardiomiocito. Tales métodos incluyen el contacto de la célula con un agente que modula actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5 como una actividad mediada por flh84g5 que se altera en relación a la misma actividad celular que se da en la ausencia de un agente. En una realización preferente, la célula (por ejemplo, una célula de musculatura lisa o una célula neural) es capaz de responder a un ligando flh84g5 a través de una ruta de señalización que implica un polipéptido flh84g5. El agente que modula la actividad flh84g5 puede ser un agente que estimula la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5. Ejemplos de agentes que estimulan la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 incluyen pequeñas moléculas, polipéptidos activos la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5, y ácidos nucleicos que codifican la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 que han sido introducidos en la célula. Ejemplos de agentes que inhiben la actividad o expresión de la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 incluyen pequeñas moléculas, moléculas de ácido nucleico la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 antisentido, y anticuerpos que específicamente se enlazan con la actividad de polipéptido

flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5. En una realización preferente, la célula está presente dentro del sujeto y el agente se administra al sujeto.

La presente invención también pertenece al uso de un compuesto capaz de contactar una célula que exprese polipéptido la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 y que se adapte para enlazarse con el polipéptido en una suficiente concentración como para modular la actividad del polipéptido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tenga un desorden caracterizado por la actividad aberrante del polipéptido la actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5 o expresión de ácido nucleico, seleccionado de un desorden del sistema nervioso, por ejemplo, un desorden cognitivo, un desorden motriz, un desorden del sueño, un desorden esquizoefectivo, un desorden que afecta los mecanismos de generación de dolor, un desorden con la bebida, un desorden alimenticio, un desorden relacionado con al musculatura lisa, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable, un desorden relacionado con la musculatura cardiaca, por ejemplo, bradicardia, o un desorden relacionado con las glándulas, por ejemplo, xerostomía. El compuesto es seleccionado de un anticuerpo que específicamente se enlaza con un polipéptido la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 como aquí se ha definido y un polipéptido la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5, porción o variante alélica que se da naturalmente de la misma como aquí se define.

También se describen métodos para detectar mutaciones que se dan de manera natural o genéticas creadas de manera recombinante en un gen la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5, determinando de este modo si el sujeto con el gen mutado está en situación de riesgo para (o si está predispuesto) un desorden caracterizado por la actividad aberrante del polipéptido la actividad de polipéptido flh84g5o expresión de ácido nucleico flh84g5 o expresión de ácido nucleico, seleccionado de un desorden del sistema nervioso, un desorden relacionado con la musculatura lisa, un desorden relacionado con la musculatura cardiaca o un desorden relacionado con las glándulas. En realizaciones preferentes, los métodos incluyen la detección, en una muestra de células de un sujeto, de la presencia o ausencia de una mutación genética caracterizada por una alteración que afecta la integridad que codifica un polipéptido flh84g5, o la expresión incorrecta del gen flh84g5, como el causado por una sustitución de base de ácido nucleico, eliminación o adición, o grandes cambios de secuencia provocados por una traslación genética, inversión o inserción.

Otro aspecto de la invención pertenece a los métodos para detectar la presencia de flh84g5, o variantes alélicas del mismo, en una muestra biológica. En una realización preferente, los métodos incluyen contacto de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra celular de musculatura lisa o del cerebro) con un compuesto o un agente capaz de detectar polipéptido flh84g5 o mRNA flh84g5 de tal modo que la presencia de flh84g5 se detecte en una muestra biológica. El compuesto o agente puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico etiquetada o etiquetable capaz de enlazarse con el polipéptido flh84g5. La invención permite que los métodos para diagnóstico de sujeto con, por ejemplo, un desorden del sistema nervioso, un desorden relacionado con la musculatura lisa, un desorden relacionado con la musculatura cardiaca o un desorden relacionado con las glándulas, se base en al detección de polipéptido flh84g5 o mRNA. Tales métodos incluyen contacto de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra celular de musculatura lisa o del cerebro) del sujeto con un agente capaz de detectar polipéptido flh84g5 o mRNA, determinando la cantidad de polipéptido flh84g5 o mRNA expresada en la célula o muestra de tejido, en comparación con la cantidad de polipéptido flh84g5 o mRNA expresando en la célula o muestra de tejido para la muestra de control. La muestra celular puede ser una muestra celular del cerebro.

Los kits para detectar flh84g5 en una muestra biológica que incluye agentes capaces de detectar polipéptido flh84g5 o mRNA están dentro del alcance de la invención.

También se incluyen métodos, por ejemplo, ensayos de análisis, para identificar un compuesto, por ejemplo, un compuesto de test, para tratar un desorden caracterizado por la expresión aberrante del polipéptido del ácido nucleico flh84g5 o actividad del polipéptido, por ejemplo, un desorden del sistema nervioso, un desorden relacionado con la musculatura lisa, un desorden relacionado con la musculatura cardiaca o un desorden relacionado con las glándulas. Estos métodos normalmente incluyen ensayar la habilidad del compuesto o agente para modular la expresión del gen flh84g5 o la actividad del polipéptido flh84g5 identificando de este modo un compuesto para el tratamiento de un desorden caracterizado por la expresión aberrante del polipéptido del ácido nucleico flh84g5 o actividad del polipéptido. En una realización preferente, el método también implica el contacto de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de célula o tejido, por ejemplo, una muestra celular de cerebro o musculatura lisa, obtenida a partir de un sujeto que tiene un desorden con un compuesto o agente, determinando la cantidad de polipéptido caracterizado por la expresión aberrante del polipéptido flh84g5 expresado y/o midiendo la actividad del polipéptido flh84g5 en la muestra biológica, comparando la cantidad de polipéptido flh84g5 expresada en la muestra biológica y/o la actividad biológica de flh84g5 medible en la célula con la de la muestra de control. Una alteración en la cantidad de expresión de polipéptido flh84g5 o actividad flh84g5 en la célula expuesta al compuesto o agente en comparación con el control es indicativo de una modulación de la expresión flh84g5o actividad flh84g5.

La invención también pertenece a los métodos para identificar un compuesto o agente, por ejemplo, un compuesto o agentes de test, que interactúa con (por ejemplo, se enlaza) un polipéptido flh84g5. Estos métodos pueden incluir los pasos del contacto del polipéptido flh84g5 con el compuesto o agente bajo condiciones que permiten el enlace del compuesto con el polipéptido flh84g5 para formar un complejo y detectar la formación de un complejo del polipéptido flh84g5 y el compuesto en el cual la habilidad del compuesto para enlazarse con el polipéptido flh84g5 se indica mediante la presencia del compuesto en el complejo.

La invención además pertenece a los métodos para identificar un compuesto o agente, por ejemplo, un compuesto o agente de test, que modula, por ejemplo, estimula o inhibe, la interacción del polipéptido flh84g5 con una molécula objetivo, por ejemplo, acetilcolina o una molécula similar a la acetilcolina como carnitina, o una proteína celular implicada en movimiento fosfatidilinositol y señalización. En estos métodos el polipéptido flh84g5 entra en contacto, en la presencia del compuesto o agente, con la molécula objetivo bajo condiciones que permiten el enlace de la molécula objetivo con el polipéptido flh84g5 para formar un complejo. Una alteración, por ejemplo, un aumento o descenso, en la formación compleja entre el polipéptido flh84g5 y la molécula objetivo en comparación con la cantidad de complejo formado en la ausencia del compuesto o agente es indicativo de la habilidad del compuesto o agente para modular la interacción del polipéptido flh84g5 con la molécula objetivo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa el nucleótido humano flh84g5 (SEC ID NO: 1) y secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 2). La región codificadora sin la región no traducida 5' y 3' del gen humano flh84g5 se muestra en SEC ID NO: 3.

La Figura 2 representa el nucleótido de rata flh84g5 (SEC ID NO: 4) y secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 5). La región codificadora sin la región no traducida 5' y 3' del gen de rata flh84g5 se muestra en SEC ID NO: 6.

La Figura 3 representa el nucleótido de ratón flh84g5 (SEC ID NO: 31) y secuencias de aminoácido (SEC ID NO: 32). La región parcial codificadora sin la región no traducida 3' del gen de ratón flh84g5 se muestra en SEC ID NO: 33.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevas moléculas, aquí referidas como ácido nucleico flh84g5 y moléculas de polipéptido. En una realización, las moléculas flh84g5 modulan la actividad de una o más proteínas incluidas en una ruta de señalización neurotransmisora, por ejemplo, una ruta de señalización de ligando flh84g5. En una realización preferente, las moléculas flh84g5 de la presente invención son capaces de modular la actividad de proteínas incluidas en la ruta de señalización de ligando flh84g5 modulando de este modo los efectos de un ligando flh84g5 sobre células sensibles a un ligando flh84g5.

Como aquí se emplea, "células sensibles a un ligando flh84g5" se refiere a células que tienen una función que puede modularse (por ejemplo, estimularse o inhibirse) por un ligando flh84g5, como acetilcolina o una molécula similar a la acetilcolina como carnitina. Ejemplos de tales funciones incluyen movilización de moléculas intracelulares que participan en una ruta de transducción de señal, por ejemplo, fosfatidilinosito 4, 5-bisfosfato (PIP₂) o inositol 1, 4, 5-trifosfato (P₃), polarización de la membrana de plasma, producción o secreción de moléculas, alteración en la estructura de un componente celular, proliferación celular, migración celular, diferenciación celular, y supervivencia celular. Las células sensibles a un ligando flh84g5 preferentemente expresan un receptor células sensibles a un ligando flh84g5. Ejemplos de células sensibles a un ligando flh84g5 incluyen células neurales, por ejemplo, células del sistema nervioso central y células del sistema nervioso periférico (como neuronas simpáticas y parasimpáticas); células de musculatura lisa, por ejemplo, células de musculatura lisa en el tracto digestivo, el tracto urinario, los vasos sanguíneos, las vías respiratorias y los pulmones o el útero; células de musculatura cardíaca, por ejemplo, cardiomiocitos; y células glandulares como células glandulares exocrinas, por ejemplo, células glandulares pancreáticas, por ejemplo, células beta pancreáticas, células glandulares lagrimales, células glandulares del sudor, o células glandulares parótidas.

Dependiendo del tipo de célula, la respuesta obtenida por un ligando flh84g5 es diferente. Por ejemplo, en células neurales, un ligando flh84g5, como acetilcolina o moléculas similar a acetilcolina como carnitina, regula los canales del ión, y la señal neural para el ruido de fondo. La inhibición o la sobreestimulación de la actividad de las proteínas incluida en la ruta de señalización del ligando flh84g5 o la expresión incorrecta de un ligando flh84g5 puede dar lugar a la hipo o hiper-polarización de la membrana plasmática neural y a la señal neural perturbada para el ruido de fondo, que a su vez puede dar lugar a desordenes relacionados con el sistema nervioso. Ejemplos de desordenes relacionados con el sistema nervioso incluyen desordenes cognitivos, por ejemplo, desordenes de la memoria y aprendizaje, como amnesia, apraxia, agnosia, disnomia amnésica, desorientación espacial amnésica, síndrome Kluver-Bucy, pérdida de memoria relacionada con el Alzheimer (Eglen R.M. (1996) *Pharmacol. And Toxicol.* 78(2):59-68; Perry E.K. (1995) *Brain and Cognition* 28(3):240-58) y pérdida de habilidad para el aprendizaje; desordenes que afectan la consciencia, por ejemplo, alucinaciones visuales, alteraciones perceptuales, o delirio asociado con la demencia corporal Lewy; desordenes esquizo-efectivos (Dean B. (1996) *Mol. Psychiatry* 1(1):54-8), esquizofrenia con cambios de humor (Bymaster F.P. (1997) *J. Clin. Psychiatry* 58 (suppl.10):28-36; Yeomans J.S. (1995) *Neuropharmacol.* 12(1):3-16; Reimann D. (1994) *J. Psychiatric Res.* 28(3):195-210), enfermedad depresiva (primaria o secundaria); desordenes afectivos (Janowsky D.S. (1994) *Am. J. Med. Genetics* 54(4):335-44); desordenes del sueño (Kimura F. (1997) *J. Neurophysiol.* 77(2): 709-16), por ejemplo, anomalías en el sueño REM en pacientes que sufren, por ejemplo, depresiones Reimann D. (1994) *J. Psychiatric Res.* 38 Suppl. 1:15-25; Bourgin P. (1995) *Neuroreport* 6(3):415-23), insomnio, y anomalías en la temperatura corporal o depresión respiratoria durante el sueño (Suman S.L (1995) *Am. J. Physiol.* 269 (2 Pt 2): R308-17; Mallick B. N. (1997) *Brain Res.* 750 (1-2):311-7). Otros ejemplos de desordenes relacionados con el sistema nervioso incluyen desordenes relacionados con los mecanismos de generación de miedo, por ejemplo, miedo relacionado con el síndrome del intestino irritable (Mitch C.H. (1997) *J. Med. Chem.* 40 (4):538-46; Shannon H.E. (1997) *J. Pharmac. And Exp. Therapeutics* 281(2):884-94; Bouaziz H. (1995) *Anesthesia and Analgesia* 80(6):1140-4; o Guimaraes A.P. 81994) *Brain Res.* 647(2):220-30) o dolor en el pecho; desordenes

motrices (Monassi C.R. (1997) *Physiol. And Behav.* 62(1):53-9), por ejemplo, desordenes motrices relacionados con la enfermedad de Parkinson (Finn M. (1997) *Pharmacol. Biochem. & Behaviour* 57(1-2):243-9; Mayorga A.J. (1997) *Pharmacol. Biochem. & Behaviour* 56(2):273-9); desordenes alimenticios, por ejemplo, obesidad relacionada con la hipersecreción de insulina (Macario M. (1997) *J. Endocrinol. Invest.* 20(1):8-12; Premawardhana L. D. 81994) *Clin. Endocrinol.* 40(5):617-21); o desordenes con las bebidas, por ejemplo, polidipsia diabética (Murzi E. (1997) *Brain Res.* 752(1-2):184-8); Yang X. (1994) *Pharmacol. Biochem. & Behaviour* 49(1):1-6).

En la musculatura lisa, acetilcolina y molécula similar a acetilcolina como carnitina regula (por ejemplo, estimula o inhibe) la contracción. La inhibición o sobreestimulación de proteínas implicadas en la acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina señalando la ruta o expresión incorrecta de acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina pueden llevar a desordenes relacionados con la musculatura lisa como síndrome del intestino irritable, enfermedad diverticular, incontinencia urinaria, acalasia esofágica, o enfermedad de obstrucción de las vías respiratorias crónica.

En la musculatura cardiaca, la acetilcolina y molécula similar a acetilcolina como carnitina provoca una reducción en el ritmo del corazón y en la contractilidad cardiaca. La inhibición o sobreestimulación de la actividad de las proteínas implicadas en la acetilcolina y molécula similar a acetilcolina como carnitina señalando la ruta o expresión incorrecta de acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina pueden llevar a desordenes relacionados con la musculatura del corazón, como bradicardia patológica o taquicardia, arritmia, palpitación o fibrilación.

En glándulas como las glándulas exocrinas, señalando la ruta o expresión incorrecta de acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina regula la secreción de enzimas y hormonas, por ejemplo, en la glándula parótida señalando la ruta o expresión incorrecta de acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina pueden provoca la liberación de amilasa, y en el páncreas señalando la ruta o expresión incorrecta de acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina induce la liberación de enzimas digestivas como la insulina. La inhibición o sobreestimulación de la actividad de las proteínas implicadas en la acetilcolina y molécula similar a acetilcolina como carnitina señalando la ruta o expresión incorrecta de acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina pueden llevar a desordenes relacionados con las glándulas tales como xerostomia, diabetes mellitus.

En una realización preferente, las moléculas flh84g5 son capaces de modular la actividad de las proteínas G, así como el metabolismo de fosfatidilinositol y el movimiento en células sensibles al ligando flh84g5. Como aquí se emplea, una "proteína G" es una proteína que participa, como una señal secundaria, en una variedad de rutas de trasducción de señal intracelulares, por ejemplo, en la acetilcolina que señala la ruta principalmente por medio de metabolismo de fosfatidilinositol y movimiento. Las proteínas G representan una familia de proteínas heterotriméricas compuesta por subunidades α , β , e γ que se enlazan con nucleótidos de guanina. Estas proteínas normalmente están unidas con los receptores de superficie celular, es decir, los receptores que contienen siete segmentos de membrana. Tras el enlace del ligando con el GPCR, se transmite un cambio conformacional a la proteína G, que provoca que la subunidad α intercambie una molécula de enlace GDP por una molécula GTP y que se disocie de las subunidades β γ . La forma enlazada a GTP de una subunidad α normalmente funciona como una molécula moduladores del efector, llevando a la producción de segundos mensajeros, como cAMP (por ejemplo, mediante la activación de adenil ciclasa), diacilglicerol o inositos fosfatos. Se conocen más de 20 tipos diferentes de subunidades α en los humanos. Estas subunidades se asocian con un conjunto más pequeño de subunidades β e γ . Ejemplos de proteínas G de mamíferos incluyen Gi, Go, Gq y Gt. Las proteínas G se describen de manera extensa en Lodish *et al*, *Molecular Cell Biology*, (Scientific American Books, Inc., New York, N.Y., 1995).

Como aquí se emplea, "movimiento y metabolismo de fosfatidilinositol" se refiere a las moléculas implicadas en el movimiento y metabolismo de fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (PIP₂) así como las actividades de estas moléculas. PIP₂ es un fosfolípido encontrado en el folículo de la membrana de plasma. El enlace de acetilcolina con un receptor muscarínico activa la enzima de la membrana de plasma fosfolipasa C que a su vez hidroliza PIP₂ para producir 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5-trifosfato (P₃). Una vez formado P₃ puede difundirse a la superficie retícula endoplásmica donde se puede enlazar con un receptor IP₃, por ejemplo, una proteína de canal de calcio que contenga un punto de enlace IP₃. El enlace IP₃ puede provocar la apertura del canal, permitiendo que los iones de calcio se liberen en el citoplasma. El IP₃ también puede ser fosforilado por una quinasa específica para formar inositol 1, 4, 5-tetrafosfato (IP₄), una molécula que puede causar la entrada de calcio en el citoplasma desde un medio extracelular. IP₂ e IP₄ puede posteriormente hidrolizarse muy rápidamente con los productos inactivos inositol 1,4-bisfosfato (IP₂) e inositol 1, 3, 4-trifosfato, respectivamente. Estos productos inactivos puede reciclarse por la célula para sintetizar PIP₂. El otro segundo mensajero producido por la hidrólisis de PIP₂, es decir, 1,2-diacilglicerol (DAG), permanece en la membrana celular donde puede servir para activar la enzima proteína quinasa C. La proteína quinasa C se encuentra normalmente soluble en el citoplasma de la célula, pero tras un aumento en la concentración de calcio intracelular, esta enzima puede moverse a la membrana plásmica donde puede activarse por DAG. La activación de la proteína quinasa C en diferentes células da como resultado varias respuestas celulares como fosforilación o glucógeno cintaza, o la fosforilación de varios factores de transcripción, por ejemplo, NF-Kb. Los términos "actividad de fosfatidilinositol" como aquí se emplea, se refiere a la actividad de PIP₂ o uno de sus metabolitos.

Las moléculas de ácido nucleico flh84g5 se identificaron mediante un análisis apropiado de bibliotecas cADN (descritas con detalle en el Ejemplo I). La molécula de ácido nucleico flh84g5 de rata se identificó analizando una biblioteca de cADN de rata. Los clones positivos fueron secuenciados y las secuencias parciales se analizaron mediante comparación con secuencias en bases de datos de ácido nucleico: Este análisis indicó que la secuencias eran

ES 2 285 792 T3

homólogas a la familia muscarínica de receptores. Un clon de rata más largo fue posteriormente aislado y secuenciado. La molécula de ácido nucleico humana flh84g5 se identificó analizando una biblioteca cADN de cerebelo humano mediante el uso de sondas basadas en la secuencia de rata.

5 Debido a su habilidad para interactuar (por ejemplo, enlazarse) con un ligando flh84g5, las proteínas G y otras proteínas implicadas en la ruta de señalización del ligando flh84g5, el polipéptido flh84g5 también es un polipéptido que funciona en una ruta de señalización del ligando flh84g5.

10 La secuencia nucleótida del cADN humano flh84g5 y la secuencia de aminoácido prevista del polipéptido humano flh84g5 se muestran en la Figura 1 y en la SEC ID NO: 1 y 2, respectivamente. Un plásmido que contiene la completa secuencia de longitud de nucleótido codificando flh84g5 humano se depositó con ATCC® el 30 de septiembre de 1998 y se le asignó el Número de Adquisición 98902. Este depósito se mantendrá bajo los términos del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito para Microorganismos con fines de Procedimientos de Patentes. Este depósito se hizo meramente como una conveniencia para aquellos expertos en la técnica y no es un reconocimiento de que el depósito es necesario bajo 35 U.S.O 112.

La secuencia nucleótida del cADN de rata flh84g5 y la secuencia de aminoácido prevista del polipéptido de rata flh84g5 se muestran en la Figura 2 y en la SEC ID NOs: 4 y 5, respectivamente.

20 La secuencia nucleótida del cADN de ratón flh84g5 y la secuencia de aminoácido prevista del polipéptido de ratón flh84g5 se muestran en la Figura 3 y en la SEC ID NOs: 31 y 32, respectivamente.

El gen humano flh84g5, que es aproximadamente 2689 nucleótidos de longitud, codifica un polipéptido de completa longitud que tiene un peso molecular de aproximadamente 51.2 Kda y que tiene aproximadamente 445 residuos aminoácidos en longitud. El polipéptido humano flh84g5 se expresa al menos en el cerebro, en particular, en regiones del cerebro como el cerebelo, corteza cerebral, la médula, polo occipital, lóbulo frontal, el lóbulo temporal, el *putamen*, el *corpus callosum amígdala*, núcleo caudado, hipocampo, la sustancia negra, el núcleo subtalámico y el tálamo; médula espinal, placenta, pulmones, bazo, hígado, musculatura del esqueleto, riñón, y testículos. En base al análisis estructural, los residuos de aminoácido 34-59 (SEC ID NO:7), 73-91 (SEC ID NO:8), 109-130 (SEC ID NO:9), 152-174 (SEC ID NO:10), 197-219 (SEC ID NO:11), 360-380 (SEC ID NO:12), y 396-416 (SEC ID NO:13) comprenden dominios transmembránicos. Como aquí se emplea, el término “dominio transmembránico” se refiere al motivo de aminoácido estructural que incluye una hélice hidrofóbica que abarca la membrana de plasma. Un dominio transmembránico también incluye preferentemente una serie de residuos de serina, treonina y tirosina conservadas. Por ejemplo, los dominios transmembránicos entre residuos 109-130 (SEC ID NO:9), 197-219 (SEC ID NO:11), 360-380 (SEC ID NO:12), y 396-416 (SEC ID NO:13), contienen residuos de treonina y tirosina (localizados aproximadamente 1-2 giros helicoidales lejos de la superficie de membrana), que son importantes para el ligando, por ejemplo, acetilcolina y moléculas similar a acetilcolina como carnitina. Otros residuos importantes en los dominios transmembránicos incluye el residuo de aspartato conservado en el dominio transmembránico entre los residuos 109-130 (SEC ID NO:9) y el residuo de prolina conservado en el dominio transmembránico entre los residuos 152-174 (SEC ID NO:10), que también son importantes para el ligando, por ejemplo, un enlace con el ligando flh84g5. Un experto en la materia apreciará fácilmente que el inicio y el final del residuo de aminoácido recitado por varios dominios/fragmentos de flh84g5 se basan en el análisis estructural y que el real aminoácido de inicio/final para cada uno puede variar por unos pocos aminoácidos de los que aquí se identifican.

45 El gen de rata flh84g5, que es aproximadamente 3244 nucleótidos en longitud, codifica un polipéptido de completa longitud que tiene un peso molecular de aproximadamente 51.2 kDa y que al menos tiene aproximadamente 445 residuos de aminoácido en longitud. El polipéptido flh84g5 de rata se expresa en el cerebro. Los residuos de aminoácido 34-59 (SEC ID NO:14), 73-91 (SEC ID NO:15), 109-130 (SEC ID NO:16), 152-174 (SEC ID NO:17), 197-219 (SEC ID NO:18), 360-380 (SEC ID NO:19) y 396-416 (SEC ID NO:20) comprenden dominios transmembránicos.

50 El gen de rata flh84g5, que es aproximadamente 2218 nucleótidos en longitud, codifica un polipéptido de completa longitud que tiene un peso molecular de aproximadamente 41.6 kDa y que al menos tiene aproximadamente 362 residuos de aminoácido en longitud. El polipéptido flh84g5 de rata se expresa en el cerebro. Los residuos de aminoácido 1-8 (SEC ID NO:14), 26-47 (SEC ID NO:15), 69-91 (SEC ID NO:16), 114-136 (SEC ID NO:17), 277-297 (SEC ID NO:18) y 313-333 (SEC ID NO:19) comprenden dominios transmembránicos.

60 El gen de ratón parcial flh84g5, que es al menos aproximadamente 2218 nucleótidos en longitud, codifica un polipéptido de completa longitud que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 41.6 kDa y que al menos tiene al menos aproximadamente 362 residuos de aminoácido en longitud. El polipéptido flh84g5 de ratón se expresa en el cerebro. Los residuos de aminoácido 1-8 (SEC ID NO:34), 26-47 (SEC ID NO:35), 69-91 (SEC ID NO:36), 114-136 (SEC ID NO:37), 277-297 (SEC ID NO:38) y 313-333 (SEC ID NO:39) comprenden dominios transmembránicos.

65 El polipéptido flh84g5, una porción biológicamente activa o fragmento de polipéptido o una variante alélica del mismo puede tener una o más de las siguientes actividades flh84g5: 1) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) un ligando flh84g5, como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina; 2) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) una proteína G u otra proteína que naturalmente se enlaza con flh84g5; 3) puede modular la actividad de un canal de ión (por ejemplo, un canal de cloruro activado de calcio o un canal de potasio o calcio); 4) puede modular ión citosólico, por ejemplo, concentración de calcio; 5) puede modular la liberación de un

neurotransmisor, por ejemplo, acetilcolina o carnitina, de una neurona, por ejemplo, una neurona presináptica; 6) puede modular una respuesta de ligando flh84g5 en un ligando flh84g5 receptivo a las células (por ejemplo, una célula de músculo suave o una célula glandular) para, por ejemplo, afectar de manera beneficiosa al ligando flh84g5 receptivo a las células, por ejemplo, una neurona; 7) puede ser un ligando de señal que se enlaza por medio de movimiento fosfatidilinositol; y 8) puede modular, por ejemplo, activar o inhibir, la actividad C de fosfolipasa.

Varios aspectos de la invención se describen con mayor detalle en las siguientes subsecciones:

I. Moléculas de Ácido Nucleico Aisladas

Un aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican flh84g5 o porciones biológicamente activas del mismo, así como fragmentos de ácido nucleico suficientes para usar como sondas de hibridización para identificar ácido nucleico que codifica flh84g5 (por ejemplo mARN flh84g5). Como aquí se emplea, el término “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADN o ADN genómico) y moléculas ARN (por ejemplo, mARN) y análogos del ADN y ARN generados mediante el uso de análogos nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de único trenzado o de doble trenzado, pero preferentemente es ADN de doble trenzado. Una molécula de ácido nucleico “aislada” es aquella que está separada de la moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferentemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de secuencias que naturalmente flanquean el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada flh84g5 puede contener menos que aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias nucleótidas que naturalmente flanquean la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico (por ejemplo, una célula hipocámpal). Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, como una molécula cADN, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente.

Una molécula de ácido nucleicos de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleótida SEC ID NO:1, 4, o 31, o una porción de la misma, puede aislarse mediante técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia aquí descrita. Por ejemplo, un cADN flh84g5 humano puede aislarse de un biblioteca de hipocampo humano usando toda o una porción de SEC ID NO:1, 4, o 31 como una sonda de hibridización y técnicas estándar de hibridización (por ejemplo, como se describe en Sambrook, J., Fritsh, E.F. y Maniatis, *T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, una molécula de ácido nucleico que comprende todo y una porción de SEC ID NO:1, 4, o 31 puede aislarse por la reacción de cadena polimerasa usando imprimadores de oligonucleótidos designados bajo la secuencia de SEC ID NO:1, 4, o 31. Por ejemplo, mARN puede aislarse de células del cerebro normales (por ejemplo, mediante el procedimiento de extracción de guanidina-tiocianato de Chirgwin *et al.* (1979) *Biochemistry* 18: 5294-5299) y se puede preparar cADN usando transcriptasa inversa (por ejemplo, Moloney MLV transcriptasa inversa, disponible en Gibco/BRL, Bethesda, MD; o AMV transcriptasa inversa, disponible en Seikagaku America Inc., St. Petersburg, FL). Los imprimadores sintéticos de oligonucleótidos para amplificación PCR pueden diseñarse en base a la secuencia nucleótida mostrada en SEC ID NO:1, 4, o 31. Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando cADN o, de manera alternativa, ADN genómico, como un imprimador oligonucleótido de muestra y apropiado para técnicas de amplificación estándar PCR. El ácido nucleico amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizado por el análisis de secuencia ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia nucleótida flh84g5 puede prepararse mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, empleando un sintetizador de ADN automatizado.

En una realización preferente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende la secuencia nucleótida mostrada en SEC ID NO:1, 4, o 31.

La secuencia de SEC ID NO:1 corresponde al cADN flh84g5 humano. Este cADN comprende secuencias que codifican el polipéptido humano flh84g5 (es decir “la región codificadora”, de nucleótidos 291 a 1628 de SEC ID NO:1), así como secuencias no traducidas 5' (nucleótidos 1 a 290 de SEC ID NO:1) y secuencias no traducidas 3' (nucleótidos 1629 a 2689 de SEC ID NO:1). De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico puede constar sólo de la región codificadora de SEC ID NO:1 (por ejemplo, nucleótidos 291 a 1628 de SEC ID NO:1, mostrados por separado como SEC ID NO:3). La secuencia de SEC ID NO:4 corresponde con el cADN flh84g5 de rata. Este cADN consta de secuencias que codifican el polipéptido de rata flh84g5 (es decir, “la región codificadora”, de nucleótidos 778 a 2112 de SEC ID NO:4), así como secuencias no traducidas 5' (nucleótidos 1 a 777 de SEC ID NO:4) y secuencias no traducidas 3' (nucleótidos 2113 a 3244 de SEC: 4). De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico puede constar sólo de la región codificadora de SEC ID NO:4 (por ejemplo, nucleótidos 778 a 2112 de SEC ID NO:4, mostrados por separado como SEC ID NO:6). La secuencia de SEC ID NO:31 corresponde con el cADN flh84g5 de ratón parcial. Este cADN consta de secuencias que codifican el polipéptido de ratón parcial flh84g5 (es decir, “la región codificadora”, de nucleótidos 1 a 1089 de SEC ID NO:31) y secuencias no traducidas 3' (nucleótidos 1090 a 2218 de SEC:31). De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico puede constar sólo de la región parcial codificadora de SEC ID NO:31 (por ejemplo, nucleótidos 1 a 1089 mostrados por separado como SEC ID NO:33).

ES 2 285 792 T3

En otra realización preferente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende molécula de ácido nucleico que es complementaria de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO:1, 4, o 31.

Una molécula de ácido nucleico que es complementaria con la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO:1, 4, o 31 es aquella que sea lo suficientemente complementaria con la secuencia nucleótida mostrada en la flh84g5 que pueda hibridizar con la secuencia nucleótida mostrada en SEC ID NO: 1, 4 o 31, respectivamente, formando de este modo un dúplex estable.

En otra realización preferente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una secuencia nucleótida que es al menos 95% idéntica a la secuencia nucleótida mostrada en SEC ID NO: 1, 4 o 31. Preferentemente, tales moléculas de ácido nucleico codifican variantes alélicas funcionalmente activas o inactivas de flh84g5. En una realización adicional preferente, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia nucleótida mostrada en SEC ID NO:1, 4, o 31 o la secuencia nucleótida de la inserción de ADN del plásmido depositado con ATCC® y el Número de Adquisición 98902, o una porción de cualquiera de estas secuencias nucleótidas.

Con fines ejemplares, una molécula de ácido nucleico puede comprender sólo una porción de la región codificadora SEC ID NO: 1, 4 o 31, por ejemplo, un fragmento que pueda usarse como una sonda o imprimador o un fragmento que codifique una porción biológicamente activa de flh84g5. La secuencia nucleótida determinada por la clonación del gen flh84g5 de un mamífero permite la generación de sondas e imprimadores diseñados para uso de identificación y/o clonación de homólogos flh84g5 en otros tipos de células, por ejemplo, de otros tejidos, así como homólogos flh84g5 de otros mamíferos. La sonda o imprimador normalmente consta de una región de secuencia nucleótida que hibridiza bajo condiciones astringentes normalmente al menos aproximadamente 12, preferentemente sobre 25, más preferentemente sobre 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de SEC ID NO: 1, 4 o 31, o mutantes que ocurran naturalmente de los mismos. Los imprimadores basados en la secuencia nucleótida en SEC ID NO: 1, 4 o 31 puede usarse en reacciones PCR para clonar homólogas flh84g5. Las sondas basadas en la secuencia nucleótida flh84g5 pueden usarse para detectar las secuencias transcriptoras o genómicas que codifican los mismos polipéptidos homólogos. La sonda puede además comprender un grupo etiquetado unido, por ejemplo, el grupo de etiqueta puede ser un radioisotopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de enzima. Tales sondas puede emplearse como una parte del kit de test de diagnóstico para la identificación de células o tejido que expresa de manera incorrecta un polipéptido flh84g5, midiendo un nivel de un ácido nucleico que codifica flh84g5 en una muestra de células de un sujeto por ejemplo, detectando niveles mRNA flh84g5 o determinando si el gen genómico flh84g5 has sido mutado o eliminado.

En una realización, la moléculas de ácido nucleico de la invención codifica un polipéptido o porción del mismo que incluye una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntico a la secuencia de aminoácido entera de SEC ID NO: 2, 5, o 32 de tal modo que el polipéptido o porción del mismo mantiene la habilidad para modular una respuesta al ligando flh84g5 en una células sensible al ligando flh84g5 (por ejemplo, variantes que se dan de manera natural de los polipéptidos de rata y humano flh84g5 aquí descritos).

Porciones de polipéptidos codificados por la molécula de ácido nucleico flh84g5 de la invención son preferentemente porciones biológicamente activas del polipéptido flh84g5. Como aquí se emplea, el término "porción biológicamente activa del polipéptido flh84g5" pretende incluir una porción, por ejemplo, un dominio/motivo, de flh84g5 que tiene una o más de las siguientes actividades flh84g5: 1) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) un ligando flh84g5, como acetilcolina o una molécula similar a acetilcolina como carnitina; 2) puede interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) una proteína G u otra proteína que naturalmente se enlaza con flh84g5; 3) puede modular la actividad de un canal de ión (por ejemplo, un canal de cloruro activado de calcio o un canal de potasio o calcio); 4) puede modular ión citosólico, por ejemplo, concentración de calcio; 5) puede modular la liberación de un neurotransmisor, por ejemplo, acetilcolina o carnitina, de una neurona, por ejemplo, una neurona presináptica; 6) puede modular una respuesta de ligando flh84g5 en un ligando flh84g5 receptivo a las células (por ejemplo, una célula de músculo suave o una célula glandular) para, por ejemplo, afectar de manera beneficiosa al ligando flh84g5 receptivo a las células, por ejemplo, una neurona; 7) puede ser un ligando de señal que se enlaza por medio de movimiento fosfatidilinositol; y 8) puede modular, por ejemplo, activar o inhibir, la actividad C de fosfolipasa.

Ensayos de enlace estándar, por ejemplo, inmunoprecipitación y ensayos de levadura dos híbrida como aquí se describen, pueden llevarse a cabo para determinar la habilidad de un polipéptido flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo para interactuar (por ejemplo, enlazarse) con una pareja de enlace como una proteína G. Para determinar si un polipéptido flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo puede modular una respuesta al ligando flh84g5 en una célula sensible al ligando flh84g5, tales células pueden transfectarse con un constructo que lleve la sobreexpresión del ligando flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo. Métodos para la preparación de células sensibles al ligando flh84g5, por ejemplo células de musculatura lisa o extractos de tales células son conocidos en la técnica y se describen en Glukhova *et al.* (1987) *Tissue Cell* 19 (5):657-63, Childs *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (32):22853-9, y White *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271 (25):15008-17. Las células pueden posteriormente ser tratadas con un ligando flh84g5, y un efecto biológico de un ligando flh84g5 en la células, como movimiento fosfatidilinositol o concentración de calcio citosólico pueden medirse usando métodos conocidos en la técnica (ver Hartzell H.C. *et al.*, (1998) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 52:165-247.). De manera alternativa, animales transgénicos, por ejemplo, ratones que sobreexpresen un polipéptido flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo pueden usarse. Los tejidos de tales animales puede obtenerse y tratarse con un ligando flh84g5. Por ejemplo, métodos para la preparación de conjuntos de fibras musculares de piel de detergente son conocidos en la técnica (Strauss *et al.* (1992) *Am. J. Physiol.* 262:1437-45). La capacidad de contraerse de estos tejidos en respuesta a un ligando flh84g5 puede

determinarse usando, por ejemplo, medidas de fuerza isométrica como se describe en Strauss *et al.*, *supra*. De modo similar, para determinar si un polipéptido flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo puede modular una respuesta al ligando flh84g5 en una célula sensible al ligando flh84g5, como una célula glandular, células glandulares, por ejemplo, células glandulares parótidas crecidas en cultivo de tejido, pueden transfectarse con un constructo que lleve la sobreexpresión del ligando flh84g5 o una porción biológicamente activa del mismo. Las células pueden posteriormente ser tratadas con un ligando flh84g5, y el efecto del ligando flh84g5 sobre la secreción de amilasa de tales células puede determinarse usando, por ejemplo, un ensayo enzimático con un sustrato etiquetado. Los ensayos preferentes para la actividad flh84g5 se basarán en el movimiento fosfatidilinositol como aquellos desarrollados para las clases de receptores M1, M3 y M5 (ver E. Watson *et al.* *The G Protein Linked Receptor: Facts Book* (Academic Press, Boston, MA, 1994).

En una realización, la porción biológicamente activa de flh84g5 comprende un dominio transmembránico. Preferentemente, dominio transmembránico está codificado por una molécula de ácido nucleico derivada de un humano y consta de residuos de aminoácidos 34-59, 109-130, 152-174, 197-219, o 396-416 de SEC ID NO:2 que se muestran como secuencias separadas designadas SEC ID Nos: 7, 9, 10, 11 y 13, respectivamente, o los dominios transmembránicos de rata (es decir, residuos de aminoácido 34-59, 109-130, 152-174, 197-219, o 396-416 de SEC ID NO:5 que se muestran como secuencias separadas designadas SEC ID Nos: 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 respectivamente o, residuos de aminoácido 1-8, 24-67, 69-91, 114-136, 277-297, 0 313-333 de SEC ID NO:32 que se muestran como secuencias separadas designadas SEC ID Nos: 34, 35, 36, 37, 38, o 39, respectivamente). Más preferentemente, el dominio transmembránico codificado por la molécula de ácido nucleico comprende residuos de aminoácido 360-380 de SEC ID NO:2 que se muestra como una secuencia separada designada SEC ID NO:12, o residuos de aminoácido 73-91 de SEC ID NO:2 que se muestra como una secuencia separada designada SEC ID NO:8. En una realización preferente, la porción biológicamente activa del polipéptido que incluye el dominio transmembránico puede modular la actividad de la proteína G u otra pareja de enlace en una célula y/o modula una respuesta de ligando flh84g5 en una célula sensible al ligando flh84g5, por ejemplo, una célula del cerebro, para afectar de este modo de manera beneficiosa a la célula. En una realización preferente, la porción biológicamente activa comprende un dominio transmembránico del flh84g5 humano como se representa por los residuos de aminoácido 34-59 (SEC ID NO: 7), 73-91 (SEC ID NO: 8), 109-130 (SEC ID NO: 9), 152-174 (SEC ID NO: 10), 197-219 (SEC ID NO: 11), 360-380 (SEC ID NO: 12), y 396-416 (SEC ID NO: 13), un dominio transmembránico de flh84g5 de rata de completa longitud como se representa por los residuos de aminoácido 34-59 (SEC ID NO: 14), 73-91 (SEC ID NO: 15), 109-130 (SEC ID NO: 16), 152-174 (SEC ID NO: 17), 197-219 (SEC ID NO: 18), 360-380 (SEC ID NO: 19), y 396-416 (SEC ID NO: 20), o un dominio transmembránico de ratón parcial flh84g5 como se representa por los residuos de aminoácido 1-8 (SEC ID NO: 34), 26-47 (SEC ID NO: 35), 69-91 (SEC ID NO: 36), 114-136 (SEC ID NO: 37), 277-297 (SEC ID NO: 38) y 313-333 (SEC ID NO: 39). Los fragmentos adicionales de ácido nucleico que codifican las porciones biológicamente activas de como se representan por los residuos de aminoácido 34-59 (SEC ID NO: 14), 73-91 (SEC ID NO: 15), 109-130 (SEC ID NO: 16), 152-174 (SEC ID NO: 17), 197-219 (SEC ID NO: 18), 360-380 (SEC ID NO: 19), y 396-416 (SEC ID NO: 20) pueden prepararse mediante el aislamiento de una porción de SEC ID NO: 1, 4 o 31, expresando la porción codificada de polipéptido o péptido flh84g5 (por ejemplo, por expresión recombinante *in vitro*) y analizando la actividad de expresando la porción codificada de polipéptido o péptido flh84g5.

La invención además comprende las moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO: 1, 4 o 31 (y porciones de la misma) debido a la degeneración del código genético y por lo tanto codifican el mismo polipéptido flh84g5 como el codificado por la secuencia nucleótida mostrada en SEC ID NO: 1, 4 o 31. En otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene la secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene una secuencia aminoácido mostrada en SEC ID NO: 2, 5 y 32.

Además de la secuencia nucleótida flh84g5 mostrada en SEC ID NO: 1, 4 o 31, aquellos expertos en la técnica apreciarán que los polimorfismos de la secuencia de ADN que provocan cambios en la secuencia de aminoácido flh84g5 pueden existir dentro de una población (por ejemplo, la población humana). Tal polimorfismo genético en el gen flh84g5 puede existir entre individuos dentro de una población debido a una variación alélica natural. Como aquí se emplean, los términos “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido flh84g5, preferentemente un polipéptido flh84g5 de un mamífero. Tales variaciones alélicas incluyen tanto variantes alélicas activas como no activas o variantes alélicas de actividad reducida, los dos últimos tipos generalmente dando lugar a desórdenes patológicos. Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos flh84g5 de otras especies tienen una secuencia de ácido nucleico que difiere de la secuencia humana de SEC ID NO:1. Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a las variantes alélicas naturales y a los homólogos no humanos de cADN flh84g5 humano de la invención pueden aislarse basándose en su homología con el ácido nucleico flh84g5 humano aquí descrito empleando el cADN humano, o una porción del mismo, como una sonda de hibridización de acuerdo con las técnicas estándar de hibridización bajo condiciones rigurosas de hibridización.

Como aquí se emplea, el término “hibridización bajo condiciones rigurosas” pretende describir las condiciones para hibridización y lavado bajo las cuales las secuencias nucleótidas al menos 60% homólogas entre sí normalmente permanecen hibridizadas entre sí. Preferentemente, las condiciones son tales que las secuencias al menos aproximadamente 65%, más preferentemente al menos aproximadamente 70%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75% o más homólogas entre sí normalmente permanecen hibridizadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas por aquellos expertos en la técnica y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferente aunque no limitativo condiciones rigurosas

ES 2 285 792 T3

rosas de hibridización son hibridización por 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SCC) en aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0.2 X SCC, 0.1% SDS en 50-65°C. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención que hibridiza bajo condiciones rigurosas a la secuencia de SEC ID NO:1 corresponde con la molécula de ácido nucleico que se da de manera natural. Como aquí se emplea, una molécula de ácido nucleico “que se da de manera natural” se refiere a una molécula de ADN o ARN que tiene una secuencia nucleótida que se da u ocurre en la naturaleza (por ejemplo, codifica un polipéptido natural). En una realización, el ácido nucleico codifica un flh84g5 natural humano.

Además de las variantes alélicas de la secuencia flh84g5 que ocurren de manera natural que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará que se pueden introducir cambios por mutación en la secuencia nucleótida de SEC ID NO: 1, 4 o 31, provocando de este modo cambios en la secuencia de aminoácido del polipéptido flh84g5 codificado, sin alterar la habilidad funcional del polipéptido flh84g5. Por ejemplo, las sustituciones nucleótidas que provocan las sustituciones de aminoácido y residuos de aminoácido no esenciales pueden realizarse en la secuencia de SEC ID NO: 1, 4, o 31. Un residuo de aminoácido no esencial es un residuo que puede alterarse de la secuencia de tipo salvaje de flh84g5 (por ejemplo, la secuencia de SEC ID NO: 2, 5, o 32) sin alterar la actividad de flh84g5, donde un residuo de aminoácido esencial es necesario para la actividad flh84g5. Por ejemplo, los residuos aminoácidos conservados, por ejemplo, aspartatos, prolina, treoninas y tirosinas, en los dominios transmembránicos de flh84g5 son más importantes para enlazarse con un ligando flh84g5 y por lo tanto son residuos esenciales de flh84g5. Otros residuos de aminoácido, sin embargo, (por ejemplo, aquellas que no están conservadas o semi-conservadas en el dominio transmembránico) pueden no ser esenciales para la actividad y por lo tanto son más dóciles de alteración sin alterar la actividad flh84g5.

Como consecuencia, otro aspecto de la invención pertenece a moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos flh84g5 que contienen cambios en residuos de aminoácido que no son esenciales para la actividad flh84g5. Tales polipéptidos flh84g5 difieren en secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, 5 y 32 y retienen al menos una de las actividades flh84g5 aquí descritas y comprenden una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácido al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácido SEC ID NO: 2, 5 o 32.

Para determinar la identidad de porcentaje de dos secuencias de aminoácido o dos secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, SEC ID NO: 2, 5 o 32 y una forma mutante de la misma), las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, se introducen huecos en uno o ambos de un primero y segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico para alineación óptima y secuencias no homólogas pueden ignorarse para fines comparativos). En una realización, la longitud de una secuencia referencial alineada para fines comparativos es al menos 30%, preferentemente al menos 40%, más preferentemente al menos 50%, incluso más preferentemente al menos 60%, e incluso más preferentemente al menos 70%, 80%, o 90% de la longitud de la secuencia de referencia (por ejemplo, cuando se alinean una segunda secuencia con la secuencia de aminoácido flh84g5 de SEC ID NO: 2, 5, o 32, que tiene 177 residuos de aminoácido, al menos 80, preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 120, incluso más preferentemente al menos 140, e incluso más preferentemente al menos 150, 160 o 170 residuos de aminoácido se alinean). Los residuos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácido correspondientes o posiciones correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia se ocupa por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, a continuación las moléculas son idénticas en esa posición (como aquí se emplea “identidad” de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a “homología” de aminoácido o ácido nucleico). La identidad de porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de las secuencias y determinación de la identidad de porcentaje entre dos secuencias puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. En una realización, la identidad de porcentaje entre dos secuencias de aminoácido se determina usando el algoritmo Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete software GCG (disponible en <http://www.geg.com>), usando bien una matriz 62 Blossom o una matriz PAM250, y peso de guceo de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra realización, la identidad de porcentaje entre las secuencias nucleótidas se determina usando el GAP en el paquete software GCG (disponible en <http://www.geg.com>), usando un NWSgapdna. La matriz CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra realización, la identidad de porcentaje entre dos secuencias de aminoácido se determina usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una mesa de residuo de peso PAM120, un hueco de longitud oculta de 12 y un hueco oculto de 4.

Las secuencias de proteína y ácido nucleico de la presente invención pueden además usarse como una “secuencia pregunta” para llevar a cabo una búsqueda contra las bases de datos del público para, por ejemplo, identificar otros miembro de la familia o secuenciar relacionadas. Tales búsquedas pueden llevarse a cabo usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de onda = 12 para obtener secuencias nucleótidas homólogas para moléculas de ácido nucleico flh84g5 de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 15, longitud de onda = 3 para obtener secuencias de aminoácido homólogas para las moléculas de proteína flh84g5 de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para fines comparativos, puede utilizarse BLAST con huecos como se describe en Altschul, *et al.* (1997) *Nucleic Acids*

ES 2 285 792 T3

Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y BLAST con huecos, pueden emplearse los parámetros de fallo de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido flh84g5 homólogo al polipéptido de SEC ID NO: 2, 5 o 32 puede crearse introduciendo uno o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia nucleótida SEC ID NO: 1, 4, o 31, respectivamente, de tal modo que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido se introduzcan en el polipéptido codificado. Las mutaciones pueden introducirse en SEC ID NO: 1, 4, o 31 mediante técnicas estándar, como mutagénesis dirigida al punto y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, las sustituciones de aminoácido conservadores se realizan en uno o más residuos previstos no esenciales de aminoácido. Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan), cadenas laterales de rama beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido previsto no esencial en flh84g5 es preferentemente sustituido por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. De manera alternativa, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse de manera arbitraria a lo largo de todo o parte de la secuencia codificadora de flh84g5, como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden analizarse para una actividad flh84g5 aquí descrita para identificar mutantes que retienen actividad flh84g5. Tras la mutagénesis de SEC ID NO: 1, 4 o 31, el polipéptido codificado puede expresarse de manera recombinante (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3 y 4) y la actividad del polipéptido puede determinarse usando, por ejemplo, ensayos aquí descritos.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos flh84g5 descritos anteriormente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico antisentido con las mismas. Un ácido nucleico “antisentido” comprende una secuencia nucleótida que es complementaria con un ácido nucleico “sentido” que codifica un polipéptido, por ejemplo, complementario con el trenzado codificador de la molécula cADN de doble trenzado complementaria con una secuencia mARN. Como consecuencia, un ácido nucleico antisentido puede unirse por medio de hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a un trenzado completo de flh84g5, o sólo a una parte del mismo. En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido a una “región codificadora” del trenzado codificador de una secuencia nucleótida que codifica flh84g5.

El término “región codificadora” se refiere a la región de la secuencia nucleótida que comprende codones que se traducen a residuos de aminoácidos, por ejemplo, la completa región codificadora de SEC ID NO: 1 comprende nucleótidos 291 a 1628 (mostrados por separado como SEC ID NO:3) y la región codificadora de SEC ID NO:4 comprende nucleótidos 778 a 2112 (mostrados por separado como SEC ID NO:6). En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido para una “región no codificadora” del trenzado codificador de una secuencia nucleótida que codifica flh84g5. El término “región no codificadora” se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificadora que no se traduce a aminoácidos (es decir, también referidas como regiones no traducidas 5' y 3').

Dadas las secuencias trenzadas codificadoras que codifican flh84g5 aquí descritas (es decir, SEC ID NOS: 1, 4, o 31), ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden diseñarse de acuerdo con las normas de emparejamiento de base de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico puede ser complementaria con toda la región codificadora de flh84g5 mARN, pero preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido con sólo una parte de la región codificadora o no codificadora de flh84g5 mARN. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario con la región que rodea el punto de inicio de translación de flh84g5 mARN. Un oligonucleótido antisentido puede tener por ejemplo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido puede construirse usando síntesis química y reacciones de litigación enzimática mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos que ocurren de manera natural o nucleótidos modificados de varias formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos sentido y antisentido, por ejemplo, derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos por acridina pueden emplearse. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-clorouracil, 5-iodouracil, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetilo) uracil, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracil, dihirouracil, beta-D-galctosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-D-mannosilqueosina, 5'-metilaminometiluracil, 5-metoxilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracil, 5-metoxiaminometil-2-tiouracil, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracil, 5-metoxiuracil, 2-metilthioqueosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracil, 2-tiouracil, 4-tiouracil, 5-metiluracil, uracil-5-ácido oxiacético metilester, uracil-5-ácido oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropilo) uracil, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. De manera alternativa, el ácido nucleico antisentido puede introducirse biológicamente usando un vector de expresión en el cual se haya subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, ARN transcrito del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido con un ácido nucleico objetivo de interés, descrito a continuación en la siguiente subsección).

La molécula de ácido nucleico antisentido se administra normalmente a un sujeto o se genera *in situ* de tal modo que hibridice con o se enlace con mARN celular y/o ADN genómico que codifica un polipéptido flh84g5 para inhibir de este modo la expresión del polipéptido, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o translación. La hibridización puede ser por complementariedad de nucleótido convencional para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se enlaza con dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en la ranura principal de la hélice doble. Un ejemplo de una ruta de administración de una molécula de ácido nucleico de la invención incluye inyección directa en la zona del tejido. De manera alternativa, una molécula de ácido nucleico antisentido puede modificarse para las células objetivo seleccionadas y luego administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para administración sistémica, una molécula antisentido puede modificarse de tal modo que se enlace específicamente con un receptor o antígeno expresado sobre una superficie de célula seleccionada, por ejemplo, por unión de la molécula de ácido nucleico antisentido con un péptido o anticuerpo que se enlace con un receptor o antígeno de superficie celular. La molécula de ácido nucleico antisentido también puede enviarse a células empleando los vectores aquí descritos. Para conseguir suficientes concentraciones intracelulares de las moléculas antisentido, los constructos del vector en los cuales la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor fuerte pol II o pol III son preferentes.

Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos específicos de doble trenzado con ARN complementario en el que, en oposición a las usuales β -unidades, los trenzados corren paralelos entre sí (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede constar un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6131-6148) o un análogo quimérico ARN-ADN (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser un ribozima. Los ribozimas son moléculas catalíticas de ARN con actividad ribonucleasa que son capaces de partir un ácido nucleico de trenzado sencillo, como un mARN, con las cuales tienen una región complementaria. Por lo tanto, ribozimas (por ejemplo, ribozimas con cabella de martillo (descritos en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) pueden emplearse APRA partir catalíticamente transcripciones mARN flh84g5 para inhibir de este modo la translación de mARN flh84g5. Un ribozima que tienen especificidad para un ácido nucleico que codifica flh84g5 puede diseñarse sobre la secuencia nucleótida de un cADN flh84g5 aquí descrito (es decir SEC ID NO:1, 4, o 31). Por ejemplo, un derivado de un *Tetrahymena* L-19 IVS RNA puede construirse en el cual la secuencia nucleótida de la zona activa sea complementaria con la secuencia nucleótida a ser partida en un mARN que codifica flh84g5. Ver, por ejemplo, Cech *et al.* Patente US Número 4,987,071 y Cech *et al.* Patente US Número 5,116,742. De manera alternativa, mARN flh84g5 puede usarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad ribonucleasa específica de un conjunto de moléculas ARN. Ver, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak J. W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

De manera alternativa, la expresión de gen flh84g5 puede ser inhibida por las secuencias nucleótidas de selección de objetivo complementarias con la región reguladora del flh84g5 (por ejemplo, promotor y/o aumentador flh84g5) para formar triples estructuras helicoidales que previenen la transcripción del gen flh84g5 en las células objetivo. Ver generalmente, Helene, C. 81991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84, C. *et al.* (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 660:27-36; y Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

II. Vectores de Expresión Recombinante y Células Huésped

Otro aspecto de la invención pertenece a vectores, preferentemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica flh84g5 (o una porción del mismo). Como aquí se emplea, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un curva de ADN de doble trenzado circular en la cual segmentos de ADN adicionales pueden ligarse. Otro tipo de vector es un vector viral, donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de réplicas autónomas en una célula huésped en la cual ellos se introducen (por ejemplo, vectores bacteriales que tienen un origen bacterial de réplica o vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de la célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los cuales están operativamente unidos. Tales vectores se refieren aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante puede usarse de manera intercambiable como el plásmidos en la forma más comúnmente usada del vector. Sin embargo, esta invención pretende incluir tales formas de vectores de expresión, como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de réplica defectiva, adenovirus y virus asociados a adeno), que sirven con funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en la base a las células huésped que se usarán para la expresión. Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia nucleótida de interés está unida a la secuencia reguladora de tal manera que permita la expresión de la secuencia reguladora (por ejemplo, un sistema de transcripción/translación *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, aumentadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press,

ES 2 285 792 T3

San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen expresión directa de una secuencia nucleotídica en muchos tipos de célula huésped y aquellas que dirigen expresión de la secuencia nucleotídica sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Aquellos especializados en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de muchos factores como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención puede introducirse en células huésped para producir de este modo polipéptido o péptidos, incluyendo polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos aquí descritos (por ejemplo, polipéptidos flh84g5, formas mutantes de flh84g5, polipéptidos de fusión y similares).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de flh84g5 en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, flh84g5 puede expresarse en células bacteriales como *E. Coli*, células de insecto (por ejemplo, usando vectores de expresión baculovirus) células de levadura o células de mamífero. Células huésped adecuadas se discuten a continuación en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). De manera alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y trasladarse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras promotoras T7 y polimerasa T7.

La expresión de polipéptidos en procariotas se lleva a menudo a cabo en *E. Coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o provocables que dirigen la expresión de los polipéptidos de fusión o no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a polipéptido aquí codificado, normalmente al término del amino del polipéptido recombinante. Tales vectores de fusión normalmente tienen tres fines: 1) aumentar la expresión de polipéptido recombinante; 2) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y 3) ayudar a la purificación del polipéptido recombinante actuando como un ligando en purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, un punto de partición proteolítica se introduce en la unión de la molécula de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante de la molécula de fusión seguido por la purificación del polipéptido de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognado, incluyen Factor Xa, trombina y enterocinasas. Típicos vectores de expresión fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1998) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatona S-transferasa (GST), proteína de enlace maltosa E, o proteína A, respectivamente, con el polipéptido recombinante objetivo. En una realización, la secuencia codificadora de flh84g5 se clona en el vector de expresión pGEX para crear un vector que codifique un polipéptido de fusión que comprenda, desde la terminal N a la terminal C, partición GST-trombina punto flh84g5. El polipéptido de fusión puede purificarse mediante cromatografía de afinidad usando resina glutatona-agarosa. flh84g5 recombinante no fusionado con GST puede recuperarse de la partición del polipéptido de fusión con trombina.

Ejemplos de vectores adecuados de expresión *E. Coli* de no fusión incluyen pTrc (Amann *et al.*, (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11 d (Studier *et al.*, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60- 89). La expresión de gen objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de polimerasa ARN de un promotor híbrido de fusión *trp-lac*. La expresión de gen objetivo del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7 *gn10-lac* provocado por una polimerasa ARN viral coexpresada (T7 *gn1*). Esta polimerasa viral es suministrada por tensiones del huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un prófago residente λ que esconde un gen T7 *gn1* bajo el control transcripcional del promotor *lacUV 5*.

Una estrategia para maximizar la expresión de polipéptido recombinante en *E. Coli* es expresar el polipéptido en una bacteria huésped con una capacidad dañada para partir proteolíticamente el polipéptido recombinante (Gottesman, S. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Otra estrategia consiste en alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que va a insertarse en un vector de expresión para que los codones individuales de cada aminoácido sean aquellos que preferentemente se usan en *E. Coli* (Wada *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Tal alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN.

En otra realización, el vector de expresión flh84g5 es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari, *et al.*, (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987) *Gene* 54:113-123) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

De manera alternativa, flh84g5 puede expresarse en células de insecto usando, por ejemplo, vectores de expresión baculovirus. Los vectores baculovirus disponibles para la expresión de polipéptidos en células de insecto cultivados (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.*, (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

En otra realización, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamíferos. Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen p CDM 8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) y p MTC2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Cuando se usan en células de mamíferos, las funciones de control de vectores de expresión a menudo se facilitan por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente usados se derivan de polyoma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Simian Virus 40. Para otros sistemas de expresión adecuadas tanto para células procarióticas como eucarióticas ver capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsh, E.F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

ES 2 285 792 T3

En otra realización, el vector de expresión recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, elementos reguladores específicos de tejido se usan para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido se usan son conocidos por aquellos especializados en la técnica. Ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico del hígado; Pinkert *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), en promotores particulares de receptores celulares T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), promotores específicos de neurona (por ejemplo, el promotor neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund *et al.*, (1985) *Science* 230:912-916), y promotores específicos de mamíferos (por ejemplo, promotor de suero de leche; Patente US Número 4,873,316 y Publicación de Solicitud Europea No. 264,166). Los promotores regulados en desarrollo también se incluyen, por ejemplo, promotores de murina *hox* (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249:374-379) y el promotor α -fetoproteína (Camps y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

La invención además proporciona un vector de expresión recombinante que consta de una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está unida operativamente con una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (por transcripción de la molécula ADN) de una molécula ARN que es antisentido a mRNA *flh84g5*. Pueden elegirse Las secuencias operativamente reguladoras unidas al ácido nucleico clonado en orientación antisentido que dirijan la expresión continua de la molécula antisentido ARN en una variedad de tipos de células, por ejemplo promotores y/o potenciadores virales, o pueden elegirse secuencias reguladoras que dirijan expresión específica de tejido constituyentes o de tipo de célula de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede tener la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado donde los ácidos nucleicos se producen bajo el control de una región reguladora de elevada eficiencia, cuya actividad puede estar determinada por el tipo de célula en la cual el vector se introduce. Para una discusión de la regulación de expresión de gen usando genes antisentido ver Weintraub, H. *et al.*, ARN antisentido como una herramienta molecular para análisis genético, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. (1) 1986.

Otro aspecto de la invención pertenece a las célula huésped en las cuales un vector de expresión recombinante se ha introducido. Los términos “célula huésped” y “células huésped recombinante” se usan aquí de manera intercambiable. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula sujeto particular sino al progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden darse en sucesivas generaciones debido a mutación o a influencias medioambientales, tal progenie puede que no sea de hecho idéntica a la célula parental, pero aún así se incluyen en el alcance del término como aquí se usa.

Una célula huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polipéptido *flh84g5* puede expresarse en células bacteriales como *E. Coli*, células de insecto, células de levadura o mamíferos (como las células de ovarios de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas son conocidas por aquellos expertos en la técnica.

ADN vector puede introducirse en células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas convencionales de transformación o transfección. Como aquí se emplean, los términos “transformación” y “transfección” pretenden referirse a una variedad de técnicas para introducir ácido nucleico exterior (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo precipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextran, lipofección, y electroporación. Métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989*), y otros manuales de laboratorio.

Para transfección estable de células de mamíferos, se conoce que, dependiendo del vector de expresión y técnica de transfección empleada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN externo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) generalmente se introduce en células huésped junto con el gen de interés. Marcadores seleccionables preferentes incluyen aquellos que confieren resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica *flh84g5* o puede introducirse en un vector separado. Las células establemente transfectadas con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula huésped de la invención, como una células huésped procariótica o eucariótica, pueden utilizarse para producir (es decir, expresar) polipéptido *flh84g5*. Como consecuencia, la invención también proporciona métodos para producir polipéptido *flh84g5* usando las células huésped de la invención. En una realización, el método comprende el cultivo de las células huésped de la invención (en las cuales el vector de expresión recombinante que codifica *flh84g5* se ha introducido) en un medio adecuado hasta que *flh84g5* se produce. En otra realización, el método además comprende el aislamiento de *flh84g5* del medio o célula huésped.

Las células huésped de la invención pueden usarse para producir animales transgénicos no humanos. Los animales transgénicos no humanos pueden usarse en ensayos de análisis diseñados para identificar agentes o compuestos, por ejemplo, fármacos, medicamentos, etc., que son capaces de aliviar los síntomas perjudiciales o desórdenes seleccionados tales como desordenes del sistema nervioso, desordenes relacionados con la musculatura lisa, desordenes rela-

cionados con la musculatura cardiaca, y desordenes relacionados con las glándulas. Por ejemplo, en una realización, una célula huésped de la invención es un oocito fertilizado o una célula madre embrionaria en al cual las secuencias codificadora flh84g5 se han introducido. Tales células huésped pueden usarse para crear animales transgénicos no humanos en Toso cuales las secuencias exógenas flh84g5 se han introducido en su genoma o animales recombinantes homólogos en los cuales secuencias endógenas flh84g5 se han alterado. Tales animales son útiles para el estudio de la función y/o actividad de flh84g5 y para identificar y/o evaluar los moduladores de actividad flh84g5. como aquí se emplea un “animal transgénico” es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un roedor como una rata o un ratón, en el cual una o más células del animal incluyen un transgen. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios y similares. Un transgen es ADN exógeno que se integra en el genoma de una célula desde la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo de este modo la expresión del producto gen codificado en uno o más tipos de células o tejidos del animal transgénico. Como aquí se emplea, un “animal homólogo recombinante” es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el cual un gen endógeno flh84g5 se ha alterado por recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula ADN exógena introducida en una células del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

Un animal transgénico puede crearse introduciendo ácido nucleico que codifica flh84g5 en los pronúcleos macho de un oocito fertilizado, por ejemplo, por microinyección, infección retroviral, y permitiendo que el oocito se desarrolle en un animal hembra pseudoembarazada adoptiva. La secuencia humana flh84g5 cADN de SEC ID NO:1 puede introducirse como un transgen en el genoma de un animal no humano. Además, la secuencia de rata flh84g5 cADN de SEC ID NO:4 puede introducirse como un transgen en el genoma de un animal diferente a la rata. Además, un homólogo no humano del gen humano flh84g5, como un gen de ratón flh84g5, puede aislarse en base a la hibridación del flh84g5 cADN humano o de rata (descrito con más detalle en la subsección I anteriormente) y usado como un transgen. Las secuencias intrónicas y señales de poliadenilación pueden también incluirse en el transgen para aumentar la eficiencia de expresión del transgen. Una secuencia reguladora específica del tejido puede estar operativamente unida con el transgen flh84g5 para dirigir la expresión de polipéptido flh84g5 a células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos por medio de manipulación y microinyección de embriones, en particular animales como ratones, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en Patentes US Números 4,736,866 y 4,870,009, ambas por Leder *et al*, Patente US Número 4,873,191 por Wagner *et al.*, y en Hogan B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986). Métodos similares se usan para la producción de otros animales transgénicos. Un animal transgénico fundador puede identificarse en base a la presencia del transgen flh84g5 en su genoma y/o expresión de mRNA flh84g5 en tejidos o células de animales. Un animal transgénico fundador puede usarse posteriormente para criar animales adicionales que transporten el transgen. Además, los animales transgénicos que transportan un gen que codifica flh84g5 pueden además criarse para otros animales transgénicos que transporten otros transgenes.

Para crear un animal homólogo recombinante, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen flh84g5 en el cual se introducido una eliminación, adición o sustitución para de ese modo alterar, por ejemplo, interrumpir funcionalmente, el gen flh84g5. El gen flh84g5 puede ser un gen humano (por ejemplo, de un clon genómico humano aislado de una biblioteca genómica humana analizada con el cADN de SEC ID NO:1), pero más preferentemente, es un gen de rata flh84g5 de SEC ID NO:4 o 31, u otro homólogo no humano de un gen humano flh84g5. Por ejemplo, un gen de ratón flh84g5 puede aislarse de una biblioteca ADN genómica de un ratón usando el flh84g5 cADN de SEC ID NO:1, 4 o 31 como una sonda. El gen de ratón flh84g5 puede usarse posteriormente para construir un vector de recombinación homóloga adecuado para alterar un gen endógeno flh84g5 en el genoma del ratón. En una realización preferente, el vector se diseña de tal modo que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno flh84g5 se interrumpe funcionalmente (es decir, ya no vuelve a codificar una polipéptido funcional; también referido como un vector “knock out”). De manera alternativa, el vector puede diseñarse de tal modo que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno flh84g5 se mute o sino se altere pero que siga codificando polipéptido funcional (por ejemplo, la región reguladora ascendente puede alterarse para alterar de este modo la expresión del polipéptido endógeno flh84g5). En el vector de recombinación homóloga, la porción alterada del gen flh84g5 se flanquea en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional del gen flh84g5 para permitir que se ocurra la recombinación homóloga entre el gen exógeno flh84g5 llevado por el vector y un gen endógeno flh84g5 en una célula madre embrionaria. El ácido nucleico adicional flanqueante flh84g5 es lo suficientemente largo como para lograr una adecuada recombinación homóloga al gen endógeno. Normalmente, se incluyen varios kilobases de ADN flanqueante (en ambos extremos 5' y 3') en el vector (ver por ejemplo, Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las cuales el gen introducido flh84g5 se ha recombinado homológamente con el gen endógeno flh84g5 (ver por ejemplo, Li, E. *et al.* (1992) Cell 69:915). Las células seleccionadas se inyectan posteriormente en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación (ver por ejemplo, Bradley, A. en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). Un embrión quimérico puede entonces transplantarse en un animal hembra pseudoembarazada adoptiva y el embrión puede llevarse a término. La acción de la progenie de albergar el ADN homológamente recombinado en sus células germen puede usarse para criar animales en los cuales todas las células del animal contengan el ADN homológamente recombinado por la transmisión de línea celular del transgen. Métodos para llevar a cabo vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos se describen con más detalle en Bradley, A. (1991) Current Opinión in Biotechnology 2:823-829 y en Números de Publicación Internacional PCT WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; y WO 93/04169.

Los animales transgénicos no humanos pueden producirse para que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada del transgen. Un ejemplo de tal sistema es el sistema recombinasa *cre/loxP*, ver, por ejemplo, Lakso *et al.* (1992) PNAS 89:6232-6236. Otro ejemplo de sistema recombinasa es el sistema recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355. Si un sistema *cre/loxP* se usa para regular la expresión de un transgen, los animales que contienen transgenes que codifican tanto la recombinasa Cre como un polipéptido seleccionado son necesarios. Tales animales pueden facilitarse por medio de la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, apareándose dos animales transgénicos, uno conteniendo un transgen codificador de un polipéptido seleccionado y otro conteniendo un transgen codificador de una recombinasa.

Clones de animales transgénicos no humanos aquí descritos también pueden producirse de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut, I. *et al.* 81997) *Nature* 385:810-813 y en Números de Publicación Internacional PCT WO 97/07668 y WO 97/07669. En resumen, una célula, por ejemplo, una célula somática, del animal transgénico puede aislarse y provocar que el ciclo de crecimiento salga y la fase G₀ entre. La célula inactiva puede entonces fusionarse, por ejemplo, por medio del uso de pulsos eléctricos, con un oocito enucleado de un animal de la misma especie de la de la célula inactiva se aísla. El oocito reconstruido se cultiva a continuación de tal modo que desarrolle la mórula o blastocisto y luego se transfiera a un animal hembra pseudoembarazada adoptiva. Las crías nacidas de este animal hembra adoptiva serán unos clones del animal del cual la célula, por ejemplo, célula somática, se ha aislado.

III. Polipéptidos *flh84g5* aislados y Anticuerpos *flh84g5*

Otro aspecto de la invención pertenece a polipéptidos *flh84g5* aislados, y porciones biológicamente activas de los mismos. La invención también permite que los fragmentos polipéptidos adecuado para uso como inmunogenes provoquen anticuerpos anti- *flh84g5*. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Los términos "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos *flh84g5* en las cuales el polipéptido está separado de los componentes celulares de las células en los cuales se produce naturalmente o por recombinación. En una realización, los términos "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos *flh84g5* que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso en seco) de polipéptido no *flh84g5* (también aquí referido como "polipéptido contaminante"), más preferentemente menos de aproximadamente 20% de polipéptido no *flh84g5*, aún más preferentemente menos de aproximadamente 10% de polipéptido no *flh84g5*, y más preferentemente menos de aproximadamente 5% de polipéptido no *flh84g5*. Cuando el polipéptido *flh84g5* o una porción biológicamente activa del mismo se produce por recombinación, es también sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, más preferentemente menos de aproximadamente 10% y más preferentemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de polipéptido. Los términos "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluyen preparaciones de polipéptido *flh84g5* en los cuales el polipéptido está separado de los precursores químicos u otras sustancias químicas que participan en la síntesis del polipéptido. En una realización, los términos "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluyen preparaciones de polipéptido *flh84g5* que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso en seco) de precursores químicos o sustancias químicas no *flh84g5*, más preferentemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o sustancias químicas no *flh84g5*, aún más preferentemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o sustancias químicas no *flh84g5*, y más preferentemente menos de aproximadamente 5% precursores químicos o sustancias químicas no *flh84g5*. En realizaciones preferentes, los polipéptidos aislados o porciones biológicamente activas de los mismos carecen de polipéptidos contaminante del mismo animal del cual el polipéptido *flh84g5* se deriva. Normalmente, tales polipéptidos se producen por expresión recombinante de, por ejemplo, un polipéptido *flh84g5* humano en una células no humana.

Un polipéptido *flh84g5* aislado o una porción biológicamente activa del mismo de la invención puede modular una respuesta al ligando *flh84g5* en una célula sensible al ligando *flh84g5* o puede ocurrir de manera natural, variante alélica no funcional de un polipéptido *flh84g5*. En realizaciones preferentes, el polipéptido o porción del mismo comprende una secuencia de aminoácido que es lo suficientemente homóloga a una secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, 5, o 32 de tal modo que el polipéptido o porción del mismo mantenga la habilidad para modular una respuesta al ligando *flh84g5* en una célula sensible al ligando *flh84g5*. La porción del polipéptido es preferentemente una porción biológicamente activa como aquí se describe. En otra realización preferente, el polipéptido humano *flh84g5* (es decir, residuos aminoácidos 1-398 de SEC ID NO:2) o el polipéptido de rata *flh84g5* (es decir, residuos aminoácidos 1-445 de SEC ID NO:5 o residuos aminoácidos 1-401 de SEC ID NO:32) tiene una secuencia de aminoácido mostrada en la SEC ID NO:2, 5, o 32, respectivamente, o una secuencia de aminoácido que se codifica por la secuencia nucleótida de la inserción de ADN del plásmido depositado con ATCC® con el Número de Adquisición 98902. En otra realización preferente, el polipéptido *flh84g5* tiene una secuencia de aminoácido que está codificada por una secuencia nucleótida que hibridiza, por ejemplo, hibridiza bajo condiciones rigurosas, con la secuencia nucleótida de la inserción de ADN del plásmido depositado con ATCC® con el Número de Adquisición 98902. Incluso en otra realización preferente, el polipéptido *flh84g5* tiene una secuencia de aminoácido que está codificada por una secuencia nucleótida que es al menos aproximadamente 30-35%, preferentemente al menos aproximadamente 40-45%, más preferentemente al menos aproximadamente 50-55%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60-65%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 70-75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente 80-85%, y ya más preferentemente al menos aproximadamente 90-95% o más homóloga a la secuencia nucleótida de la inserción de ADN del plásmido depositado con ATCC® con el Número de Adquisición 98902. Los polipéptidos preferentes de la presente invención también preferiblemente poseen al menos una de las actividades *flh84g5* aquí descritas. Por

ejemplo, un polipéptido flh84g5 preferente de la presente invención incluye una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia nucleotídica que hibridiza, por ejemplo, hibridiza bajo condiciones rigurosas, con la secuencia nucleotídica de la inserción de ADN del plásmido depositado con ATCC® con el Número de Adquisición 98902 y que puede modular una respuesta al ligando modular una respuesta al ligando flh84g5 en una célula sensible al ligando flh84g5 en una célula sensible al ligando flh84g5.

En otra realización, el polipéptido flh84g5 es sustancialmente homólogo a la secuencia de aminoácido SEC ID NO:2, 5, o 32 y retiene la actividad funcional del polipéptido de SEC ID:2, 5, o 32 e incluso difiere en la secuencia de aminoácido debido a la variación alélica natural o mutagénesis, como se ha descrito con detalles en la subsección I anteriormente. Por consiguiente, el polipéptido flh84g5 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la secuencia completa de aminoácido de SEC ID NO:2, 5, o 32 y que tiene al menos una de las actividades flh84g5 aquí descritas.

Las porciones biológicamente activas del polipéptido flh84g5 incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácido derivadas de la secuencia de aminoácido del polipéptido flh84g5, por ejemplo, la secuencia de aminoácido mostrada en SEC ID NO:2, 5, o 32 o la secuencia de aminoácido de un polipéptido homólogo al polipéptido flh84g5 o polipéptido de longitud completa que es homólogo al polipéptido flh84g5, y demuestra al menos una actividad del polipéptido flh84g5. Normalmente, las porciones biológicamente activas (péptidos, por ejemplo, péptidos que son, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 o más aminoácidos en longitud) comprenden un dominio o motivo, por ejemplo, un dominio transmembránico, con al menos una actividad del polipéptido flh84g5. Preferentemente, el dominio es un dominio transmembránico derivado de un humano, representado por SEC ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 o las secuencias de rata correspondientes. En una realización preferente, la porción biológicamente activa del polipéptido que incluye el dominio transmembránico puede modular la activada de una proteína G y/o modular una respuesta al ligando flh84g5 en una células, por ejemplo, una respuesta sensible al ligando flh84g5, por ejemplo, una célula del cerebro, para afectar de este modo de manera beneficiosa la respuesta sensible al ligando flh84g5. En una realización preferente, la porción biológicamente activa comprende un dominio transmembránico de flh84g5 como el representado por los residuos de aminoácido 34-59 (SEC ID NO:7), 73-91 (SEC ID NO:8), 109-130 (SEC ID NO:9), 152-174 (SEC ID NO:10), 197-219 (SEC ID NO:11), 360-380 (SEC ID NO:12), y 396-416 (SEC ID NO:13), o las secuencias correspondientes de rata mostradas en SEC ID Nos: 14-20 y 34-39. Además, las porciones biológicamente activas, donde otras regiones del polipéptido se eliminan, pueden prepararse mediante técnicas de recombinación y evaluarse para una o más actividades aquí descritas. Preferentemente, las porciones biológicamente activas del polipéptido flh84g5 incluyen uno o más de los dominios/motivos seleccionados o porciones de los mismos que tienen actividad biológica.

Los polipéptidos flh84g5 se producen preferentemente por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido se clona en un vector de expresión (como se ha descrito anteriormente), el vector de expresión se introduce en una célula huésped (como se ha descrito anteriormente) y el polipéptido flh84g5 se expresa en la célula huésped. El polipéptido flh84g5 puede posteriormente aislarse de las células mediante combinación de purificación apropiada usando técnicas estándar de purificación de polipéptido. Alternativas a la expresión recombinante, un polipéptido flh84g5, proteína, o péptido pueden sintetizarse químicamente usando técnicas estándar de síntesis de péptido. Además, el polipéptido nativo flh84g5 puede aislarse de células (por ejemplo, células hipocámpales, células de sustancia negra, o células glandulares parótidas), por ejemplo usando un anticuerpo anti-flh84g5 (descrito más adelante).

La invención también proporciona flh84g5 quimérico o polipéptidos de fusión. Como aquí se emplea, un “polipéptido quimérico” flh84g5, o “polipéptido de fusión” comprende un polipéptido flh84g5 unido operativamente con un polipéptido no flh84g5. Un “polipéptido flh84g5” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido correspondiente a flh84g5, mientras que un “polipéptido no flh84g5” se refiere a un polipéptido heterólogo que tiene una secuencia de aminoácido correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente homólogo al polipéptido flh84g5, por ejemplo, un polipéptido que es diferente del polipéptido flh84g5 y que se deriva del mismo o de diferente organismo. Dentro del polipéptido de fusión, el término “operativamente unido” pretende indicar que el polipéptido flh84g5 y el polipéptido no flh84g5 se fusionan en estructura entre sí. El polipéptido no flh84g5 puede fusionarse con la terminal N o la terminal C del polipéptido flh84g5. Por ejemplo, en una realización el polipéptido de fusión es un polipéptido de fusión GST en el cual las secuencias flh84g5 se fusionan con la terminal G de las secuencias GST. Otros tipos de polipéptidos de fusión incluyen, no se limitan a, polipéptidos de fusión enzimática, por ejemplo fusiones beta-galactosidasa, fusiones GAL de levadura dos-híbridas, fusiones poli His y fusiones Ig. Tales polipéptidos de fusión, en particular fusiones poli His, pueden facilitar la purificación de flh84g5 recombinante. En otra realización, el polipéptido de fusión es un polipéptido flh84g5 que contienen una secuencia de señal heteróloga en su terminal N. En ciertas células huésped, (por ejemplo, células huésped de mamíferos), la expresión y/o secreción de flh84g5 puede aumentar por medio del uso de una secuencia de señal heteróloga.

Preferentemente, un flh84g5 quimérico o polipéptido de fusión de la invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptido se ligan unidas en estructura de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando términos con extremos despuntados o extremos que se balancean para ligadura, restricción de digestión de enzima para proporcionar los términos apropiados, completando extremos cohesivos como sea adecuado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. De manera alternativa, la amplificación PCR de

los fragmentos de gen puede llevarse a cabo usando imprimadores de anclaje que ocasionan salientes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que a continuación pueden templarse y reamplificarse para generar secuencia de gen quiméricos (ver, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Además, muchos vectores de expresión están disponibles en el mercado que ya codifican una molécula de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica flh84g5 puede clonarse en tal vector de expresión que la molécula de fusión se una en estructura con el polipéptido flh84g5.

La presente invención también pertenece a homólogos a los polipéptidos flh84g5 que funcionan bien como un agonista (mimético) flh84g5 o un antagonista flh84g5. En una realización preferente, los agonistas y antagonistas flh84g5 estimulan o inhiben, respectivamente, un subgrupo de actividades biológicas de la forma que se dan de manera natural del polipéptido flh84g5. Por lo tanto, los efectos biológicos específicos pueden obtenerse mediante tratamiento con un homólogo de función determinada. En una realización, el tratamiento de un sujeto con un homólogo que tenga un subgrupo de actividades biológicas de la forma que se dan de manera natural del polipéptido tiene menos efectos secundarios en un sujeto en relación con el tratamiento con la forma que se da de manera natural del polipéptido flh84g5.

Los homólogos del polipéptido flh84g5 pueden generarse por mutagénesis, por ejemplo, mutación de punto discreto o partición del polipéptido flh84g5. Como aquí se emplea, el término "homólogo" se refiere a una forma variante del polipéptido flh84g5 que actúa como un agonista o antagonista de la actividad del polipéptido flh84g5. Un agonista del polipéptido flh84g5 puede retener sustancialmente las mismas, o un subgrupo de, actividades biológicas del polipéptido flh84g5. Un antagonista del polipéptido flh84g5 puede inhibir una o más actividades de la forma que se da de manera natural del polipéptido flh84g5, mediante, por ejemplo, enlace competitivo a un miembro descendente o ascendente de la cascada flh84g5 que incluye el polipéptido flh84g5. Por lo tanto, el polipéptido mamífero flh84g5 y homólogos del mismo de la presente invención pueden ser bien reguladores positivos o negativos de las respuestas al ligando flh84g5 en las células sensibles al ligando flh84g5.

En una realización alternativa, homólogos del polipéptido flh84g5 pueden identificarse analizando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de partición, del polipéptido flh84g5 para actividad de polipéptido flh84g5 agonista o antagonista. En una realización, una biblioteca variada de variantes de flh84g5 se genera mediante mutagénesis combinatorial en el nivel de ácido nucleico y se codifica mediante una biblioteca de gen variado. Una biblioteca variada de variantes flh84g5 puede producirse por, por ejemplo, enzimáticamente ligando una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en las secuencias de gen de tal modo que un conjunto degenerado de secuencias potenciales flh84g5 se pueda expresar en polipéptidos individuales, o de manera alternativa, como un conjunto de mayor fusión (por ejemplo, para expresión del fago) que contiene el conjunto de secuencias flh84g5 en el mismo. Existen una variedad de métodos que pueden usarse para producir bibliotecas de homólogos flh84g5 a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótido. La síntesis química de una secuencia degenerada de gen puede llevarse a cabo en un sintetizador de ADN automatizado, y el gen sintético puede posteriormente ligarse en un vector de expresión adecuado. El uso de un seto degenerado de genes permite el suministro, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias potenciales flh84g5. Métodos para sintetizar los oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* 81983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, bibliotecas de fragmentos del codificador polipéptido flh84g5 pueden usarse para generar una población variada de fragmentos flh84g5 para análisis y posterior selección de homólogos de un polipéptido flh84g5. En una realización, una biblioteca de fragmentos de secuencia codificadora con una nucleasa bajo condiciones donde el corte sólo se da aproximadamente una vez por molécula, la desantualización del ADN de doble trenzado, renaturalización del ADN para formar ADN de doble trenzado que pueda incluir parejas sentido/antisentido a partir de diferentes productos partidos, la retirada de porciones sencillas trenzadas a partir de dúplex reformados por tratamiento S1 nucleasa, y la unión de la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, una biblioteca de expresión puede derivarse que codifique terminal N, terminal C y fragmentos interno de varios tamaños del polipéptido flh84g5.

En el campo se conocen varias técnicas para el análisis de productos de gen de bibliotecas combinatorias hecha por mutaciones de punto o partición, y para análisis de bibliotecas cADN para productos de gen que tienen una propiedad seleccionada. Tales técnicas son adaptables para análisis rápido de la bibliotecas de gen generadas por mutagénesis combinatoria de homólogos flh84g5. Las técnicas más usadas, que son susceptibles a los análisis de elevado rendimiento, para analizar amplias bibliotecas de gen normalmente incluyen clonación de biblioteca de gen en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores, y expresión de los genes combinatorios bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilitar el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis recursiva de conjunto (REM), una nueva técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de análisis par identificar homólogos flh84g5 (Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6(3)327-331).

En una realización, los ensayos basados en células pueden aprovecharse para analizar una biblioteca variada de flh84g5. Por ejemplo, una biblioteca de vectores de expresión puede transfectarse a una línea celular normalmente sensible al ligando flh84g5. Las células transfectadas se ponen posteriormente en contacto con el ligando flh84g5 y el efecto del mutante flh84g5 sobre la señalización por ligando flh84g5 puede detectarse por ejemplo, por medida de

concentración de calcio intracelular. El ADN plásmido puede recuperarse posteriormente de las células que ganan para la inhibición, o de manera alternativa, para la potenciación de inducción de ligando flh84g5, y los clones individuales además caracterizados.

5 Un polipéptido aislado flh84g5, o una porción del mismo, puede usarse como un inmunogen para generar anticuerpos que enlacen con flh84g5 usando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales. El polipéptido de completa longitud flh84g5 puede usarse o, como alternativa, la invención proporciona fragmentos de péptido antigénicos de flh84g5 para uso como inmunogenes. El péptido antigénico de flh84g5 comprende al menos 18 residuos de aminoácido de la secuencia aminoácido mostrada en SEC ID NO:2, 5, o 32 y comprende un epítipo de flh84g5 de tal modo que un anticuerpo levantado contra el péptido forma un complejo inmune específico con flh84g5. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácido, más preferentemente al menos 15 residuos de aminoácido, incluso más preferentemente al menos 20 residuos de aminoácido, y más preferentemente al menos 30 residuos de aminoácido. Los epítopos preferentes comprendidos por el péptido antigénico son las regiones de flh84g5 que están localizadas sobre la superficie del polipéptido, por ejemplo, regiones hidrofílicas.

15 Un inmunogen flh84g5 normalmente se usa para preparar anticuerpos mediante la inmunización de un sujeto adecuado, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con un inmunogen. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, polipéptido flh84g5 expresado de manera recombinante o un péptido flh84g5 químicamente sintetizado. La preparación además incluye un adyuvante, como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación inmunogénica flh84g5 provoca una respuesta de anticuerpo policlonal anti-flh84g5.

25 Por consiguiente, otro aspecto de la invención pertenece a anticuerpos anti-flh84g5. El término “anticuerpo” como aquí se describe se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones biológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contiene un punto de enlace antígeno que específicamente se enlaza (inmunoreacciona con) un antígeno, como flh84g5. Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima como pepsina. La invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales que se enlazan con flh84g5. El término “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, como aquí se usa, se refiere a la población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de punto de enlace antígeno capaz de inmunoreaccionar con un epítipo particular flh84g5. Una composición de anticuerpo monoclonal por lo tanto expresa una única afinidad de enlace para un polipéptido particular flh84g5 con el que inmunoreacciona.

35 Los anticuerpos policlonales anti- flh84g5 pueden prepararse como se ha descrito anteriormente inmunizando un sujeto adecuado con un inmunogen flh84g5. El título de anticuerpo anti-flh84g5 en el sujeto inmunizado puede controlarse durante un periodo de tiempo mediante técnicas estándar, como con una enzima unida al ensayo inmunosorbente (ELISA) usando flh84g5 inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra flh84g5 pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse posteriormente por técnicas bien conocidas, como cromatografía de proteína A para obtener la fracción IgG. En un momento adecuado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti- flh84g5 están en su punto más elevado, la células que producen anticuerpos pueden obtenerse a partir del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, como la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (ver también, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica más reciente de técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica EBV-hibridoma (Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R.I Liss, Inc., pp-77-96) o técnicas trioma. La tecnología para la producción de hibridomas de anticuerpo monoclonal es bien conocida (ver generalmente R.H. Kenneth, *in Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E.A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M.L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una línea celular inmortal (normalmente un mieloma) se fusiona con linfocitos (normalmente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunogen flh84g5 como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes del cultivo de la células hibridoma resultantes se analizan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que enlaza con flh84g5.

55 Cualquiera de los protocolos bien conocidos empleados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas pueden aplicarse con el fin de generar un anticuerpo monoclonal anti-flh84g5 (ver, por ejemplo, G.Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266-55052; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Además, la persona especializada en la materia apreciará que existen muchas variaciones de tales métodos que también pueden ser útiles. Normalmente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas de murina pueden hacerse fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular inmortalizada de ratón. Las líneas celulares inmortales preferentes son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”). Cualquier número de líneas celulares de mieloma puede usarse como una pareja de fusión de acuerdo con técnicas estándar, por ejemplo, el PN3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14 líneas de mieloma. Estas líneas de mieloma están disponibles en ATCC®. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón usando glicol polietileno (“PEG”). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan posteriormente usando el medio HAT, que mata las células no fusionadas y las fusionadas de manera no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren varios días después debido a que no se transforman). Las células de

hibridoma que producen el anticuerpo monoclonal de la presente invención se detectan analizando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para anticuerpos que se enlazan con flh84g5, por ejemplo, utilizando un ensayo estándar ELISA.

5 Como alternativa a la preparación de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal anti-flh84g5 puede identificarse y aislarse analizando una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de expresión fago anticuerpo). Kits para generar y analizar bibliotecas de expresión fago anticuerpo están disponibles en el mercado (por ejemplo, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01, y el Stratagene SurZAP™ Phage Display Kit, Catalog No. 240612). Además, ejemplos
10 de métodos y reagentes particularmente útiles para uso en generar y analizar biblioteca de expresión de anticuerpo pueden encontrarse en, por ejemplo, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.*, Publicación Internacional PCT, WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación Internacional PCT, WO 90/0289; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275—1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid. Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; y
20 McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554.

Además, los anticuerpos anti- flh84g5 recombinantes, como anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos, comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden hacerse utilizando técnicas de ADN recombinante, están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales humanizados pueden producirse mediante
25 técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando métodos descritos en Robinson *et al.* Solicitud Internacional PCT Número PCT/US86/02269; Akira, *et al.* Solicitud de Patente Europea 184,187; Taniguchi, M. Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison *et al.* Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente U.S Número 4,816,567; Cabilly *et al.* Solicitud de Patente Europea 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.
35

Un anticuerpo anti-flh84g5 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) puede usarse para aislar flh84g5 mediante técnicas estándar, como cromatografía por afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-flh84g5 puede facilitar la purificación de flh84g5 natural de células y de flh84g5 producido de manera recombinante expresado en células huésped. Además, un anticuerpo anti-flh84g5 puede usarse para detectar polipéptido flh84g5 (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y el patrón de expresión del polipéptido flh84g5 o un fragmento del polipéptido flh84g5. La detección de fragmentos circulares de un polipéptido flh84g5 puede usarse para identificar movimiento de flh84g5 en un sujeto. Los anticuerpos anti-flh84g5 pueden emplearse mediante diagnóstico para controlar los niveles de polipéptido en tejido como parte de un procedimiento de test clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen dado de tratamiento. La detección puede facilitarse uniendo (por ejemplo, uniendo físicamente) el anticuerpo con una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferone, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro dansil o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscente incluyen luciferaza, luciferina, y acuorina, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .
40
45
50

55 IV. Composiciones Farmacéuticas

Las moléculas de ácido nucleico flh84g5, los polipéptidos flh84g5 (en particular fragmentos de flh84g5), los moduladores flh84g5, y anticuerpos anti- flh84g5 (también referidos aquí como “compuestos activos”) de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuada para la administración a un sujeto, por ejemplo, un humano. Tales composiciones normalmente comprende la moléculas de ácido nucleico, polipéptido, modulador, o anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Como aquí se emplean, los términos “portador farmacéuticamente aceptable” pretenden incluir cualquiera o todos los disolventes, medios de dispersión, coberturas, agentes antibacterianos y antihongos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares, compatibles con administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido
60 en la técnica. Excepto en la medida en que el medio o agente convencional sea compatible con el compuesto activo, tal medio puede usarse en las composiciones de la invención. Compuestos activos suplementarios pueden también incorporarse a las composiciones.
65

ES 2 285 792 T3

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su supuesta ruta de administración. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenoso, intradérmico, subcutáneo, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmico (tópico), transmucosa, y administración rectal. Soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijas, glicoles polietileno, glicerina, glicol propileno u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol benzilo o parabenos metilo; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelatantes como ácido etilenediaminetetraacético; búferes como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad como cloruro de sodio y dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos y bases, como ácido hidrocórico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampolla, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de cristal o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde el agua sea soluble) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para administración intravenosa, portadores adecuados incluyen salina fisiológica, agua bacterioestática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o salina de búfer fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto de que se pueda inyectar fácilmente. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenaje y debe protegerse de acciones contaminantes y microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio en dispersión conteniendo, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol propileno, y glicol polietileno líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de una capa como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacteriano y antihongos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, resultará preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de la composición inyectable puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido flh84g5 o anticuerpo anti-flh84g5) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes de los arriba referenciados, en la medida que sea necesaria, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de aquellos anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado por aspiración y liofilización que produce un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional de una solución previamente filtrada para esterilización del mismo.

Una composición generalmente incluye un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden introducirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en pastillas. Con el fin de administración oral terapéutica, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de pastillas, gotas, o cápsulas. La composición oral también puede prepararse usando un portador fluido para uso como un enjuague bucal, donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita, expectora o traga. Los agentes de enlace farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Las pastillas, píldoras, cápsulas, gotas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un enlace tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como levadura o lactosa, un agente desintegrador como ácido algínico, Primogel, o levadura de maíz; un lubricante como estearato de magnesio o Steorates; un glidante como dióxido de silicón coloidal; un agente endulzador como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante como menta, metil salicilato, o saborizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se envían en la forma de un spray de aerosol de un envase o dispensador a presión que contiene un propelante adecuado; por ejemplo, un gas como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistemática también puede hacerse por medios transmucosales o transdérmicos. Para administración transmucosal o transdérmica, penetrantes apropiados con la barrera para extenderse se emplean en la formulación. Tales penetrantes generalmente se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales bilis, y ácido fusídico y derivados. La administración transmucosal puede llevarse a cabo por medio del uso de sprays nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como generalmente se conoce en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases supositorias convencionales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para envío rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de envío microcapsulados. Polímeros biodegradables y biocompatibles pueden usarse, como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán aparentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluyendo liposomas

dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales con antígenos virales) también pueden emplearse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos métodos pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se ha descrito en Patente U.S Número 4,522,811.

5 Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales y parenterales en forma de dosis unidad para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosis unidad como aquí se emplea se refiere a unidades físicamente discretas convenidas como dosis unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La descripción para las formas de unidad de dosis de la invención se dictan y son directamente dependientes de las únicas características de compuesto activo y el efecto terapéutico particular a lograrse, y las limitaciones inherentes en la técnica de los compuestos como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

15 Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia de gen. Los vectores de terapia de gen pueden enviarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (ver Patente U.S 5,328,470) o mediante inyección estereotáctica (ver, por ejemplo, Chen *et al.* (1994) *PNAS* 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia de gen puede incluir el vector de terapia de gen en diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual el vehículo de envío de gen está unida. De manera alternativa, donde el vector de envío de gen completo puede producirse intacto de 20 células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de envío de gen.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un envase, pack, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

25 V. Usos y Métodos de la Invención

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, homólogos de polipéptidos, moduladores, y anticuerpos aquí descritos pueden usarse en uno o más de los siguientes métodos: a) ensayos de análisis de fármacos; b) ensayos de diagnóstico particularmente en identificación de enfermedades, análisis alélicos y pruebas farmacogenéticas; c) métodos de tratamiento; d) farmacogenómica; y e) control de efectos durante ensayos clínicos. Un polipéptido flh84g5 de la invención tiene una o más actividades aquí descritas y por lo tanto pueden usarse, por ejemplo, para modular una respuesta de ligando flh84g5 en un célula sensible al ligando flh84g5, por ejemplo, en enlace con un ligando flh84g5 o una pareja de enlace flh84g5 haciéndolo no estar disponible para enlace con el polipéptido naturalmente presente flh84g5. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención pueden usarse para expresar polipéptido flh84g5 (por ejemplo, por medio de un vector de expresión recombinante en una célula huésped o en aplicaciones de terapia de gen), para detectar mutación genética generada en un gen flh84g5, y para modular actividad flh84g5, como se describe a continuación. Además, los polipéptidos flh84g5 pueden usarse para analizar fármacos y componentes que modulan la actividad del polipéptido flh84g5 así como para tratar desórdenes caracterizados por la producción insuficiente de polipéptido flh84g5 o formas de producción de polipéptido flh84g5 que han disminuido su actividad en comparación con flh84g5 de tipo salvaje. Además, los anticuerpos flh84g5 de la invención pueden usarse para detectar y aislar un polipéptido flh84g5, en particular fragmentos de flh84g5 presentes en una muestra biológica, y para modular actividad de polipéptido flh84g5.

45 a. Ensayos de Análisis de Fármacos

La invención proporciona métodos para identificar compuestos o agentes que puede usarse para tratar desórdenes caracterizados por (o asociados con) expresión anormal o aberrante de ácido nucleico flh84g5 y/o actividad de polipéptido flh84g5. Estos métodos también se refieren aquí como ensayos de análisis de fármacos y normalmente incluyen el paso de analizar un candidato/compuesto de gen o agentes para que sea un agonista o antagonista de flh84g5 y específicamente para habilidad de interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) un polipéptido flh84g5, para modular la interacción de un polipéptido flh84g5 y una molécula objetivo, y/o para modular la expresión de ácido nucleico flh84g5 y/o actividad de polipéptido flh84g5. Los candidatos/compuestos de test o agentes que tienen una o más de esta habilidades puede usarse como fármacos para tratar desórdenes caracterizados por expresión anormal o aberrante de ácido nucleico flh84g5 y/o actividad de polipéptido flh84g5. Los candidatos/compuestos de test incluyen, por ejemplo, 1) péptidos tales como péptidos solubles, incluyendo péptidos de fusión de cola Ig y miembros de bibliotecas de péptido al azar (ver, por ejemplo, Lam, K.S. *et al.* (1991) *Nature* 354:82-84; Houghten, R. *et al.* (1991) *Nature* 354:84-86) y bibliotecas moleculares derivadas de química combinatoria hechas de aminoácidos de configuración D-y/o L-; 2) fosfopéptidos (por ejemplo, miembro de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidos, al azar, parcialmente degenerados, ver, por ejemplo, Songyang, Z. *et al.* (1993) *Cell* 72:767-778); 3) anticuerpos (por ejemplo, policlonales, monoclonales, humanizados, anti-idiotípicos, quiméricos, y anticuerpos de cadena sencilla, así como Fab, F(ab')₂, fragmentos de biblioteca de expresión Fab, y fragmentos de enlace epítope de anticuerpos); y 4) moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas (por ejemplo, moléculas obtenidas de bibliotecas de productos naturales y combinatorios).

65 En una realización, la invención proporciona ensayos para análisis de candidatos/compuestos de test que interactúa con (por ejemplo, se enlaza con) un polipéptido flh84g5. Normalmente, los ensayos están basados en células recombinantes o ensayos libres de células que incluyen los pasos de combinar un polipéptido flh84g5 o un fragmento bioactivo del mismo, y un candidato/teste compuesto, por ejemplo, bajo condiciones que permiten la interacción de (por ejem-

plo, el enlace con) el candidato/compuesto de test para el polipéptido flh84g5 o fragmento del mismo para formar un complejo, y detectar la formación de un complejo, en el cual la habilidad del compuesto candidato para interactuar con (por ejemplo, enlazarse con) el polipéptido flh84g5 o fragmento del mismo se indica por la presencia del compuesto candidato en el complejo. La formación de complejos entre el polipéptido flh84g5 y el compuesto candidato puede cuantificarse, por ejemplo, usando inmunoensayos estándar.

En otra realización, la invención proporciona ensayos de análisis para identificar candidatos/compuestos de test que modulan (por ejemplo, estimulan o inhiben) la interacción (y con más posibilidades también actividad flh84g5) entre un polipéptido flh84g5 y una molécula (molécula objetivo) con la cual el polipéptido flh84g5 normalmente interactúa. Ejemplos de tales moléculas objetivo incluyen polipéptidos en la misma ruta de señalización que el polipéptido flh84g5, por ejemplo, polipéptidos que pueden funcionar en dirección ascendente (incluyendo tanto estimuladores como inhibidores de actividad) o en dirección descendente del polipéptido flh84g5 en, por ejemplo, una ruta de señalización de función cognitiva o en una ruta que implique actividad flh84g5, por ejemplo, una proteína G u otro interactivo implicado en movimiento fosfatidilinositol y/o activación fosfolipasa C. Normalmente, los ensayos están basados en células recombinantes o son ensayos libres de células que incluyen los pasos de combinar una célula que expresa un polipéptido flh84g5, o un fragmento bioactivo del mismo, una molécula objetivo flh84g5 (por ejemplo, un ligando flh84g5) y un candidato/compuesto de test, por ejemplo, bajo condiciones en las cuales excepto por la presencia del compuesto candidato, el polipéptido flh84g5 o la porción biológicamente activa del mismo interactúa con (por ejemplo, se enlaza con) la molécula objetivo, y detecta la formación de un complejo que incluye el polipéptido flh84g5 y la molécula objetivo o detecta la interacción/reacción del polipéptido flh84g5 y la molécula objetivo. La detección de la formación del complejo puede incluir cuantificación directa del complejo mediante, por ejemplo, la medida de efectos inductivos del polipéptido flh84g5. Un cambio estadísticamente importante, como un descenso, en la interacción del flh84g5 y la molécula objetivo (por ejemplo, en la formación de un complejo entre el flh84g5 y la molécula objetivo) en la presencia de un compuesto candidato (en relación a lo que se detecta en la ausencia de un compuesto candidato) es indicativo de la modulación (por ejemplo, estimulación o inhibición) de la interacción entre el polipéptido flh84g5 y la molécula objetivo. La modulación de la formación de complejos entre el polipéptido flh84g5 y la molécula objetivo puede cuantificarse usando, por ejemplo, inmunoensayos estándar.

Para llevar a cabo los ensayos de análisis de fármacos libre de células, se desea inmovilizar bien el flh84g5 o su molécula objetivo para facilitar la separación de complejos de formas no complejas o de uno o ambos polipéptidos, así como para acomodar la automatización del ensayo. La interacción (por ejemplo, el enlace de) de flh84g5 con una molécula objetivo, en la presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede llevarse a cabo en un vaso adecuado para contener reactantes. Ejemplos de tales vasos incluyen placas microtítulo, tubos de test, y tubos micro-centrífugos. En una realización, puede proporcionarse un polipéptido de fusión que añada un dominio que permite que el polipéptido se una a una matriz. Por ejemplo, glutatione-S-transferasa/flh84g5 polipéptidos de fusión pueden absorberse en gotas de glutaniona sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o glutaniona que derivó placas de microtítulo, que se combinan posteriormente con los lisados celulares (por ejemplo, 35 S-etiquetado) y el compuesto candidato, y la mezcla incubada bajo condiciones conductoras para formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Tras la incubación, las gotas se lavan para retirar cualquier etiqueta no enlazada, y la matriz inmovilizó y determinó la radio etiqueta directamente, o en el sobrenadante después de que los complejos se disocien. De mane-
ar alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz, separarse por SDS-PAGE, y el nivel de polipéptido de enlace flh84g5 encontrado en la fracción de la gota cuantificada del gel usando técnicas electroforéticas estándar.

Otra técnicas para inmovilizar polipéptidos o matrices también pueden usarse en los ensayos de análisis de fármacos de la invención. Por ejemplo, bien flh84g5 o su molécula objetivo puede inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Moléculas flh84g5 biotiniladas pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuci-
nimida) usando técnicas bien conocidas en el campo (por ejemplo, kit de biotinilización, Pierce Chemicals, Rockford, IL), y se inmovilizaron en los pozos de placas de 96 pozos cubiertas por estreptavidina (Pierce Chemical). De mane-
ra alternativa, los anticuerpos reactivos con flh84g5 pero que interfieren con el enlace del polipéptido o su molécula objetivo pueden derivarse a los pozos de la placa, y flh84g5 puede quedar atrapado en los pozos por la conjugación de anticuerpo. Como se ha descrito anteriormente, las preparaciones de polipéptido de enlace flh84g5 y un compuesto candidato se incuban en los pozos que presentan flh84g5 de la placa, y la cantidad de complejo atrapada en el pozo puede cuantificarse. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados por GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con la molécula objetivo flh84g5, o que son reactivos con el polipéptido flh84g5 y compiten con la molécula objetivo; así como ensayos relacionados con enzima que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con la molécula objetivo.

Incluso en otra realización, la invención proporciona un método para identificar un compuesto (por ejemplo, un ensayo de análisis) capaz de usarse en el tratamiento de un desorden caracterizado por (o asociado con) expresión anormal o aberrante de ácido nucleico flh84g5 o actividad de polipéptido flh84g5. Este método normalmente incluye el paso de ensayar la habilidad del compuesto o agente para modular la expresión del ácido nucleico flh84g5 o la actividad del polipéptido flh84g5 identificando de este modo un compuesto para el tratamiento de un desorden caracterizado por la expresión anormal o aberrante de ácido nucleico flh84g5 o actividad de polipéptido flh84g5. Los desórdenes caracterizados por la expresión anormal o aberrante de ácido nucleico flh84g5 o actividad de polipéptido flh84g5 se describen aquí. Los métodos para ensayar la habilidad del compuesto o agente para modular la expresión del ácido nucleico flh84g5 o la actividad del polipéptido flh84g5 son normalmente ensayos basados en células. Por ejemplo, las células que son sensibles a ligandos que convierte la señal por medio de una ruta que implica flh84g5 pueden ser inducidas a sobreexpresar un polipéptido flh84g5 en la presencia o ausencia de una compuesto candidato. Los

compuestos candidatos que producen un cambio estadísticamente significativo en respuesta dependientes de flh84g5 (bien estimulación o inhibición) pueden identificarse. En una realización, la expresión del ácido nucleico flh84g5 o actividad de un polipéptido flh84g5 se modula en células y los efectos de los compuesto candidatos sobre la lectura de interés (como movimiento de fosfatidilinositol) se miden. Por ejemplo, la expresión de genes que se regulan hacia arriba o hacia abajo en respuesta a una señal en cascada dependiente de flh84g5 puede analizarse. En realizaciones preferentes, las regiones reguladoras de tales genes, por ejemplo, regiones propulsoras o potenciadoras flanqueantes, se unen operativamente a un marcador detectable (como luciferaza) que codifica un producto gen que puede detectarse fácilmente. La fosforilación de flh84g5 o moléculas objetivo flh84g5 también pueden medirse, por ejemplo, mediante inmunoblot.

De manera alternativa, la modulación de expresión flh84g5 (por ejemplo, compuesto que pueden usarse para tratar un desorden caracterizado por la expresión anormal o aberrante de ácido nucleico flh84g5 o actividad de polipéptido flh84g5) puede identificarse en un método donde una célula está en contacto con un compuesto candidato y la expresión de flh84g5 mARN o polipéptido en la célula se determina. El nivel de expresión de flh84g5 mARN o polipéptido en la presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de flh84g5 mARN o polipéptido en la ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato pueden identificarse posteriormente como un modulador de expresión de ácido nucleico flh84g5 en base a esta comparación y puede usarse para tratar un desorden caracterizado por la expresión aberrante de ácido nucleico flh84g5. Por ejemplo, cuando al expresión de flh84g5 mARN o polipéptido es mayor (estadísticamente significativamente mayor) en la presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de expresión de ácido nucleico flh84g5. De manera alternativa, cuando la expresión de ácido nucleico flh84g5 es menor (estadísticamente significativamente menor) en la presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de expresión de ácido nucleico flh84g5. El nivel de expresión de ácido nucleico el compuesto candidato se identifica como un estimulador de expresión de ácido nucleico flh84g5 en las células puede determinarse mediante métodos aquí descritos para detectar el compuesto candidato se identifica como un estimulador de expresión de ácido nucleico flh84g5 mARN o polipéptido.

En otro aspecto de la invención, los polipéptidos flh84g5, o fragmentos de los mismos, pueden usarse como “proteínas cebo” en ensayos de dos híbridos (ver, por ejemplo, Patente US No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; y Brent WO 94/10300, para identificar otras proteínas, que se enlazan o interactúan con flh84g5 (“proteínas de enlace flh84g5” o “flh84g5-bp”) y modulan actividad de polipéptido flh84g5. Dichas proteínas de enlace flh84g5 también tienen más posibilidades de estar implicadas en la propagación de señales emitidas por los polipéptidos flh84g5 como, por ejemplo, elementos ascendentes y descendentes de la ruta flh84g5.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios de enlace ADN separable y activación. Bartel, P. *et al.* “Using the Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions” en *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, Hartley, D.A. ed. (Oxford University Press, Oxford, 1993) pp. 153-179. En resumen, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el gen que codifica flh84g5 se fusiona con un gen que codifica el dominio de enlace ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, de una biblioteca de secuencias ADN, que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) se fusiona con un gen que codifica el dominio de activación de un factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y la “presa” son capaces de interactuar, *in vivo*, formando un complejo dependiente de flh84g5, los dominios de enlace de ADN y de activación del factor de transcripción se acercan en proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen reportero (por ejemplo, LacZ) que está operativamente unido con un punto regulador de transcripción sensible al factor de transcripción. La expresión del gen reportero puede detectarse en colonias celulares que contiene el factor de transcripción funcional que puede aislarse y usarse para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interactúa con flh84g5.

Los moduladores de actividad de polipéptido flh84g5 y/o expresión de ácido nucleico flh84g5 identificadas de acuerdo con estos ensayos de análisis de fármacos pueden usarse para tratar, por ejemplo, desórdenes del sistema nervioso, desórdenes relacionados con la musculatura lisa, desórdenes relacionados con la musculatura cardiaca, y desórdenes relacionados con las glándulas. Estos métodos de tratamiento incluyen los pasos de administrar los moduladores de actividad de polipéptido flh84g5 y/o expresión de ácido nucleico, por ejemplo, en composición farmacéutica como se ha descrito en la subsección IV anteriormente, a un sujeto que necesite tal tratamiento, por ejemplo, un sujeto con un desorden aquí descrito.

b. Ensayo de Diagnóstico

La invención además proporciona un método para la detección de flh84g5, o fragmentos del mismo, en una muestra biológica. El método incluye el contacto de la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar polipéptido flh84g5 o mARN de tal modo que la presencia de flh84g5 se detecte en la muestra biológica. Un agente preferente para la detección de flh84g5 mARN es una sonda de ácido nucleico etiquetada o no etiquetada capaz de hibridizar flh84g5 con mARN. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, cADN flh84g5 de completa longitud de SEC ID NO:1, 4, o 31, o una porción del mismo, como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250, o 500 nucleótidos en longitud suficientes como para hibridizar específicamente bajo condiciones severas con flh84g5 mARN. Un agente preferente para detectar polipéptido flh84g5 es un anticuerpo etiquetado o no etiquetado capaz de

enlazarse con polipéptido flh84g5. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂) puede usarse. El término “etiquetado o etiquetable”, con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende englobar el etiquetaje directo de la sonda o anticuerpo por enlace (por ejemplo, enlace físicamente) una sustancia detectable con la sonda o anticuerpo, así como etiquetaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reagente que está directamente etiquetado. Ejemplos de etiquetaje indirecto incluye detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario etiquetado fluorescentemente y etiquetando el extremo de una sonda de ADN con biotina de tal modo que puede detectarse con estreptavidina fluorescentemente etiquetada. El término “muestra biológica” pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Esto es, el método de detección de la invención puede emplearse para detectar flh84g5 mRNA o polipéptido en una muestra tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de flh84g5 mRNA incluyen hibridizaciones Northern e hibridizaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de polipéptido flh84g5 incluyen ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzima (ELISAs), Western blots, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. De manera alternativa, el polipéptido flh84g5 puede detectarse *in vivo* en un sujeto introduciendo en el sujeto un anticuerpo flh84g5 etiquetado. Por ejemplo, el anticuerpo puede etiquetarse con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas estándar de imagen. Particularmente útiles son los métodos que detectan la variante alélica de flh84g5 expresada en un sujeto y métodos que detectan fragmentos de un polipéptido flh84g5 en una muestra. La invención también comprende kits para detectar la presencia de flh84g5 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agentes etiquetado o no etiquetado capaz de detectar polipéptido flh84g5 o mRNA en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de flh84g5 en la muestra; y medios para comparar la cantidad de flh84g5 en la muestra con un estándar. El compuesto o agente puede estar empaquetado en un envase adecuado. El kit además contiene instrucciones para uso del kit para detectar flh84g5 mRNA o polipéptido.

La invención permite que los métodos que pueden usarse detecten las mutaciones que ocurren de manera natural en un gen flh84g5, determinando de este modo si el sujeto con el gen mutado corre riesgo de un desorden caracterizado por expresión aberrante o anormal de ácido nucleico flh84g5 o actividad de polipéptido flh84g5 como aquí se describe.

Los métodos incluyen la detección, en una muestra de células de un sujeto, la presencia o ausencia de una mutación genética caracterizada por al menos una alteración que afecta la integridad de un gen que codifica un polipéptido flh84g5, o la expresión equivocada del gen flh84g5. Por ejemplo, tales mutaciones genéticas pueden detectarse averiguando o estableciendo la existencia de al menos uno de 1) una eliminación de uno o más nucleótidos de un gen flh84g5; 2) una adición de uno o más nucleótidos de un gen flh84g5; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen flh84g5; 4) una recolocación de cromosomas de un gen flh84g5; 5) una alteración en el nivel de una transcripción mensajera ARN de un gen flh84g5; 6) modificación aberrante de un gen flh84g5, como de un patrón de metilación de ADN genómico, 7) la presencia de un patrón de escisión de tipo no salvaje de una transcripción mensajera de ARN de un gen flh84g5, 8) un nivel de tipo no salvaje de un polipéptido flh84g5, 9) pérdida alélica de un gen flh84g5, y 10) modificación post-traslacional inapropiada de un polipéptido flh84g5. Como aquí se describe, existen un gran número de técnicas de ensayo conocidas en el campo que pueden usarse para detectar mutaciones en un gen flh84g5.

En ciertas realizaciones, la detección de un mutante incluye el uso de una sonda/imprimador en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) (ver, por ejemplo, Patente US Nos. 4,683,195 y 4,683,202), como un ancla PCR o RACE PCR, o, de manera alternativa, en una reacción en cadena de litigación (LCR) (ver, por ejemplo, Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa *et al.* (1994) *PNAS* 91:360-364), y éste último puede ser particularmente útil para detectar mutaciones de punto en el gen flh84g5 (ver Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). Este método puede incluir los pasos de recoger una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, genómico, mRNA o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más imprimadores que específicamente hibridizan con un gen flh84g5 bajo tales condiciones que la hibridización y amplificación del gen flh84g5 (si esta presente) se da, y la detecta la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detecta el tamaño del producto de amplificación y compara la longitud con una muestra de control.

En una realización alternativa, las mutaciones en un gen flh84g5 de una célula muestra pueden identificarse mediante alteraciones en patrones de segmentación de restricción de enzimas. Por ejemplo, el ADN de la muestra y control se aísla, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más edonucleasas de restricción, y los tamaños de longitud de fragmentos de determinan mediante electroforesis de gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de longitud de fragmento entre la muestra y el control ADN indica las mutaciones en la muestra de ADN. Además, el uso de ribozimas específicos de secuencias (ver, por ejemplo, Patente US No. 5,498,531) pueden usarse para marcar la presencia de mutaciones específicas por el desarrollo o pérdida de un punto de segmentación de ribozima.

En otra realización, cualquier variedad de relaciones secuenciales conocida en la técnica puede usarse para secuenciar directamente el gen flh84g5 y detectar mutaciones mediante la comparación de la secuencia e la muestra flh84g5 con la correspondiente secuencia (control) de tipo salvaje. Ejemplos de relaciones secuenciales incluyen aquellas basadas en la técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert ((1977) *PNAS* 74:560) o Sanger ((1977) *PNAS* 74:5463). Una variedad de procedimientos secuenciales automatizados pueden utilizarse cuando se llevan a cabo ensayos de diagnóstico ((1995) *Biotechniques* 19:448), incluyendo secuencias por espectrometría de masa (ver, por ejemplo, Publicación Internacional PCT No. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chormatogr.* 36:127-162; y Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

Otros métodos para la detección de mutaciones en el gen *flh84g5* incluyen métodos en los cuales la protección de agentes de segmentación se usa para detectar bases mal emparejadas en dúplex ARN/ARN o ARN/ADN (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242); Cotton *et al.* (1988) *PNAS* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295), movilidad electroforética ácido nucleico mutante y de tipo salvaje se compara (Orita *et al.* (1989) *PNAS* 86:2766; Cotton (1993) *Mutat Res* 285:125-144; y Hayashi (1992) *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79), y movimiento de fragmentos mutantes o de tipo salvaje en geles de poli(acrilamida) que contienen un gradiente denaturante se ensaya usando electroforesis de gel gradiente denaturante (Myers *et al.* (1985) *Science* 313:495). Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones de punto incluyen, hibridización de oligonucleótido selectiva, amplificación selectiva, y extensión de imprimador selectiva.

c. Métodos de Tratamiento

En otro aspecto la invención permite métodos para el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un humano, que tiene una enfermedad o desorden caracterizado por (o asociado con) expresión aberrante o anormal de ácido nucleico *flh84g5* y/o actividad de polipéptido *flh84g5*. Estos métodos incluyen la administración de un modulador *flh84g5* (agonista o antagonista) al sujeto de tal modo que el tratamiento tenga lugar. Los términos “expresión aberrante o anormal de *flh84g5*” se refiere a la expresión de un polipéptido *flh84g5* de tipo no salvaje de actividad *flh84g5*. Cuando el polipéptido *flh84g5* está implicado en una ruta que incluye liberación de modulación del neurotransmisor, por ejemplo, acetilcolina o una molécula similar a la acetilcolina como cranitina; modulación de contracción de musculatura lisa, por ejemplo, función glandular exocrina, actividad o expresión aberrante o anormal de *flh84g5* interfiere con el neurotransmisor, por ejemplo, acetilcolina o una molécula similar a la acetilcolina como cranitina; musculatura lisa normal; y contracción de musculatura cardíaca; y glándula normal, por ejemplo, función glandular exocrina. Ejemplos no limitativos de desórdenes o enfermedades caracterizadas por o asociadas con actividad o expresión aberrante o anormal de *flh84g5* incluyen desórdenes relacionados con el sistema nervioso; por ejemplo, desórdenes relacionados con el sistema nervioso central. Ejemplos de desórdenes relacionados con el sistema nervioso incluyen desórdenes cognitivos, por ejemplo, desórdenes de la memoria y aprendizaje, como amnesia, apraxia, agnosia, disnomia amnésica, desorientación espacial amnésica, síndrome Kluver-Bucy, pérdida de memoria relacionada con el Alzheimer (Eglen R.M. (1996) *Pharmacol. And Toxicol.* 78(2):59-68; Perry E.K. (1995) *Brain and Cognition* 28(3):240-58) y pérdida de habilidad para el aprendizaje; desórdenes que afectan la consciencia, por ejemplo, alucinaciones visuales, alteraciones perceptuales, o delirio asociado con la demencia corporal Lewy; desórdenes esquizo-efectivos (Dean B. (1996) *Mol. Psychiatry* 1(1):54-8), esquizofrenia con cambios de humor (Bymaster F.P. (1997) *J. Clin. Psychiatry* 58 (suppl.10):28-36; Yeomans J.S. (1995) *Neuropharmacol.* 12(1):3-16; Reimann D. (1994) *J. Psychiatric Res.* 28(3):195-210), enfermedad depresiva (primaria o secundaria); desórdenes afectivos (Janowsky D.S. (1994) *Am. J. Med. Genetics* 54(4):335-44); desórdenes del sueño (Kimura F. (1997) *J. Neurophysiol.* 77(2): 709-16), por ejemplo, anomalías en el sueño REM en pacientes que sufren, por ejemplo, depresiones Reimann D. (1994) *J. Psychiatric Res.* 38 Suppl. 1:15-25; Bourgin P. (1995) *Neuroreport* 6(3):415-23), insomnio, y anomalías en la temperatura corporal o depresión respiratoria durante el sueño (Suman S.L. (1995) *Am. J. Physiol.* 269 (2 Pt 2): R308-17; Mallick B.N. (1997) *Brain Res.* 750 (1-2):311-7). Otros ejemplos de desórdenes relacionados con el sistema nerviosos incluyen desórdenes relacionados con los mecanismos de generación de miedo, por ejemplo, miedo relacionado con el síndrome del intestino irritable (Mitch C.H. (1997) *J. Med. Chem.* 40(4):538-46; Shannon H.E. (1997) *J. Pharmacol. And Exp. Therapeutics* 281(2):884-94; Bouaziz H. (1995) *Anesthesia and Analgesia* 80(6):1140-4; o Guimaraes A.P. (1994) *Brain Res.* 647(2):220-30) o dolor en el pecho; desórdenes motrices (Monassi C.R. (1997) *Physiol. And Behav.* 62(1):53-9), por ejemplo, desórdenes motrices relacionados con la enfermedad de Parkinson (Finn M. (1997) *Pharmacol. Biochem. & Behaviour* 57(1-2):243-9; Mayorga A.J. (1997) *Pharmacol. Biochem. & Behaviour* 56(2):273-9); desórdenes alimenticios, por ejemplo, obesidad relacionada con la hipersecreción de insulina (Macario M. (1997) *J. Endocrinol. Invest.* 20(1):8-12; Premawardhana L. D. (1994) *Clin. Endocrinol.* 40(5):617-21); o desórdenes con las bebidas, por ejemplo, polidipsia diabética (Murzi E. (1997) *Brain Res.* 752(1-2):184-8); Yang X. (1994) *Pharmacol. Biochem. & Behaviour* 49(1):1-6). Aún más ejemplos de desórdenes o enfermedades caracterizadas por o asociadas con la actividad o expresión aberrante o anormal de *flh84g5* incluyen desórdenes relacionados con la musculatura lisa como síndrome del intestino irritable, enfermedad diverticular, incontinencia urinaria, acalasia esofágica, o enfermedad de obstrucción de las vías respiratorias crónica; desórdenes relacionados con la musculatura del corazón, como bradicardia patológica o taquicardia, arritmia, palpitación o fibrilación; o desórdenes relacionados con las glándulas tales como xerostomía, diabetes mellitus. Los términos “tratar” o “tratamiento” como aquí se emplean, se refieren a la reducción o disminución de al menos un efecto o síntoma adverso de un desorden o enfermedad, por ejemplo, desorden o enfermedad caracterizada por o asociada con la actividad o expresión aberrante o anormal de *flh84g5*.

Como aquí se emplea, un modulador *flh84g5* es una molécula que puede modular expresión de ácido nucleico *flh84g5* y/o actividad de polipéptido *flh84g5*. Por ejemplo, un modulador *flh84g5* puede modular, por ejemplo, regular por incremento (activar/agonizar) o regular por disminución (suprimir/antagonizar), expresión de ácido nucleico *flh84g5*. En otro ejemplo, un modulador *flh84g5* puede modular (por ejemplo, estimular/agonizar o inhibir/antagonizar) actividad de polipéptido *flh84g5*. Si se desea tratar un desorden o enfermedad caracterizado por (o asociado con) expresión aberrante o anormal de ácido nucleico *flh84g5* y/o actividad de polipéptido *flh84g5* inhibiendo la expresión de ácido nucleico *flh84g5*, un modulador *flh84g5* puede ser una molécula antisentido, por ejemplo, un ribozima, como aquí se describe. Ejemplos de moléculas antisentido que pueden usarse para inhibir expresión de ácido nucleico *flh84g5* incluyen moléculas antisentido que son complementarias con una porción de la región no traducida 5' de SEC ID NO: 1 que también incluye el codón de inicio y moléculas antisentido que son complementarias con una porción de la región no traducida 3' de SEC ID NO: 1, 4 o 31. Un ejemplo de molécula antisentido que es complementaria con una porción de la región no traducida 5' de SEC ID NO: 1 y que también incluye el codón de inicio es una

molécula de ácido nucleico que incluye nucleótidos que son complementarios con los nucleótidos 280 a 296 de SEC ID NO:1. Esta molécula antisentido tiene la siguiente secuencia nucleotídica: 5' CCTGCGGGGCCATGGAG 3' (SEC ID NO:21). Un ejemplo de una molécula antisentido que es complementaria con una porción de la región no traducida 3' de SEC ID NO: 1 es una molécula de ácido nucleico que incluye nucleótidos que son complementarios con los nucleótidos 1629 a 1645 de SEC ID NO:1. Esta molécula antisentido tiene la siguiente secuencia: 5' GTGGCCAC-CAGAGCCT 3' (SEC ID NO:22). Un ejemplo adicional de una molécula antisentido que es complementaria con una porción de la región no traducida 3' de SEC ID NO: 1 es una molécula de ácido nucleico que incluye nucleótidos que son complementarios con los nucleótidos 1650 a 1666 de SEC ID NO:1. Esta molécula antisentido tiene la siguiente secuencia: 5' CAGCCACGCCTCTCTCA 3' (SEC ID NO:23). Un ejemplo de una molécula antisentido que es complementaria con una porción de la región no traducida 5' de SEC ID NO: 4 y que también incluye el codón de inicio es una molécula de ácido nucleico que incluye nucleótidos que son complementarios con los nucleótidos 766 a 783 de SEC ID NO:4. Esta molécula antisentido tiene la siguiente secuencia nucleotídica: 5' GCCTGCTGGGCCATGGAG 3' (SEC ID NO:24). Un ejemplo de una molécula antisentido que es complementaria con una porción de la región no traducida 3' de SEC ID NO: 4 es una molécula de ácido nucleico que incluye nucleótidos que son complementarios con los nucleótidos 2113 a 2128 de SEC ID NO:4. Esta molécula antisentido tiene la siguiente secuencia: 5' TGAG-CAGCTGCCCCAC 3' (SEC ID NO:25). Un ejemplo adicional de una molécula antisentido que es complementaria con una porción de la región no traducida 3' de SEC ID NO: 4 es una molécula de ácido nucleico que incluye nucleótidos que son complementarios con los nucleótidos 2133 a 2148 de SEC ID NO:4. Esta molécula antisentido tiene la siguiente secuencia: 5' CTGAGGCCAGGCCCTT 3' (SEC ID NO:26).

Un modulador flh84g5 que inhibe expresión de ácido nucleico flh84g5 puede ser también una molécula pequeña u otro fármaco, por ejemplo, una molécula pequeña o fármaco identificado usando los ensayos de análisis aquí descritos, que inhibe la expresión de ácido nucleico flh84g5. Si se desea tratar una enfermedad o desorden caracterizado por (o asociado con) expresión aberrante o anormal (no de tipo salvaje) de ácido nucleico flh84g5 y/o actividad de polipéptido flh84g5 estimulando la expresión de ácido nucleico flh84g5, un modulador flh84g5 puede ser, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica flh84g5 (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica homóloga a la secuencia nucleotídica de SEC ID NO:1, 4, o 31) o una pequeña molécula u otro fármaco, por ejemplo, una molécula pequeña (péptido) o fármaco identificado usando los ensayos de análisis aquí descritos, que estimula la expresión de ácido nucleico flh84g5.

De manera alternativa, si se desea tratar una enfermedad o desorden caracterizado por (o asociado con) expresión aberrante o anormal (no de tipo salvaje) de ácido nucleico flh84g5 y/o actividad de polipéptido flh84g5 inhibiendo la actividad de polipéptido flh84g5, un modulador flh84g5 puede ser un anticuerpo anti-flh84g5 o una molécula pequeña u otro fármaco, por ejemplo, una molécula pequeña o fármaco identificado usando los ensayos de análisis aquí descritos, que inhibe la actividad de polipéptido flh84g5. Si se desea tratar una enfermedad o desorden caracterizado por (o asociado con) expresión aberrante o anormal (no de tipo salvaje) de expresión de ácido nucleico flh84g5 y/o actividad de polipéptido flh84g5 estimulando la actividad de polipéptido flh84g5, un modulador flh84g5 puede ser un polipéptido activo flh84g5 o una porción del mismo (por ejemplo, un polipéptido flh84g5 o una porción del mismo que tiene una secuencia de aminoácido que es homóloga a la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, 5, o 32 o una porción de la misma) o una molécula pequeña u otro fármaco, por ejemplo, una molécula pequeña o fármaco identificado usando los ensayos de análisis aquí descritos, que estimula la expresión de ácido nucleico flh84g5.

Otros aspectos de la invención pertenece a métodos para modular una actividad asociada a la célula. Estos métodos incluyen el contacto de la célula con un agente (o una composición que incluye la cantidad eficaz de un agente) que modula la actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5 de tal modo que la actividad asociada con la célula se altere en relación con la actividad asociada con la célula (por ejemplo, metabolismo fosfatidilinositol) de la célula en ausencia del agente. Como aquí se emplea, "una actividad asociada a la célula" se refiere a una actividad o función normal o anormal de una célula. Ejemplos de actividades asociadas a células incluyen movimiento fosfatidilinositol, producción o secreción de moléculas, como proteínas, contracción, proliferación, migración, diferenciación, y supervivencia celular. En una realización preferente, la célula es célula neural del cerebro, por ejemplo, un célula hipocámpal. El término "alterado" como aquí se usa se refiere a un cambio, por ejemplo, un aumento o un descenso, de una actividad asociada a la célula particularmente movimiento fosfatidilinositol y activación fosfolipasa C. En una realización, el agente estimula actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5. Ejemplos de tales agentes estimulatorios incluyen un polipéptido activo flh84g5, una molécula de ácido nucleico que codifica flh84g5 que se ha introducido en la célula, y un agente modulador que estimula actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5 y que se identifica usando los ensayos de análisis de fármacos aquí descritos. En otra realización, el agente inhibe la actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5. Ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen una molécula antisentido de ácido nucleico flh84g5, un anticuerpo anti-flh84g5, y un agente modulador que inhibe actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5 y que se identifica usando los ensayos de análisis de fármacos aquí descritos. Los métodos moduladores pueden llevarse a cabo *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente), o de manera alternativa, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente al sujeto). En una realización preferente, los métodos moduladores se llevan a cabo *in vivo*, es decir, la célula está presente dentro de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un humano, y el sujeto tiene un desorden o enfermedad caracterizado por o asociado con la expresión aberrante o anormal de actividad de polipéptido flh84g5 o expresión de ácido nucleico flh84g5.

Una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un modulador flh84g5, un compuesto, etc, empleados en los métodos de tratamiento pueden incorporarse en una composición farmacéutica apropiada aquí descrita y administrarse

al sujeto a través de una ruta que permita a la molécula, polipéptido, modulador, o compuesto llevar a cabo su función. Ejemplos de rutas de administración también se describen aquí bajo la subsección VI.

d. Farmacogenómica

5 Los compuestos de test/candidatos, o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad flh84g5 (por ejemplo, expresión de gen flh84g5) como se identifica por un ensayo de análisis aquí descrito puede administrarse a individuos para tratar (profilácticamente o terapéuticamente) desórdenes (por ejemplo, desórdenes) asociados con actividad aberrante de flh84g5. En conjunción con dicho tratamiento, la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta del individuo a un compuesto o fármaco externo) del individuo puede considerarse. Diferencias en el metabolismo de terapéutica puede llevar a toxicidad severa o fallo terapéutico alterando la relación entre la dosis y concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Por lo tanto, la farmacogenómica del individuo permite la selección de compuesto eficaces (por ejemplo, fármacos) para tratamientos profilácticos o terapéuticos basados en la consideración del genotipo del individuo. Tal farmacogenómica puede además emplearse para determinar dosis apropiadas y regímenes terapéuticos. Por consiguiente, la actividad de polipéptido flh84g5, expresión de ácido nucleico flh84g5, o contenido de mutación de genes flh84g5 en un individuo pueden determinarse para seleccionar de este modo compuestos apropiados para tratamiento profiláctico o terapéutico del individuo.

20 La farmacogenómica trata con variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a fármacos debido a la disposición alterada del fármaco y a la acción anormal en personas afectadas. Ver, por ejemplo, Eichelbaum, M. (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(10-11):983-985 y Linder, M.W. (1997) *Clin. Chem.* 43 (2):254-266. En general, se pueden diferenciar dos tipos de condiciones farmacogenéticas. Las condiciones genéticas transmitidas como un único factor que altera el modo en el que los fármacos actúan en el cuerpo (acción de fármaco alterado) o condiciones genéticas transmitidas como factores únicos que alteran el modo en el que el cuerpo actúa en el fármaco (metabolismo de fármaco alterado). Estas condiciones farmacogenéticas pueden darse como defectos raros o como polimorfismos. Por ejemplo, deficiencia dehidrogenasa glucosa-6-fosfatasa (G6PD) es un encimopatía común heredada en la cual la principal complicación clínica es hemólisis después de ingestión de fármacos oxidantes (antimalariales, sulfonamidas, anagésicos, nitrofuranes) y consumo de alubias fava.

30 Como una realización ilustrativa, la actividad de enzimas que metabolizan los fármacos es un principal determinante de la intensidad y duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan fármacos (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y citocromo P450 enzimas CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación sobre por qué algunos pacientes no obtienen los efectos esperados del fármaco o muestran una respuesta al fármaco exagerada y toxicidad grave tras tomar la dosis segura y estándar de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador extensivo (EM) y el metabolizador pobre (PM). La prevalencia de PM es diferente entre las diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado varias mutaciones en PM, lo que lleva a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores pobres de CYP2D6 y CYP2C19 bastante a menudo experimentan respuesta exagerada al fármaco y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es la molécula terapéutica activa, PM no muestra respuesta terapéutica, como se demostró para el efecto analgésico de codeína mediada por su morfina de metabolito formada por CYP2D6. Los otros extremos son los llamados metabolizadores ultrarápidos que no responden a dosis estándar. Recientemente, la base molecular de metabolismo ultrarápido se ha identificado debido a la amplificación del gen CYP2D6.

45 Por lo tanto, la actividad del polipéptido flh84g5, expresión de ácido nucleico flh84g5, o contenido de mutación de genes flh84g5 en un individuo pueden determinarse para seleccionar de este modo compuestos apropiados para tratamiento profiláctico o terapéutico de un sujeto. Además, los estudios de farmacogenómica pueden usarse para aplicar genotipos de alelos polimórficos que codifican enzimas que metabolizan fármacos para la identificación de fenotipo de sensibilidad a un fármaco de un sujeto. Este conocimiento, cuando se aplica a dosis o selección de fármacos, puede evitar las reacciones adversas o fallo terapéutico y por lo tanto mejor la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con un modulador flh84g5, como un modulador identificado por uno de los ensayos de análisis ejemplares aquí descritos.

55 e. Control de Efectos Durante Ensayos Clínicos

El control de la influencia de compuestos (p. ej., fármacos) en la expresión o actividad de flh84g5 (por ejemplo, la habilidad para modular los efectos de ligando flh84g5 sobre células sensibles al ligando flh84g5) puede aplicarse no sólo en análisis básico de fármaco, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente determinada por un ensayo de análisis, como aquí se describe, para aumentar la expresión de gen flh84g5, niveles de polipéptido, o sobreregular la actividad flh84g5, puede controlarse en ensayos clínicos de sujetos que muestren expresión de gen flh84g5 disminuida, niveles de polipéptido, o actividad flh84g5 subregulada. De manera alternativa, la eficacia de un agente, determinada por un ensayo de análisis para disminuir la expresión de gen flh84g5, niveles de polipéptido, o subregular la actividad flh84g5, puede controlarse en ensayos clínicos de sujetos que muestren expresión de gen flh84g5 aumentada, niveles de polipéptido, o actividad flh84g5 sobreregularada. En tales ensayos clínicos, la expresión o actividad de flh84g5 y, preferentemente, otro genes que se han implicado en, por ejemplo, un desorden relacionado con el sistema nervioso puede usarse como una "lectura" o marcadores de la sensibilidad del ligando flh84g5 de una célula particular.

Por ejemplo, y no como modo de limitación, los genes, incluyendo flh84g5, que se modulan en células mediante tratamiento con un compuesto (por ejemplo, fármaco o molécula pequeña) que modula actividad flh84g5 (por ejemplo, identificada en un ensayo de análisis como el aquí descrito) puede identificarse. Por lo tanto, para estudiar el efecto de compuestos sobre desórdenes SNC, por ejemplo, en un ensayo clínico, las células pueden aislarse de ARN preparado y analizado para los niveles de expresión de flh84g5 y otros genes implicados en el desorden. Los niveles de expresión de gen (es decir, un patrón de expresión de gen) puede cuantificarse mediante análisis de Western Blot o RT-PCR, como aquí se ha descrito, o de manera alternativa midiendo la cantidad de polipéptido producido, mediante uno o varios métodos aquí descritos, o midiendo los niveles de actividad de flh84g5 u otros genes. De este modo, el patrón de expresión del gen puede servir como un marcador, indicativo de la respuesta fisiológica de las células con el compuesto. Por consiguiente, este estado de respuesta puede determinarse antes, y en varios puntos durante, del tratamiento del individuo con el compuesto.

La presente invención permite un método para el control de eficacia de tratamiento de un sujeto con un compuesto (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro fármaco candidato identificado por los ensayos de análisis aquí descritos) comprendiendo los pasos de (i) obtener una muestra de pre-administración de un sujeto antes de la administración del compuesto; (ii) detectar el nivel de expresión de un polipéptido flh84g5, mRNA, o ADN genómico en la muestra de preadministración; (iii) obtener una o más muestras postadministración de un sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad del polipéptido flh84g5, mRNA, o ADN genómico en las muestras post-administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad del polipéptido flh84g5, mRNA, o ADN genómico en la muestra o muestra post-administración con el polipéptido flh84g5, mRNA, o ADN genómico en la muestra o muestra post-administración y (vi) alterar la administración de un compuesto al sujeto como corresponda. Por ejemplo, la administración aumentada del compuesto puede desearse para aumentar la expresión o actividad de flh84g5 a niveles más elevados de los detectados, es decir, para aumentar la eficacia del agente. De manera alternativa, la administración disminuida del agente puede desearse para disminuir la expresión o actividad flh84g5 a niveles inferiores que los detectados, es decir, para disminuir la eficacia del compuesto.

VI. Usos de Secuencias Parciales de flh84g5

Las porciones o fragmentos de las secuencias de cADN aquí identificadas (y las secuencias correspondientes de gen completas) pueden usarse de numerosas maneras como reagentes polinucleótidos. Por ejemplo, estas secuencias pueden usarse para: (a) trazar el mapa de sus respectivos genes sobre un cromosoma; y por lo tanto, localizar regiones de gen asociada a enfermedad genética; (b) identificar un individuo a partir de una muestra diminuta biológica (clasificación de tejido); y (c) ayudar en identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en subsecciones a continuación.

a. Trazado del Mapa de Cromosomas

Una vez que la secuencia (o una porción de la secuencia) de un gen se ha aislado, esta secuencia puede usarse para trazar la localización de un gen en un cromosoma. Este proceso se llama trazado de mapa de cromosomas. Por consiguiente, las porciones o fragmentos del flh84g5, secuencias, aquí descritas, pueden usarse para trazar el mapa de la localización del gen flh84g5, respectivamente, en un cromosoma. El trazado de mapa de la secuencia flh84g5 para cromosomas es un primer paso importante en la correlación de estas secuencias con genes asociados con enfermedad.

En resumen, el gen flh84g5 puede trazarse en el mapa con un cromosoma preparando imprimadores PCR (preferentemente, 15-25 bp en longitud) de la secuencia flh84g5. Los análisis por ordenador del flh84g5, la secuencia puede usarse para seleccionar rápidamente imprimadores que no abarcan más de un exón en el ADN genómico, por lo tanto complicando el proceso de amplificación. Estos imprimadores pueden complicar el proceso de amplificación. Estos imprimadores pueden usarse para análisis PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Sólo aquellos híbridos que contengan el gen humano correspondiente a la secuencia flh84g5 producirán un fragmento diferente.

Los híbridos de célula somática se preparan fusionando células somáticas de diferentes mamíferos (por ejemplo, células humanas y de ratones). Cuando los híbridos de células de humanos y ratones crecen y se dividen, gradualmente pierden los cromosomas humanos en orden arbitrario, pero retienen los cromosomas de ratón. Usando un medio en el cual las células de ratones no pueden crecer, porque carecen de una enzima particular, pero las células humanas pueden, el cromosoma humano que contiene el gen que codifica la enzima necesaria, será retenido. Usando este medio, los paneles de líneas celulares híbridas pueden establecerse. Cada línea celular en un panel contiene un único cromosoma humano o un pequeño número de cromosomas humanos, y un grupo completo de cromosomas de ratón, permitiendo un sencillo trazado de mapa de genes individuales por cromosomas humanos específicos. (D'Eustachio P. *et al.* (1983) *Science* 220:919-924). Los híbridos de células somáticas que contienen sólo fragmentos de cromosomas humanos puede también producirse usando cromosomas humanos con traslocaciones y supresiones.

El trazado de mapa PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar una secuencia particular a un cromosoma particular. Pueden asignarse tres o más secuencias por día usando un único temporizador termal. Usando la secuencia flh84g5 para diseñar imprimadores oligonucleótidos, la sublocalización puede conseguirse con paneles de fragmentos de cromosomas específicos. Otras estrategias de trazado de mapas que pueden usarse de manera similar para trazar una secuencia flh84g5 con su cromosoma incluyen hibridización *in situ* (descrita en Fan,

Y. *et al.* (1990) PNAS, 87:6223-27), pre-análisis con cromosomas etiquetados de tipo fluido, y pre-selección por hibridización con bibliotecas cADN específicas de cromosoma.

5 La hibridización fluorescente *in situ* (FISH) de una secuencia de ADN con una extensión cromosomal de metafase pueden además usarse para proporcionar una localización precisa cromosomal en un paso. Las extensiones cromosomales pueden hacerse usando células cuya división se ha bloqueado en metafase por una sustancia química similar a la colcemida que interrumpe el eje mitótico. Los cromosomas pueden tratarse brevemente con tripsina, y luego tintarse con Giemsa. Una patrón de tiras claras y oscuras se desarrolla en cada cromosoma, para que los cromosomas se identifiquen de manera individual. La técnica FISH puede usarse con una secuencia de ADN tan corto como 500 o 600
10 bases. Sin embargo, los clones más grandes que 1,000 bases tienen una mayor probabilidad de enlace con una única localización cromosomal con suficiente intensidad de señal para la simple detección. Preferentemente, 1,000 bases, y más preferentemente 2,000 bases serán suficientes como para conseguir buenos resultados en una cantidad razonable de tiempo. Para una revisión de esta técnica, ver, Verma *et al.*, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988).

15 Los reagentes para trazado de mapa de cromosomas pueden usarse individualmente para marcar un cromosoma sencillo o un punto sencillo en dicho cromosoma, o paneles de reagentes pueden usarse para marcar puntos múltiples y/o cromosomas múltiples. Los reagentes correspondientes a regiones no codificadoras de los genes son en realidad preferibles para fines de trazado de mapas. Las secuencias de codificación tienen más posibilidades de conservarse
20 en las familias de genes, aumentando por lo tanto la opción de hibridización cruzada durante el trazado de mapa cromosomal.

Una vez que la secuencia se ha trazado para una localización cromosomal precisa, la posición física de la secuencia del cromosoma puede correlacionarse con datos de mapa genético (tales datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man, disponible on-line a través de Johns Hopkins Welch Medical Library). La relación entre los genes y enfermedades, trazados para la misma región cromosomal, pueden luego identificarse por medio de análisis de enlace (co-herencia de genes físicamente adyacentes), descritos en, por ejemplo, Egeland, J. *et al.* (1987) Nature, 325:783-787.

30 Además, las diferencias en las secuencias de ADN entre individuos afectados y no afectados con una enfermedad asociada al gen *flh84g5* pueden determinarse. Si se observa una mutación en algunos o todos los individuos afectados pero no en los individuos no afectados, entonces la mutación tiene posibilidades de ser el agente causativo de la enfermedad particular. La comparación de individuos afectados y no afectados generalmente implica un primer vistazo a las alteraciones estructurales en los cromosomas, como supresiones o traslocaciones que son visibles desde las extensiones de cromosoma o detectables usando PCR basado en esa secuencia de ADN. Por último, la secuencia completa de genes de varios individuos puede llevarse a cabo para confirmar la presencia de una mutación y para distinguir mutaciones de polimorfismos.

b. Clasificación de Tejido

40 Las secuencias de *flh84g5* de la presente invención también pueden usarse para identificar individuos de muestras biológicas diminutas. Las fuerzas armadas de Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, un ADN genómico del individuo se digiere con una o más enzimas de restricción, y se investiga en un Southern Blot para producir
45 tiras únicas para identificación. Este método no sufre las limitaciones actuales de "Dog Tags" que pueden perderse, cambiarse, o robarse, haciendo difícil la identificación positiva. Las secuencias de la presente invención son útiles como marcadores adicionales de ADN para RFLP (descrito en Patente U.S 5,272,057). Además, las secuencias de la presente invención puede usarse para proporcionar una técnica alternativa que determina la secuencia real ADN base-por-base de porciones seleccionadas de un genoma de individuo. Por lo tanto, las secuencias *flh84g5* aquí descritas
50 pueden usarse para preparar de dos imprimadores PCR de los extremos 3' y 5' de las secuencias. Estos imprimadores pueden usarse para amplificar un ADN de individuo y posteriormente secuenciarlo.

Los paneles de secuencias correspondientes de ADN de individuos, preparados de esta manera, pueden proporcionar identificaciones únicas individuales, ya que cada individuo tendrá un único grupo de tales secuencias de ADN debido a las diferencias alélicas. Las secuencias de la presente invención pueden usarse para obtener tales secuencias de identificación a partir de individuos y de tejido. Las secuencias *flh84g5* de la invención únicamente representan porciones del genoma humano. La variación alélica se da en cierto grado en las regiones codificadoras de estas secuencias, y en un grado mayor en las regiones no codificadoras. Se estima que la variación alélica entre los humanos
55 individuos se da con una frecuencia de aproximadamente una vez por cada 500 bases. Cada una de las secuencias aquí descritas puede, hasta cierto grado, usarse con un estándar con el cual ADN de un individuo puede compararse para fines de identificación. Debido a que grandes números de polimorfismos se dan en las regiones no codificadoras, son necesarias menos secuencias para diferenciar individuos. Las secuencias no codificadoras de SEC ID NO: 1, 4 y 31, puede proporcionar de manera cómoda identificación individual positiva con un panel de quizás 10 a 10,000 imprimadores que cada uno produce una secuencia amplificada no codificadora de 100 bases. Si se predicen las secuencias
60 codificadoras, como aquellas en SEC ID NOS: 3, 6, y 33, y se usan, un número más apropiado de imprimadores para la identificación individual positiva sería 500-2,000.

Si un panel de reagentes de secuencias flh84g5 aquí descrito se emplea para generar una única base de datos de identificación para un individuo, aquellos mismos reagentes pueden usarse posteriormente para identificar tejido de tal individuo. Usando la única base de datos de identificación, la identificación positiva del individuo, vivo o muerto, puede realizarse a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas.

c. *Uso de Secuencias Parciales de flh84g5 en Biología Forense*

Las técnicas de identificación basadas en ADN pueden también usarse en biología forense. La biología forense es un campo científico que emplea la clasificación genética de evidencia biológica encontrada en la escena del crimen como un medio para identificar de manera positiva, por ejemplo, un perpetrador de un crimen. Para hacer tal identificación, puede emplearse tecnología PCR para amplificar secuencias de ADN tomadas de muestras biológicas muy pequeñas como tejidos, por ejemplo, pelo o piel, fluidos corporales, por ejemplo, sangre, saliva, o semen encontrado en una escena del crimen. La secuencia amplificada puede compararse posteriormente con una estándar, permitiendo de este modo la identificación del origen de la muestra biológica.

Las secuencias de la presente invención pueden usarse para proporcionar reagentes polinucleótidos, por ejemplo, imprimadores PCR, dirigidos a locus específicos en el genoma humano, que puede mejorar la fiabilidad de identificaciones forenses basadas en ADN mediante, por ejemplo, proporcionando otro “marcador de identificación” (es decir, otra secuencia de ADN que es única a un individuo particular). Como se ha descrito anteriormente, la información de secuencia de base real puede usarse para identificación como una alternativa precisa para patrones formados por fragmentos genados por enzima de restricción. Las secuencias dirigidas a regiones no codificadoras de SEC ID NO:1, 4 y 31 son particularmente apropiadas para este uso ya que números más elevados de polimorfismos ocurren en las regiones no codificadoras, haciendo más fácil diferenciar individuos usando esta técnica. Ejemplos de reagentes polinucleótidos incluyen las secuencias flh84g5 o porciones de las mismas, por ejemplo, fragmentos derivados de las regiones no codificadoras SEC ID NO:1, 4 y 31, que tienen una longitud de al menos 20 bases, preferentemente al menos 30 bases.

Las secuencias flh84g5 aquí descritas pueden además usarse para proporcionar reagentes polinucleótidos, por ejemplo, sondas etiquetadas o etiquetables que pueden usarse en, por ejemplo, una técnica de hibridización *in situ*, para identificar un tejido específico, por ejemplo, tejido de cerebro. Esto puede resultar muy útil en casos donde un patólogo forense se encuentra con un tejido de origen desconocido. Paneles como las sondas flh84g5 pueden usarse para identificar tejido por especies y/o por tipo de órgano.

De un modo similar, estos reagentes, por ejemplo, imprimadores o sondas flh84g5 pueden usarse para analizar contaminación en el cultivo de tejido (es decir, analizar la presencia de una mezcla de tipos diferentes de células en un cultivo).

Esta invención se ilustra además por medio de los siguientes ejemplos que no deben considerarse como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de Cadn flh84g5 de rata o humano

En este ejemplo, se identificaron moléculas de ácido nucleico flh84g5 analizando bibliotecas de cADN apropiadas. Más específicamente, una corteza frontal oligo dT-impreso biblioteca cADN se colocó en placas y las colonias se recobieron en placas de 96 pozos. Las colonias se cultivaron, los plásmidos se prepararon de cada pozo, y el extremo 5' de cada secuencia de inserción. Después del recorte automatizado de las secuencias no-inserción, las secuencias nucleótidas se compararon con las bases de datos de proteínas públicas usando el programa de comparación secuencial BLAST (BLASTN1.3MP, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403). Tras la revisión de los resultados de esta comparación secuencial, se identificó un único clon, designado 84g5, cuya similaridad más elevada fue con el receptor de acetilcolina de rata muscarínica M1 (mACHR M1; GenBank™ Número de Adquisición P08482). El clon que contiene esta secuencia se recuperó de la placa de 96 pozos, el plásmido se preparó usando métodos estándar y la inserción se secuenció por completo usando técnicas estándar “contigging”. Un análisis de repetición BLAST usando la secuencia completa de inserción de nuevo mostró que la secuencia es una base de datos de proteína con la mayor similaridad correspondiente a GenBank™ Número de Adquisición P08482. Esta secuencia y la secuencia de inserción se compararon usando el programa GAP y el paquete de software GCG usando un peso de hueco de 5.000 y un peso de longitud de 0.100. El resultado mostró un 27.9% de identidad y 49.01% de similaridad entre las dos secuencias con la inserción de 4 huecos para alineación de secuencia optimizada. La alineación indicó que el clon 84g5 no se extiende por completo a través de la secuencia P08482, aparentemente perdiendo aproximadamente 30 residuos de aminoácidos en la región terminal N de la molécula. Una sonda que abarca residuos 143-249 de SEC ID NO:31 se usó para reanalizar la misma biblioteca de corteza frontal. Esto dio como resultado la identificación de la secuencia flh84g5 de rata de longitud completa mostrada en SEC ID NO:4. El análisis BLAST de bases de datos públicas de nucleótidos reveló las secuencias humanas no equivalentes. Sólo un único ratón EST se identificó (GenBank™ Número de Adquisición P08482) que es similar al clon flh84g5 entre los residuos 1101 y 1650.

ES 2 285 792 T3

La molécula de ácido nucleico humana flh84g5 se identificó analizando una biblioteca cADN de cerebelo humano usando el fragmento de restricción *Nci I/Not I* del cADN de rata como una sonda. Los análisis BLAST de proteínas y bases de datos de ácido nucleico en el dominio público de nuevo demostró que la molécula de ácido nucleico flh84g5 es más similar a las secuencias mACHR m1. La alineación también reveló que la molécula de ácido nucleico mACHR-6 codifica un polipéptido de completa longitud mACHR.

Ejemplo 2

10 *Expresión de tejido en el gen flh84g5*

Análisis Northern Usando ARN de Tejido Humano y de Rata

Blots Northern de tejido múltiple de cerebro humano (MTN), blots humanos MTN, I, II, y III, y blots de rata MTN (Clontech, Palo Alto, CA), que contiene 2 ug de poli A+ARN por ruta se sondaron con la secuencia nucleótida flh84g5 (fragmento de restricción *Nci I/Not I*). Los filtros se prehibridizaron en 10 ml de solución de hibridización Express Hyb (Clontech, Palo Alto, CA) a 68°C durante 1 hora, después de los cuales 100 ng de sonda etiquetada ³²P se añadió. La sonda se generó usando kit Stratagene-Prime, Número de Catálogo 300392 (Clontech, Palo Alto, CA). La hibridización se llevó a cabo para proceder a 68°C durante aproximadamente 2 horas. Los filtros se lavaron en una solución 0.05% SDS/2X SSC durante 15 minutos a temperatura ambiente y después dos veces con solución 0.1% SDS/1X SSC durante 20 minutos y después se expuso a capa de autoradiografía durante la noche a 80°C con una pantalla. Los tejidos humanos examinados incluyeron: corazón, cerebro (regiones del cerebro examinadas incluyeron el cerebelo, corteza cerebral, la médula, polo occipital, lóbulo frontal, el lóbulo temporal, el *putamen*, el *corpus callosum* *amígdala*, núcleo caudado, hipocampo, la sustancia negra, el núcleo subtalámico y el tálamo), placenta, pulmón, hígado, musculatura del esqueleto, hígado, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, intestino delgado, colon, leucocito de sangre periférico, estómago, tiroides, médula espinal, nódulo linfático, tráquea, glándula adrenal y médula ósea.

Hubo una fuerte hibridización con el cerebro humano completo, las siguientes regiones de cerebro humano: el cerebelo, corteza cerebral, la médula, polo occipital, lóbulo frontal, el lóbulo temporal, el *putamen*, el *corpus callosum* *amígdala*, núcleo caudado, hipocampo, la sustancia negra, el núcleo subtalámico y el tálamo; y el cerebro de la rata indicacndo que aproximadamente 3 kb trascripción de gen flh84g5 se expresa en estos tejidos. También hubo hibridización con la médula espinal humana.

35 *Hibridización In Situ*

Para análisis *in situ*, el cerebro de una rata adulta Sprague-Dawley se retiró y se congeló en hielo seco. Secciones del cerebro de diez micrometros de grosor se fijaron posteriormente con 4% formaldehído en DEPC tratado salina búferfosfato IX a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de enjuagarse dos veces en DEPC salina búfer fosfato IX y una vez en 0.1 M trietanolamina-HCl (pH 8.0). Tras la incubación en 0.25% anhídrido acético-0.1 M trietanolamina-HCl durante 10 minutos, las secciones se enjuagaron en DEPC 2X SSC (IX SSC es 0.15 M NaCl más 0.015 M citrato sódico). El tejido fue posteriormente deshidratado usando una serie de lavados de etanol, se incubó en 100% cloroformo durante 5 minutos, y después de enjuagó en 100% etanol durante 1 minuto y 95% etanol durante minuto para posteriormente dejarse secar al aire.

Las hibridizaciones se llevaron a cabo con sondas cARN de ³⁵S-radioetiquetado (5 X 10⁷ cpm/ml) que codifican un fragmento 474-bp del gen de rata (generado con imprimadores PCR F, 5'-CAAGAACCCTTTAAGCCAAG (SEC ID NO:27), y R, 5'-GAAGAAGGTAACGCTGAGGA (SEC ID NO:28) y fragmento 529-bp del gen de rata (generado con imprimadores PCR F, 5'-CAGAACCCCGATGCC (SEC ID NO:29), y R, 5'-TAGTGGCACAGTGGGTAGAG (SEC ID NO:30)). Las sondas se incubaron en la presencia de una solución que contenía 600 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.01% ADN esperma de salmón cortado, 0.01% levadura tARN, 0.05% levadura ARN total tipo X1, 1 X solución de Denhardt, 50% formadida, 10% sulfato dextran, 100 mM dithiothreitol, 0.1% sulfato dodecil sódico (SDS), y 0.1% trifulsato sódico durante 18 horas a 55°C.

Después de la hibridización, los portaobjetos se lavaron con 2 X SSC. Las secciones se incubaron secuencialmente a 37°C en TNE (una solución que contenía 10 mM Tris-HCl (pH. 7.6), 500 mM NaCl, y 1 mM EDTA), durante 10 minutos, en TNE con 10 µg de ARNasa por ml duranet 30 minutos, y finalmente en TNE durante 10 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron posteriormente con 2 X SSC a temperatura ambiente, se lavaron con 2 X SSC a 50°C durante 1 hora, se lavaron con 0.02 X SSC a 55°C durante 1 hora, y 0.2 X SSC a 60°C durante 1 hora. Las secciones fueron después deshidratadas rápidamente a través de etanol serial-0.3M concentraciones de acetato sódico antes de secarse al aire y se expone a carrete de imagen científica Kodak Biomax MR durante 24 horas y a continuación se meten en NB-2 fotoemulsión y se expuso a 4°C durante 7 días antes de desarrollarse y se tiñeron con contador.

La hibridización significativa se vio en un número de regiones del cerebro. Estas incluían la corteza, *putamen* caudado, hipocampo, tálamo y cerebelo. Los análisis de estas regiones a gran escala mostraron que se observó un etiquetaje significativo sobre los cuerpos celulares de neuronas.

Ejemplo 3

Expresión de polipéptido flh84g5 recombinante en células bacterianas

5 En este ejemplo, flh84g5 se expresa como un polipéptido de fusión (GST) recombinante glutaniona-S-transferasa en *E. Coli* y el polipéptido de fusión se aisló y caracterizó. Específicamente, flh84g5 se fusiona con GST y este polipéptido de fusión se expresa en *E. Coli*, por ejemplo, variedad PEB199. Como los polipéptidos humanos y de rata flh84g5 se prevén ser aproximadamente 51.3 kDa, respectivamente, y GST se pronostica ser 77.3 kDa y 77.2 kDa, respectivamente, en peso molecular. Expresión del GST-polipéptido de fusión flh84g5 en PEB199 se provoca con IPTG. El polipéptido de fusión recombinante se purifica de lisados bacterianos crudos de la variedad PEB199 mediante cromatografía de afinidad en gutas de glutaniona. Usando análisis electroforéticos de gel de poliacrilamina del polipéptido purificados de los lisados bacteriano, se determina el peso molecular del polipéptido de fusión resultante.

15 Ejemplo 4

Expresión de polipéptido recombinante flh84g5 en células COS

20 Para expresar el gen flh84g5 en células COS, se usa el vector pcADN/Amp por Invitrogen Corporation (San Diego, CA). Este vector contiene un origen SV40 de réplica, un gen de resistencia ampicilina, un origen de réplica *E. Coli*, un impulsor CMV seguido de una región polienlace, y un nitrón SV40 y punto de poliadenilización. Un fragmento ADN que codifica el polipéptido completo flh84g5 y una etiqueta HA (Wilson *et al.* (1984) Cell 37:767) fusionada en el interior de su estructura de su extremo 3' del fragmento se clona en la región polienlace del vector, colocando de este modo la expresión del polipéptido recombinante bajo el control del impulsor CMV.

25 Para construir el plásmido, la secuencia de ADN flh84g5 se amplifica mediante PCR usando dos imprimadores. El imprimador 5' contiene el punto de restricción de interés seguido de aproximadamente veinte nucleótidos de secuencia codificadora flh84g5 que comienza del codón de iniciación; la secuencia 3' extremo contiene secuencias complementarias con otro punto de restricción de interés, un codón de freno de traslación, la etiqueta HA y los últimos 20 nucleótidos de la secuencia codificadora flh84g5. El fragmento amplificado PCR y el vector pCADN/Amp se digieren con las enzimas de restricción apropiadas y el vector se defosforiliza usando la enzima CIAP (New England Biolabs, Beverly, MA). Preferentemente, los dos puntos de restricción elegidos son diferentes para que el gen flh84g5 se inserte en la orientación correcta. La mezcla de unión se transforma en células *E. coli* (variedades HB101, DH5a, SURE, disponible en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, pueden usarse), el cultivo transformado se coloca en placas sobre placas de medio ampicilina, y se seleccionaron las colonias resistentes. El plásmido ADN se aisló de transformantes y se examinó mediante análisis de restricción para la presencia del fragmento correcto.

30 Posteriormente, las células COS se transfectan con el flh84g5-pcADN/Amp ADN plásmido usando los métodos de co-precipitación de fosfato o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextran, lipofección, o electroporación. Otros métodos adecuados para transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989*. La expresión de polipéptido flh84g5 se detecta mediante radioetiquetaje (³⁵S-metionina o ³⁵S-cisteína disponible en NEN, Boston, MA, puede usarse) e inmunoprecipitación (Harlow, E. Y Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988*) usando un anticuerpo monoclonal específico HA. En resumen, las células se etiquetan durante 8 horas con ³⁵S-metionina (o ³⁵S-cisteína). Los medios de cultivo se recogen posteriormente y las células se lisan usando detergentes (búfer RIPA, 150 Mm NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 50 Mm Tris, pH. 7.5). Tanteo el lisado celular como el medio de cultivo se precipitan con un anticuerpo monoclonal específico HA. Los polipéptidos precipitados se analizan posteriormente mediante SDS-PAGE.

35 De manera alternativa, el ADN que contiene la secuencia codificadora flh84g5 se clona directamente en el polienlace del vector pCADN/Amp usando los puntos de restricción adecuados. El plásmido resultante se transfecta a células COS de la manera anteriormente descrita, y la expresión del polipéptido flh84g5 se detecta mediante radioetiquetaje e inmunoprecipitación usando un anticuerpo monoclonal específico flh84g5.

55 Ejemplo 5

Caracterización de los polipéptidos flh84g5 humanos y de rata

60 En este ejemplo, las secuencias de aminoácido de los polipéptidos flh84g5 humanos y de rata se compararon con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos conocidos y se identificaron varios motivos.

65 El polipéptido humano flh84g5, cuya secuencia de aminoácido se muestra en la Figura 1 (SEC ID NO:2), es un polipéptido nuevo que incluye 445 residuos de aminoácido. El polipéptido humano flh84g5 contiene siete dominios transmembránicos entre los residuos de aminoácidos 34-59 (SEQ ID NO:7), 73-91 (SEC ID NO:8), 109-130 (SEC ID NO:9), 152-174 (SEC ID NO:10), 197-219 (SEC ID NO:11), 360-380 (SEC ID NO:12), y 396-416 (SEC ID NO:13). La secuencia nucleotídica del flh84g5 humano se usó en un estudio de base de datos usando el programa BLASTN (BLASTN1.3MP, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403). Los blancos más cercanos fueron mACHR M1 humano,

ES 2 285 792 T3

de rata, ratón, y cerdo (GenBank™ Número de Adquisición P11229, P08482, P12657, y PO4761, respectivamente). La similitud más elevada es 32/70 identidades de aminoácido.

5 El polipéptido de rata flh84g5, cuya secuencia de aminoácido se muestra en la Figura 2 (SEC ID NO:5), es un polipéptido nuevo que incluye 445 residuos de aminoácido. El polipéptido de rata flh84g5 contiene siete dominios transmembránicos entre los residuos de aminoácidos 34-59 (SEQ ID NO:14), 73-91 (SEC ID NO:15), 109-130 (SEC ID NO:16), 152-174 (SEC ID NO:17), 197-219 (SEC ID NO:18), 360-380 (SEC ID NO:19), y 396-416 (SEC ID NO:20), que corresponden con los dominios transmembránicos de polipéptido flh84g5 humano 1-7 (SEC ID NOS: 7-13). La secuencia nucleótida de rata flh84g5 se usó en un estudio de base de datos usando el programa BLASTN
10 (BLASTN1.3MP, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403). Los blancos más cercanos fueron mACHR M1 humano, de rata, ratón, y cerdo (GenBank™ Número de Adquisición P11229, P08482, P12657, y PO4761, respectivamente). La similitud más elevada es 32/70 identidades de aminoácido. Los trazados de hidropatía indicaron que los dominios transmembránicos del polipéptido de rata flh84g5 son similares a los de la rata mACHR M1. Las cisteínas (residuos 63 y 44 de SEC ID NO:5) que dan lugar a enlaces de disulfuro intramolecular también se conservan.

15

Ejemplo 6

Estudios electrofisiológicos de flh84g5 en oocitos Xenopus

20 *Métodos*

Plásmido cADN de rata flh84g5 se subclonó en pGEMHEA. CADN en pGEMHEA después se linearizó con AfIII y se transcribió *in vitro* usando polimerasa T7 ARN. Los oocitos *Xenopus* libres de folículo aislados se microinyectaron con 10 ng de flh84g5 cARN (en un volumen de 10 nl). Los oocitos se mantuvieron en solución ND96 que contenía
25 96 mM NaCl, 2 mM KC, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (pH=7.6) durante al menos 48 horas antes del uso. Ca⁺⁺ endógenos activaron corrientes Cl en oocitos obtenidos por carnitina se midieron usando un método de enganche de voltaje de dos electrodos estándar (TEC-03 amplificador, np) en un potencial de sujeción de -80 mV. Los electrodos se llenaron con 3 M KCl y tuvieron resistencias de 0.5-3.0 Ω. La cámara de grabación (aproximadamente 100 μl en volumen) se perfusionó continuamente por gravedad con ND96. Se aplicaron varias concentraciones de
30 carnitina a oocitos durante 30-60 segundo por perfusión.

Resultados

La elevación de Ca⁺⁺ citosólicos en oocitos por GPCRs enganchado a movimiento PI dará como resultado la
35 activación de Ca⁺⁺ endógeno corrientes CI activadas. Las corrientes CI externas resultantes también dependen de concentraciones Ca⁺⁺ extracelulares. En oocitos inyectados con flh84g5 cARN, L-carnitina produce tal corriente CI activada Ca⁺⁺ (I_{max}=3-6 μA) en una manera dependiente de concentración, con un EC50 de 3 mM. Mientras se inyectan oocitos en agua, elevadas concentraciones de L-carnitina (hasta 10 mM) no producen ninguna corriente. 10 mM L-carnitina evocaron corrientes más pequeñas que las vistas con L-carnitina. El análogo de L-carnitina (10 mM) también produce corrientes pequeñas.

40

0.1-1.0 mM Ach, GABA, 5-HT, NE, Glu, y DA no producen ninguna corriente en oocitos inyectados con flh84g5
ARN. Además, L-carnitina que obtuvo corrientes en oocitos no puede bloquearse por la atropina antagonista muscarí-
45 nica (100 μM).

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo consistente en:

- 5 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:2;
- (b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:5;
- 10 (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:32;
- (d) un fragmento de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:2; donde el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de SEC ID NO:2 y tiene una actividad flh84g5;
- 15 (e) un fragmento de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:5, donde el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de residuos de aminoácidos 109-130, 152-174, 197-219, 360-380 o 396-416 de SEC ID NO:5 y tiene una actividad flh84g5;
- (f) un fragmento de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:32; donde el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de SEC ID NO:32 y tiene una actividad flh84g5;
- 20 (g) una variante alélica que ocurre de manera natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido SEC ID NO:2, y tiene una actividad flh84g5 donde el polipéptido se codifica por una molécula de ácido nucleico que hibridiza con una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:1 bajo condiciones severas;
- 25 (h) una variante alélica que ocurre de manera natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido SEC ID NO:5, y tiene una actividad flh84g5 donde el polipéptido se codifica por una molécula de ácido nucleico que hibridiza con una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:4 bajo condiciones severas;
- 30 (i) una variante alélica que ocurre de manera natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido SEC ID NO:32, y tiene una actividad flh84g5 donde el polipéptido se codifica por una molécula de ácido nucleico que hibridiza con una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID NO:31 bajo condiciones severas;
- 35 (j) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la secuencia completa de aminoácido de SEC ID NO: 2, 5, o 32; y
- 40 (k) un polipéptido que se codifica por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% idéntica a la secuencia completa nucleótida de SEC ID NO: 1, 4, o 31,

donde un polipéptido tiene una actividad flh84g5 que, cuando se expresa en oocitos, permite que L-carnitina produzca corriente de cloro activada por calcio.

45 2. Un polipéptido como el reivindicado en la reivindicación 1, que además comprende secuencias de aminoácido heterólogas.

3. Un anticuerpo que de manera selectiva se enlaza con un polipéptido como el reivindicado en la reivindicación 2.

50 4. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido tal y como se define en cualquiera de los párrafos (a) a (i) de la reivindicación 1.

55 5. Una molécula de ácido nucleico como la reivindicada en la reivindicación 4, que además comprende bien secuencias de ácido nucleico de vector, o secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido heterólogo.

6. Una célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 4 o 5, siendo dicha célula huésped opcionalmente una célula de mamífero, por ejemplo una célula huésped de mamífero no humano.

60 7. Un ácido nucleico aislado como el reivindicado en la reivindicación 4, que se selecciona del grupo consistente en:

- (a) una molécula de ácido nucleico que comprende la región codificadora de SEC ID NO:1;
- 65 (b) una molécula de ácido nucleico que comprende la región codificadora de SEC ID NO:4;
- (c) una molécula de ácido nucleico que comprende la región codificadora de SEC ID NO:31;

ES 2 285 792 T3

- (d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:7 y tiene una actividad fh84g5;
- 5 (e) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:8 y tiene una actividad fh84g5;
- (f) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:9 y tiene una actividad fh84g5;
- 10 (g) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:10 y tiene una actividad fh84g5;
- (h) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:11 y tiene una actividad fh84g5;
- 15 (i) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:12 y tiene una actividad fh84g5;
- (j) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:13 y tiene una actividad fh84g5;
- 20 (k) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:14 y tiene una actividad fh84g5;
- (l) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:15 y tiene una actividad fh84g5;
- 25 (m) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:16 y tiene una actividad fh84g5;
- 30 (n) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:17 y tiene una actividad fh84g5;
- (o) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:18 y tiene una actividad fh84g5;
- 35 (p) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:19 y tiene una actividad fh84g5;
- (q) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:20 y tiene una actividad fh84g5;
- 40 (r) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:34 y tiene una actividad fh84g5;
- 45 (s) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:35 y tiene una actividad fh84g5;
- (t) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:36 y tiene una actividad fh84g5;
- 50 (u) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:37 y tiene una actividad fh84g5;
- (v) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:38 y tiene una actividad fh84g5;
- 55 (w) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:39 y tiene una actividad fh84g5;
- 60 (x) una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleótida que es al menos 95% idéntica a la secuencia nucleótida completa de SEC ID NO:1, 4, o 31, o un complemento de las mismas, donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una actividad fh84g5; y
- 65 (y) una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la secuencia nucleótida completa de SEC ID NO:2, 5, o 32,

ES 2 285 792 T3

donde un polipéptido tiene una actividad flh84g5 que, cuando se expresa en oocitos, permite que L-carnitina produzca corriente de cloro activada por calcio.

5 8. Un método para la producción de un polipéptido como el reivindicado en la reivindicación 1, comprendiendo el método del paso de cultivo de célula huésped de la reivindicación 6 bajo condiciones en las cuales la molécula de ácido nucleico se expresa.

10 9. Un método para detectar la presencia de un polipéptido como el reivindicado en la reivindicación 1 en una muestra, comprendiendo el método de los pasos de:

- (i) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que de manera selectiva se enlaza con el polipéptido; y
- (ii) determinar si el anticuerpo se enlaza con el polipéptido en la muestra.

15 10. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 4, comprendiendo el método de los pasos de:

- 20 (i) poner en contacto la muestra con una sonda o imprimador de ácido nucleico que de manera selectiva hibridiza la molécula de ácido nucleico; y
- (ii) determinar si la sonda o imprimador de ácido nucleico se enlaza con la molécula de ácido nucleico en la muestra;

25 opcionalmente donde la muestra comprende moléculas ARN y está en contacto con una sonda de ácido nucleico.

11. Un kit que comprende

- 30 a) reagentes usados para los métodos de las reivindicaciones 9 o 10, donde los agentes comprenden un compuesto que es un anticuerpo que de manera selectiva se enlaza con un polipéptido tal y como se reivindica en la reivindicación 1; o
- b) una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 7, o un complemento de la misma e instrucciones para su uso.

35 12. Un método para identificar un compuesto que se enlaza con un polipéptido como el reivindicado en la reivindicación 1, constante el método de:

- 40 (i) poner en contacto el polipéptido, o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto de examen; y
- (ii) determinar si el polipéptido se enlaza con el compuesto de examen.

13. Un método como el reivindicado 12, donde el enlace del compuesto de test con el polipéptido se mezcla mediante un método seleccionado del grupo consistente en:

- 45 (a) detección de enlace mediante detección directa del enlace de test compuesto/polipéptido;
- (b) detección de enlace usando un ensayo de enlace de competición; y
- 50 (c) detección de enlace usando un ensayo para actividad flh84g5.

14. Un compuesto capaz de poner en contacto la célula que expresa un polipéptido como el reivindicado en la reivindicación 1, y adaptarse para enlazarse con el polipéptido en una concentración suficiente para modular la actividad del polipéptido, para uso como un medicamento, donde dicho compuesto se selecciona del grupo consistente en un anticuerpo que específicamente se enlaza con un polipéptido de la reivindicación 1 y un polipéptido flh84g5, porción o variante alélica que ocurre de manera natural del mismo como se define en la reivindicación 1.

15. Uso de un compuesto de la reivindicación 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición seleccionada del grupo consistente en desorden del sistema nervioso, un desorden cognitivo, un desorden del sueño, un desorden motriz, un desorden esquizoefectivo, un desorden que afecta los mecanismos de generación de dolor, un desorden con la bebida, un desorden alimenticio, un desorden relacionado con la musculatura lisa, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable, un desorden relacionado con la musculatura cardiaca, bradicardia, o un desorden relacionado con las glándulas y xerostomia.

16. Uso, como se reivindica en la reivindicación 14, donde el uso da como resultado bien un aumento o un descenso en metabolismo fosfatidilinositol.

FIG.1B

G D T R R A V R R K M L L V W V L A F L L 166
 GGT GAC ACG CGG GCA GTG CGG AAG ATG CTG CTG GTG TGG GTG CTG GCC TTC CTG CTG 788

Y G P A I L S W E Y L S G G S S I P E G 186
 TAC GGA CCA GCC ATC CTG AGC TGG GAG TAC CTG TCC GGG GGC AGC TCC ATC CCC GAG GGC 848

H C Y A E F F Y N W Y F L I T A S T L E 206
 CAC TGC TAT GCC GAG TTC TTC TAC AAC TGG TAC TTC CTC ATC AGC GCT TCC ACC CTG GAG 908

F F T P F L S V T F F N L S I Y L N I Q 226
 TTC TTT ACG CCC TTC CTC AGC GTC ACC TTC TTT AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC ATC CAG 968

R R T R L R L D G A R E A A G P E P P 246
 AGG CGC ACC CGC CTC CGG CTG GAT GGG GCT CGA GAG GCA GCC GGC CCC GAG CCC CCT CCC 1028

E A Q P S P P P P G C W G C W Q K G H 266
 GAG GCC CAG CCC TCA CCA CCC CCA CCG CCT GGC TGC TGG GGC TGC TGG CAG AAG GGG CAC 1088

G E A M P L H R Y G V G E A A V G A E A 286
 GGG GAG GCC ATG CCG CTG CAC AGG TAT GGG GTG GGT GAG GCG GCC GTA GGC GCT GAG GCC 1148

G E A T L G G G G G G S V A S P T S S 306
 GGG GAG GCG ACC CTC GGG GGT GGC GGC GGC TCC GTG GCT TCA CCC ACC TCC AGC 1208

S G S S S R G T E R P R S L K R G S K P 326
 TCC GGC AGC TCC TCG AGG GGC ACT GAG AGG CCG CGC TCA CTC AAG AGG GGC TCC AAG CCG 1268

FIG.1C

S A S S A S L E K R M K M V S Q S F T Q 346
 TCG GCG TCC TCG GCC TCA CTG GAG AAG CGC ATG AAG ATG GTG TCC CAG AGC TTC ACC CAG 1328

R F R L S R D R K V A K S L A V I V S I 366
 CGC TTT CGG CTG TCT CGG GAC AGG AAA GTG GCC AAG TCG CTG GCC GTC ATC GTG AGC ATC 1388

F G L C W A P Y T L L M I I R A A C H G 386
 TTT GGG CTC TGC TGG GCC CCA TAC ACG CTG CTG ATG ATC ATC CGG GCC TGC CAT GGC 1448

H C V P D Y W Y E T S F W L L W A N S A 406
 CAC TGC GTC CCT GAC TAC TGG TAC GAA ACC TCC TTC TGG CTC CTG TGG GCC AAC TCG GCT 1508

V N P V L Y P L C H H S F R R A F T K L 426
 GTC AAC CCT GTC CTC TAC CCT CTG TGC CAC CAC AGC TTC CGC CGG GCC TTC ACC AAG CTG 1568

L C P Q K L K I Q P H S S L E H C W K * 446
 CTC TGC CCC CAG AAG CTC AAA ATC CAG CCC CAC AGC TCC CTG GAG CAC TGC TGG AAG TGA 1628

GTGGCCACAGAGCCTCCCTCAGCCAGCCCTCTCTCAGCCAGGCTCTCCTGGGCATCTGGCCCTGCTGCCCTACCC 1707

GGCTCGTTCCCCAGGGGTGAGCCCCCGGTGTCTGTGGCCCTCTCTTAATGCCACGGCAGCCACCCCTGCCATGGAGGC 1786

GCCTTCCCTGGGTGGCCAGAGGGCCCCCTCACTGGCTGGACTGGAGGCTGGGTGGCCGGCCCTGCCACATTTCTGGC 1865

TCCACGGGAGGACAGTCTGGAGGTCCAGACATGCTGCCACCCCTGCTGGTGGTGGCCACCCCTTCGCAGTTACTGGTT 1944

GGTGTCTTCCCAAGCAAGCACCTGGGTGTCTCCAGGCTTCTGCCCCTAGCAGTTTGCCTGTGCACGTGCACACACC 2023

FIG.1D

TGCACCCCTGCACACACCTGCACACCGTCCCTCTCCCCGGACAAGCCAGGACACTGCCTTTGCTGCCTTCTGTCTC 2102
TTGCATAAGCCTCAGGCCTGGCCCTTTCACCCCTCTTCCCACCACTCTCTGTGCCCCCAAAAGTGTCAAGGGGCCCTA 2181
GGAACCTCGAAGCTGTCTCTGCTTTTCCATTCTGGGTGTTTTTCAGAAAGATGAAGAAGAAACATGTCTGTGAACTTG 2260
ATGTTCCGGGATGTTTAAATCAAGAGAGACAAAATTGCTGAGGAGCTCAGGGCTGGATTGGCAGGTGTGGGCTCCCACG 2339
CCCTCCCTCCGCTAAGGCTTCCGGCTGAGCTGTGCCAGCTGCTTCTGCCCAACCCCGCCTCTGGGCTCACACCCAGCC 2418
CTGGTGGCCCAAGCCTGCCCCGGCCACTCTGTTTGCTCACCCAGGACCTCTGGGGGTTGTTGGGAGGAGGGCCCGGCT 2497
GGCCCCGAGGGTCCCAAGGCGTGCAGGGGGCGGTCCAGAGGAGGTGCCCGGGCAGGGCCGCTTCGCCATGTGTGTGCA 2576
CCCGTGCCACGGCTCTGCATGCTCCTCTGCCCTGTGCCCGCTGCGCTGCCCTGCAAACCCTGAGGTCACAATAAAGTGT 2655
ATTTTTTAAAAAATAAAGGGGGCCCGC 2689

FIG. 2A

```

      G   A   F   C   I   P   L   Y           8
      GGT GCC TTC TGC ATC CCA TTG TAC      24

V   P   Y   V   L   T   G   R   W   T   F   G   R   G   L   C   K   L   W   L           28
GTA CCC TAT GTG CTG ACC GGC CGT TGG ACC TTC GGC CGG CTC TGC AAG CTG TGG CTG      84

V   V   D   Y   L   L   C   A   S   S   V   F   N   I   V   L   I   S   Y   D           48
GTG GTA GAC TAC CTA CTG TGT GCC TCC TCG GTC TTC AAC ATC GTA CTC ATC AGC TAT GAC   144

R   F   L   S   V   T   R   A   V   S   Y   R   A   Q   Q   G   D   T   R   R           68
CGA TTC CTG TCA GTC ACT CGA GCT GTC TCC TAC AGG GCC CAG CAG GGC GAC ACG AGA CGG   204

A   V   R   K   M   A   L   V   W   V   L   A   F   L   L   Y   G   P   A   I           88
GCC GTT CGG AAG ATG GCA CTG GTG ,TGG GTG CTG GCC TTC CTG CTG TAT GGG CCT GCC ATC   264

L   S   W   E   Y   L   S   G   G   S   I   P   E   G   H   C   Y   A   E           108
CTG AGT TGG GAG TAC CTG TCT GGT GGC AGT TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCT GAG   324

F   F   Y   N   W   Y   F   L   I   S   A   S   T   L   E   F   F   T   P   F           128
TTC TTC TAC AAC TGG TAC TTT CTC ATC TCG GCC TCC ACC CTC GAG TTC TTC ACG CCC TTC   384

L   S   V   T   F   F   N   L   S   I   Y   L   N   I   Q   R   R   T   R   L           148
CTC AGC GTT ACC TTC AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC ATC CAG AGG CGC ACC CGC CTT      444

```

FIG.2B

R L D G G R E A G P E P P P D A Q P S P 168
 CGG CTT GAT GGG GGC CGT GAG GCT GGC CCA GAA CCC CCA CCA GAT GCC CAG CCC TCG CCA 504

 P P A P S C W G C W P K G H G E A M P 188
 CCT CCA GCT CCC AGC TGC TGG GGC TGC TGG CCA AAA GGG CAT GGC GAG GCC ATG CCG 564

 L H R Y G V G E A G P G V E A G E A A L 208
 TTG CAC AGG TAT GGG GTG GGT GAG GCA GGC CCT GGT GTT GAG GCT GGG GAG GCT GCC CTC 624

 G G G S G G A A A S P T S S G S S S 228
 GGG GGT GGC AGT GGT GGA GGT GCT GCT GCC TCG CCC ACC TCC AGC TCT GGC AGC TCC TCA 684

 R G T E R P R S L K R G S K P S A S S A 248
 AGG GGC ACT GAG AGG CCA CGC TCA CTC AAA AGG GGC TCC AAG CCA TCA GCA TCT TCA GCA 744

 S L E K R M K M V S Q S I T Q R F R L S 268
 TCC CTG GAG AAG CGC ATG AAG ATG GTG TCC CAG AGC ATC ACC CAG CGC TTC CGG CTG TCG 804

 R D K K V A K S L A I I V S I F G L C W 288
 CGG GAC AAG AAG GTG GCC AAG TCG CTG GCC ATC ATC GTG AGC ATC TTT GGG CTC TGC TGG 864

 A P Y T L L M I I R A A C H G R C I P D 308
 GCG CCG TAC ACG CTC CTA ATG ATC ATC CGA GCT GCT TGC CAT GGC CGC TGC ATC CCC GAT 924

 Y W Y E T S F W L L W A N S A V N P V L 328
 TAC TGG TAC GAG ACG TCC TTC TGG CTT CTG TGG GCC AAC TCG GCC GTC AAC CCC GTC CTC 984

FIG.2C

Y	P	L	C	H	Y	S	F	R	R	A	F	A	L	L	C	P	Q	K	348	
TAC	CCA	CTG	TGC	CAC	TAC	AGC	TTC	CGC	AGA	GCC	TTC	ACC	AAG	CTC	CTC	TGC	CCC	CAG	AAG	1044
L	K	V	Q	P	H	G	S	L	E	Q	C	W	K	*	363					
CTC	AAG	GTC	CAG	CCC	CAC	GGC	TCC	CTG	GAG	CAG	TGC	TGG	AAG	TGA	1089					
GCAGCTGCCCCACCCCTTCTGAGGCCAGGCCCTTGTA	CTTGTACTTGTGAGTGGCCAGCCCGGAGCGGTGGCGGGGGCCCTGGTCC	1168																		
ATGCTCCGCTCCAAATGCCCATGGCGGCCCTCTTAGATCATCAACCCCGCAGTGGGGTAGCATGGCAGGTGGGCCAAGAGC	1247																			
CCTAGTTGGTGGAGCTAGAGTGTGCTGGTTAGCTCTGCCGCCACATTTCTCCTTACCACACAGAAAGACAAATCCAGGA	1326																			
GTCCCAGGCATGCCCTTCCACCCTACACACACACACACACACACACACACACACACACACAGTGCAGTGCCAGTGATGTC	1405																			
CCCTTTTGCAATTTAGTGGTTGGTGTCTCCCTAATGCAAACTCGGTGTGCTCCCGGCTCCGGCCCTGGCAATGC	1484																			

FIG. 2D

GTGCGTGGCCCTGCATGTGCTCACACCCGGCCACACACCCGGCCGCACACACTTGCAACACCTCCTCTCTCCAGAAG 1563
AGCTGGGACGATGCCCTTTGCTGCCACTGTCTCTTGTCTTAATCCAGAGCCTGGCTCCTTATCCCCACACTCTCCCTTC 1642
AACTCTGCCCCACAAGTGTGAGCGCCTGGGAAACTTGAAGCTTCTCTGCTCCTTCCACTCTGGATGTTTCAGGAA 1721
GATGGAGGAGAGAAAACACGCTCTGTGAACCTTGATGTTCTTGGATGTTAATCAAGAGAGACAAAATTGCCGAGGAGC 1800
TCGGGGCTGGATTGGCAGGTGTGGCTCCACGCCCTCCTCCCTCAGTGTGCAGCTTCCGGCTGAGCCGCCAGCTG 1879
CTTCTGCCCTGCCCCCAGGCTTGGGACGATGGCCCTGCCCCCTGCTTGCCCCCTGTGTACAATCAGAAATTTGGGGGT 1958
GGGTGGTTATGGGGTAGAGCGGCTCTTCACTGTGCCCTAAAGGTCCTGAGGCTCACAGGACAGTCAGGAGAGCAGG 2037
CAGGCCCGGACACCTGGGAGGAATGCTTTGCCCTCGTCTGTGTACTCACCTCAGGCTTCTGCAATGCTGTGCCCTT 2116
GTGCCCCGGTGTGCTGCTGCCAAAGTGAAACACAATAAAGTATTTTTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2195
AAAAAAAAAAAAAGGGGGCCGC 2218

ES 2 285 792 T3

FIG.3A

GTCGACCCACGCGTCCGGCGGTGAGAGCGGCTGGCGGGCTGCAGCCCAAGAACCCCTTTAAGCCCAAGAAAAAAGCTTTCT	79
E G R L S N S K G A F C I P L Y	16
CGGTTTTAAGCTGA GAA GGG AGG CTG TCC AAC AGC AAG GGT GCC TTC TGC ATC CCA TTG TAC	142
V P Y V L T G R W T F G R G L C K L W L	36
GTA CCC TAT GTG CTG ACC GGC CGT TGG ACC TTC GGC CGG GGC CTC TGC AAG CTG TGG CTG	202
V V D Y L L C A S S V F N I V L I S Y D	56
GTG GTA GAC TAC CTA CTG TGT GCC TCC TCG GTC TTC AAC ATC GTA CTC ATC AGC TAT GAC	262
R F L S V T R A V S Y R A Q Q G D T R R	76
CGA TTC CTG TCA GTC ACT CGA GCT GTC TCC TAC AGG GCC CAG GGG GAC ACG AGA CGG	322
A V R K M A L V W V L A F L L Y G P A I	96
GCC GTT CGG AAG ATG GCA CTG GTG TGG GTG CTG GCC TTC CTG CTG TAT GGG CCT GCC ATC	382

FIG.3B

L S W E Y L S G S I P E G H C Y A E	116
CTG AGT TGG GAG TAC CTG TCT GGT GGC AGT TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCT GAG	442
F F Y N W Y F L I S A S T L E F F T P F	136
TTC TTC TAC AAC TGG TAC TTT CTC ATC TCG GCC TCC ACC CTC GAG TTC TTC ACG CCC TTC	502
L S V T F F N L S I Y L N I Q R R T R L	156
CTC AGC GTT ACC TTC TTC AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC ATC CAG AGG CGC ACC CGC CTT	562
R L D G G R E A G P E P P P D A Q P S P	176
CGG CTT GAT GGG GGC CGT GAG GCT GGC CCA GAA CCC CCA CCA GAT GCC CAG CCC TCG CCA	622
P P A P P S C W G C W P K G H G E A M P	196
CCT CCA GCT CCC CCC AGC TGC TGG GGC TGC TGG CCA AAA GGG CAT GGC GAG GCC ATG CCG	682
L H R Y G V G E A G P G V E A G E A L	216
TTG CAC AGG TAT GGG GTG GGT GAG GCA GGC CCT GGT GGT GAG GCT GGG GAG GCT GCC CTC	742

FIG.3C

G G G S G G A A S P T S S G S S 236
 GGG GGT GGC AGT GGT GGA GGT GCT GCC TCG CCC ACC TCC AGC TCT GGC AGC TCC TCA 802

R G T E R P R S L K R G S K P S A S S A 256
 AGG GGC ACT GAG AGG CCA CGC TCA CTC AAA AGG GGC TCC AAG CCA TCA GCA TCT TCA GCA 862

S L E K R M K M V S Q S I T Q R F R L S 276
 TCC CTG GAG AAG CGC ATG AAG ATG GTG TCC CAG AGC ATC ACC CAG CGC TTC CGG CTG TCG 922

R D K K V A K S L A I I V S I F G L C W 296
 CGG GAC AAG AAG GTG GCC AAG TCG CTG GCC ATC ATC GTG AGC ATC TTT GGG CTC TGC TGG 982

A P Y T L L M I I R A A C H G R C I P D 316
 GCG CCG TAC ACG CTC ATG ATC ATC CGA GCT GCT TGC CAT GGC CGC TGC ATC CCC GAT 1042

Y W Y E T S F W L L W A N S A V N P V L 336
 TAC TGG TAC GAG ACG TCC TTC TGG CTT CTG TGG GCC AAC TCG GCC GTC AAC CCC GTC CTC 1102

FIG.3D

Y P L C H Y S F R R A F T K L L C P Q K 356
TAC CCA CTG TGC CAC TAC AGC TTC CGC AGA GCC TTC ACC AAG CTC CTC TGC CCC CAG AAG 1162

L K V Q P H G S L E Q C W K * 371
CTC AAG GTC CAG CCC CAC GGC TCC CTG GAG CAG TGC TGG AAG TGA 1207

GCAGCTGCCCCACCCCTTCTGAGGCCAGGCCCTTGACTTGTGAGTGGGCAGCCGGAGCGTGGCGGGGCCCTGGTCC 1286

ATGCTCCGCTCCAAATGCCATGGGGCCCTCTTAGATCATCAACCCCGCAGTGGGGTAGCATGGCAGGTGGGCCCAAGAGC 1365

CCTAGTTGGTGGAGCTAGAGTGTGCTGGTTAGCTCTGCCGCCACATTTCTCCTTCCACACAGAAAGACAATCCAGGA 1444

GTCCCAGGCATGCCCTTCCACCTACACACACACACACACACACACACACACACACAGTGCAGTGCCAGTGATGTC 1523

CCCTTTTGCATAATTTAGTGGTTGGTGTCTCCCTAATGCAACCTCGGIGTGTCTCCGGCTCCGGCCCTGGCAATGC 1602

GTGCGTGGCCCTGCATGTGCTCACACCCGCCACACACACACTTGCAACACCTTCTCTCCAGAAG 1681

ES 2 285 792 T3

FIG. 3E

AGCTGGGACGATGCCCTTTGGCTGCCACTGTCTCTTGCTTAATCCAGAGCCTGGCTCCTTATCCCCCACTCTCCCTTC 1760
 AACTCTGCCCCACAAAAGTGTGAGCGCCTCGGAAACTTGAAGCTTCTCTGCTCCTTCCACTCTGGATGTTTTTCAGGAA 1839
 GATGGAGGAGAAGAAAACACGCTCTGTGAACCTGATGTTCCCTTGGATGTTTAATCAAGAGAGACAAAAATTGCCGAGGAGC 1918
 TCGGGGCTGGATTGGCAGGTGTGGGCTCCACGCCCTCCCTCAGTGTGCAGCTTCCGGCTGAGCCCGCCAGCTG 1997
 CTTCTGCCCTGCCCGCCCCAGGCTTGGGACGATGGCCCCTGCCCTGCTTGCCCCCGTCTGTACAATCAGAATTTGGGGGT 2076
 GGGTGGTTATGGGGTAGAGCGGCTCTTCACTGTGCCCTAAAGGTCCCTGAGGCTCACAGGACAGTCAGCAGGAGAGCAGG 2155
 CAGGCCCGCACACCTGGGAGGAATGCTTTGCCCTCGTCCCTGTGTACTCACCTCAGGCTTCTGCATGCTCTGCTGCCCTT 2234
 GTGCCCTGGTGTGCTGCCCTCTGCCCAATGTGAAAACACAATAAAGTGTATTTTTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 2313
 AAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGC

ES 2 285 792 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
 - (B) CALLE: 640 MEMORIAL DRIVE
 - 10 (C) CIUDAD: CAMBRIDGE
 - (D) ESTADO: MASSACHUSETTS
 - (E) PAÍS: US
 - (F) CÓDIGO POSTAL (CP): 02139
 - 15 (G) TELÉFONO:
 - (H) TELEFAX:
- (II) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEINA G Y USOS DE LOS MIS-
- 20 MOS
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 39
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 25 (A) DESTINATARIO: LAHIVE & COCKFIELD, LLP
 - (B) CALLE: 28 STATE STREET
 - (C) CIUDAD: BOSTON
 - (D) ESTADO: MASSACHUSETTS
 - 30 (E) PAÍS: US
 - (F) CP: 02109-1875
- (v) FORMA LEGIBLE DE ORDENADOR:
- 35 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 40 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- (vi) INFORMACIÓN DE SOLICITUD ACTUAL:
- 45 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US98/
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 04 DECEMBER 1998
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) INFORMACIÓN PREVIA A LA SOLICITUD:
- 50 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 08/985,090
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 04 DECEMBER 1997
 - (A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 09/042,780
 - 55 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 17 MARCH 1998
- (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:
- 60 (A) NOMBRE: MANDRAGOURAS, AMY E.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36,207
 - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: MNI-032CP2PC
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 65 (A) TELÉFONO: (617)227-7400
 - (B) TELEFAX: (617)742-4214

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:1:

ES 2 285 792 T3

GGG GGC AGC TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCC GAG TTC TTC TAC 872
 Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr
 180 185 190

5 AAC TGG TAC TTC CTC ATC ACG GCT TCC ACC CTG GAG TTC TTT ACG CCC 920
 Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro
 195 200 205 210

10 TTC CTC AGC GTC ACC TTC TTT AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC ATC CAG 968
 Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln
 215 220 225

15 AGG CGC ACC CGC CTC CGG CTG GAT GGG GCT CGA GAG GCA GCC GGC CCC 1016
 Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala Gly Pro
 230 235 240

20 GAG CCC CCT CCC GAG GCC CAG CCC TCA CCA CCC CCA CCG CCT GGC TGC 1064
 Glu Pro Pro Pro Glu Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Gly Cys
 245 250 255

25 TGG GGC TGC TGG CAG AAG GGG CAC GGG GAG GCC ATG CCG CTG CAC AGG 1112
 Trp Gly Cys Trp Gln Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Arg
 260 265 270

30 TAT GGG GTG GGT GAG GCG GCC GTA GGC GCT GAG GCC GGG GAG GCG ACC 1160
 Tyr Gly Val Gly Glu Ala Ala Val Gly Ala Glu Ala Gly Glu Ala Thr
 275 280 285 290

35 CTC GGG GGT GGC GGT GGG GGC GGC TCC GTG GCT TCA CCC ACC TCC AGC 1208
 Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Val Ala Ser Pro Thr Ser Ser
 295 300 305

40 TCC GGC AGC TCC TCG AGG GGC ACT GAG AGG CCG CGC TCA CTC AAG AGG 1256
 Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg
 310 315 320

45 GGC TCC AAG CCG TCG GCG TCC TCG GCC TCA CTG GAG AAG CGC ATG AAG 1304
 Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys
 325 330 335

50 ATG GTG TCC CAG AGC TTC ACC CAG CGC TTT CGG CTG TCT CCG GAC AGG 1352
 Met Val Ser Gln Ser Phe Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Arg
 340 345 350

55 AAA GTG GCC AAG TCG CTG GCC GTC ATC GTG AGC ATC TTT GGG CTC TGC 1400
 Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys
 355 360 365 370

60 TGG GCC CCA TAC ACG CTG CTG ATG ATC ATC CCG GCC GCC TGC CAT GGC 1448
 Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly
 375 380 385

65 CAC TGC GTC CCT GAC TAC TGG TAC GAA ACC TCC TTC TGG CTC CTG TGG 1496
 His Cys Val Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp
 390 395 400

ES 2 285 792 T3

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala
 20 25 30
 Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr
 35 40 45
 Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser
 50 55 60
 Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
 65 70 75 80
 Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu
 85 90 95
 Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val
 100 105 110
 Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Phe Asn Ile Val Leu Ile
 115 120 125
 Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala
 130 135 140
 Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp
 145 150 155 160
 Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr
 165 170 175
 Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe
 180 185 190
 Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe
 195 200 205
 Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn
 210 215 220
 Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro
 245 250 255

55

60

65

ES 2 285 792 T3

	Gly Cys Trp	Gly Cys Trp	Gln Lys	Gly His	Gly Glu	Ala Met	Pro Leu
		260		265		270	
5	His Arg Tyr	Gly Val Gly	Glu Ala Ala	Val Gly Ala	Glu Ala Gly	Glu	
		275		280		285	
10	Ala Thr Leu	Gly Gly Gly	Gly Gly Gly	Gly Gly Ser	Val Ala Ser	Pro Thr	
		290		295		300	
15	Ser Ser Ser	Gly Ser Ser	Ser Arg Gly	Thr Glu Arg	Pro Arg Ser	Leu	
		305		310		315	320
20	Lys Arg Gly	Ser Lys Pro	Ser Ala Ser	Ser Ala Ser	Leu Glu Lys	Arg	
		325		330		335	
25	Met Lys Met	Val Ser Gln	Ser Phe Thr	Gln Arg Phe	Arg Leu Ser	Arg	
		340		345		350	
30	Asp Arg Lys	Val Ala Lys	Ser Leu Ala	Val Ile Val	Ser Ile Phe	Gly	
		355		360		365	
35	Leu Cys Trp	Ala Pro Tyr	Thr Leu Leu	Met Ile Ile	Arg Ala Ala	Cys	
		370		375		380	
40	His Gly His	Cys Val Pro	Asp Tyr Trp	Tyr Glu Thr	Ser Phe Trp	Leu	
		385		390		395	400
45	Leu Trp Ala	Asn Ser Ala	Val Asn Pro	Val Leu Tyr	Pro Leu Cys	His	
		405		410		415	
50	His Ser Phe	Arg Arg Ala	Phe Thr Lys	Leu Leu Cys	Pro Gln Lys	Leu	
		420		425		430	
55	Lys Ile Gln	Pro His Ser	Ser Leu Glu	His Cys Trp	Lys		
		435		440		445	

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1335 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..1335

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL SEC ID NO:3:

ES 2 285 792 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

CTC CGC ACC CAG AAC AAC TTC TTT CTG CTC AAC CTC GCC ATC TCC GAC 1017
 Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
 65 70 75 80

TTC CTC GTG GGT GCC TTC TGC ATC CCA TTG TAC GTA CCC TAT GTG CTG 1065
 Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu
 85 90 95

ACC GGC CGT TGG ACC TTC GGC CGG GGC CTC TGC AAG CTG TGG CTG GTG 1113
 Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val
 100 105 110

GTA GAC TAC CTA CTG TGT GCC TCC TCG GTC TTC AAC ATC GTA CTC ATC 1161
 Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile
 115 120 125

AGC TAT GAC CGA TTC CTG TCA GTC ACT CGA GCT GTC TCC TAC AGG GCC 1209
 Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala
 130 135 140

CAG CAG GGG GAC ACG AGA CGG GCC GTT CGG AAG ATG GCA CTG GTG TGG 1257
 Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp
 145 150 155 160

GTG CTG GCC TTC CTG CTG TAT GGG CCT GCC ATC CTG AGT TGG GAG TAC 1305
 Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr
 165 170 175

CTG TCT GGT GGC AGT TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCT GAG TTC 1353
 Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe
 180 185 190

TTC TAC AAC TGG TAC TTT CTC ATC ACG GCC TCC ACC CTC GAG TTC TTC 1401
 Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe
 195 200 205

ACG CCC TTC CTC AGC GTT ACC TTC TTC AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC 1449
 Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn
 210 215 220

ATC CAG AGG CGC ACC CGC CTT CGG CTT GAT GGG GGC CGT GAG GCT GGC 1497
 Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly
 225 230 235 240

CCA GAA CCC CCA CCA GAT GCC CAG CCC TCG CCA CCT CCA GCT CCC CCC 1545
 Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

AGC TGC TGG GGC TGC TGG CCA AAA GGG CAT GGC GAG GCC ATG CCG TTG 1593
 Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu
 260 265 270

CAC AGG TAT GGG GTG GGT GAG GCA GGC CCT GGT GTT GAG GCT GGG GAG 1641
 His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Ala Gly Glu
 275 280 285

ES 2 285 792 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

GCT GCC CTC GGG GGT GGC AGT GGT GGA GGT GCT GCT GCC TCG CCC ACC	1689
Ala Ala Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr	
290 295 300	
TCC AGC TCT GGC AGC TCC TCA AGG GGC ACT GAG AGG CCA CGC TCA CTC	1737
Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu	
305 310 315 320	
AAA AGG GGC TCC AAG CCA TCA GCA TCT TCA GCA TCC CTG GAG AAG CGC	1785
Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg	
325 330 335	
ATG AAG ATG GTG TCC CAG AGC ATC ACC CAG CGC TTC CGG CTG TCG CGG	1833
Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg	
340 345 350	
GAC AAG AAG GTG GCC AAG TCG CTG GCC ATC ATC GTG AGC ATC TTT GGG	1881
Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly	
355 360 365	
CTC TGC TGG GCG CCG TAC ACG CTC CTA ATG ATC ATC CGA GCT GCT TGC	1929
Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys	
370 375 380	
CAT GGC CGC TGC ATC CCC GAT TAC TGG TAC GAG ACG TCC TTC TGG CTT	1977
His Gly Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu	
385 390 395 400	
CTG TGG GCC AAC TCG GCC GTC AAC CCC GTC CTC TAC CCA CTG TGC CAC	2025
Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His	
405 410 415	
TAC AGC TTC CGC AGA GCC TTC ACC AAG CTC CTC TGC CCC CAG AAG CTC	2073
Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu	
420 425 430	
AAG GTC CAG CCC CAC GGC TCC CTG GAG CAG TGC TGG AAG TGAGCAGCTG	2122
Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys	
435 440 445	
CCCCACCCCTT CTGAGGCCAG GCCCTTGATC TTGTTGAGT GGGCAGCCGG AGCGTGGGCG	2182
GGGCCCTGGT CCATGCTCCG CTCCAAATGC CATGGCGGCC TCTTAGATCA TCAACCCCGC	2242
AGTGGGGTAG CATGGCAGGT GGGCCAAGAG CCCTAGTTGG TGGAGCTAGA GTGTGCTGOT	2302
TAGCTCTGCC GCCACATTCT CCTTCACCAC ACAGAAGAGA CAATCCAGGA GTCCCAGGCA	2362
TGCCTTCCAC CTACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACCACA GTGCAGTGCC	2422
AGTGATGTCC CCTTTTGCAT ATTTAGTGGT TGGTGTCCCTC CCTAATGCAA ACCTCGGTGT	2482
GTGCTCCCGG CTCCGGCCCT GGCAATGCGT GCGTGCGCCC TGCATGTGCT CACACCCGCC	2542
ACACACCCCG CCGCCACACA CTTGCAACAC CTCCTCTCTC CCAGAAGAGC TGGGGACGAT	2602
GCCCTTTGCT GCCACTGTCT CTTGCTTAAT CCCAGAGCCT GGCTCCTTAT CCCCCACTCT	2662

ES 2 285 792 T3

5
10
15
20

```

CCCTTCAACT CTGCCCCACA AAGTGTGAG CGCCTCGGGA AACTTGAAGC TTCTCTGCTC 2722
CTTCCACTCT GGATGTTTTTC AGGAAGATGG AGGAGAAGAA AACACGTCTG TGAACCTTGAT 2782
GTTCCCTTGGG TGTTTAATCA AGAGAGACAA AATTGCCGAG GAGCTCGGGG CTGGATTGGC 2842
AGGTGTGGGC TCCCACGCCC TCCTCCCTCA GTGCTGCAGC TTCCGGCTGA GCCGCGCCAG 2902
CTGCTTCTGC CTGCCCCGCC CCCAGGCTTG GGACGATGGC CCTGCCCTGC TTGCCCCGTC 2962
TGTACAATCA GAATTTGGGG GTGGGTGGTT ATGGGGTAGA GCGGCTCTTC ACTGTGCCCT 3022
AAAGGTCTCG AGGCTCACAG GACAGTCAGC AGGAGAGCAG GCAGGCCCGC GACACCTGGG 3082
AGGAATGCTT TGCCTCGTCC TGTGTACTCA CCTCAGGCTT CTGCATGCTC TGCTGCCCTT 3142
GTGCCCTGGT GTGCTGCCTC TGCCAATGTG AAAACACAAT AAAGTGTATT TTTTAAAAA 3202
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAGGGCGGCC GC 3244
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:5:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 445 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA proteína

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:5:

35

```

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu
  1           5           10           15
    
```

40

```

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala
          20           25           30
    
```

45

```

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr
          35           40           45
    
```

50

```

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser
          50           55           60
    
```

55

```

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
          65           70           75           80
    
```

60

```

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu
          85           90           95
    
```

65

```

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val
          100          105          110
    
```

```

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile
          115          120          125
    
```

ES 2 285 792 T3

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala
 130 135 140
 5 Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp
 145 150 155 160
 Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr
 10 165 170 175
 Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe
 180 185 190
 15 Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe
 195 200 205
 Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn
 20 210 215 220
 Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly
 225 230 235 240
 25 Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro
 245 250 255
 Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu
 30 260 265 270
 His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Ala Gly Glu
 275 280 285
 35 Ala Ala Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr
 290 295 300
 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu
 40 305 310 315 320
 Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg
 325 330 335
 45 Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg
 340 345 350
 Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly
 50 355 360 365
 Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys
 370 375 380
 55 His Gly Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His
 60 405 410 415
 Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu
 420 425 430
 65 Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys
 435 440 445

ES 2 285 792 T3

	GTA GAC TAC CTA CTG TGT GCC TCC TCG GTC TTC AAC ATC GTA CTC ATC	384
	Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile	
	115 120 125	
5	AGC TAT GAC CGA TTC CTG TCA GTC ACT CGA GCT GTC TCC TAC AGG GCC	432
	Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala	
	130 135 140	
10	CAG CAG GGG GAC ACG AGA CGG GCC GTT CGG AAG ATG GCA CTG GTG TGG	480
	Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp	
	145 150 155 160	
15	GTG CTG GCC TTC CTG CTG TAT GGG CCT GCC ATC CTG AGT TGG GAG TAC	528
	Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr	
	165 170 175	
20	CTG TCT GGT GGC AGT TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCT GAG TTC	576
	Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe	
	180 185 190	
25	TTC TAC AAC TGG TAC TTT CTC ATC ACG GCC TCC ACC CTC GAG TTC TTC	624
	Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe	
	195 200 205	
30	ACG CCC TTC CTC AGC GTT ACC TTC TTC AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC	672
	Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn	
	210 215 220	
35	ATC CAG AGG CGC ACC CGC CTT CGG CTT GAT GGG GGC CGT GAG GCT GGC	720
	Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly	
	225 230 235 240	
40	CCA GAA CCC CCA CCA GAT GCC CAG CCC TCG CCA CCT CCA GCT CCC CCC	768
	Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro	
	245 250 255	
45	AGC TGC TGG GGC TGC TGG CCA AAA GGG CAT GGC GAG GCC ATG CCG TTG	816
	Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu	
	260 265 270	
50	CAC AGG TAT GGG GTG GGT GAG GCA GGC CCT GGT GGT GAG GCT GGG GAG	864
	His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Ala Gly Glu	
	275 280 285	
55	GCT GCC CTC GGG GGT GGC AGT GGT GGA GGT GCT GCT GCC TCG CCC ACC	912
	Ala Ala Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ser Pro Thr	
	290 295 300	
60	TCC AGC TCT GGC AGC TCC TCA AGG GGC ACT GAG AGG CCA CGC TCA CTC	960
	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu	
	305 310 315 320	
65	AAA AGG GGC TCC AAG CCA TCA GCA TCT TCA GCA TCC CTG GAG AAG CGC	1008
	Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg	
	325 330 335	

ES 2 285 792 T3

(2) INFORMACION PARA SEC ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:9:

Leu Trp Leu Val Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Phe Asn
1 5 10 15

Ile Val Leu Ile Ser Tyr
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:10:

Ala Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:11:

Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe Leu
1 5 10 15

Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

ES 2 285 792 T3

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

10

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:12:

Leu Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr
1 5 10 15

15

Leu Leu Met Ile Ile
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:13:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

30

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:13:

Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu
1 5 10 15

35

Tyr Pro Leu Cys His
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:14:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 26 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

50

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:14:

Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr Val
1 5 10 15

55

Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:15:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

ES 2 285 792 T3

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 17 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:22:
GTGGCCCACC AGAGCCT 17
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:23:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 17 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:23:
CAGCCACGCC TCTCTCA 17
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:24:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 18 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:24:
GCCTGCTGGG CCATGGAG 18
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:25:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA
(A) LONGITUD: 16 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:25:
TGAGCAGCTG CCCCAC 16
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:26:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 285 792 T3

- (A) LONGITUD: 16 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
5 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO: cADN
(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:26:
10 CTGAGGCCAG GCCCTT 16
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:27:
15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
20 (C) CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
25 (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:27:
CAAAACCCCT TTAAGCCAAG 20
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:28:
(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares base
35 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:28:
GAAGAAGGTA ACGCTGAGGA 20
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:29:
(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
50 (A) LONGITUD: 20 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENAS: sencilla
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:29:
60 CAGAACCCCC ACCAGATGCC 20
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:30:
65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares base

ES 2 285 792 T3

	GGC AGT TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCT GAG TTC TTC TAC AAC	336
	Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr Asn	
	100 105 110	
5	TGG TAC TTT CTC ATC TCG GCC TCC ACC CTC GAG TTC TTC ACG CCC TTC	384
	Trp Tyr Phe Leu Ile Ser Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe	
	115 120 125	
10	CTC AGC GTT ACC TTC TTC AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC ATC CAG AGG	432
	Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln Arg	
	130 135 140	
15	CGC ACC CGC CTT CGG CTT GAT GGG GGC CGT GAG GCT GGC CCA GAA CCC	480
	Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly Pro Glu Pro	
	145 150 155 160	
20	CCA CCA GAT GCC CAG CCC TCG CCA CCT CCA GCT CCC CCC AGC TGC TGG	528
	Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Cys Trp	
	165 170 175	
25	GGC TGC TGG CCA AAA GGG CAT GGC GAG GCC ATG CCG TTG CAC AGG TAT	576
	Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Arg Tyr	
	180 185 190	
30	GGG GTG GGT GAG GCA GGC CCT GGT GTT GAG GCT GGG GAG GCT GCC CTC	624
	Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Ala Gly Glu Ala Ala Leu	
	195 200 205	
35	GGG GGT GGC AGT GGT GGA GGT GCT GCT GCC TCG CCC ACC TCC AGC TCT	672
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ser Ser	
	210 215 220	
40	GGC AGC TCC TCA AGG GGC ACT GAG AGG CCA CGC TCA CTC AAA AGG GGC	720
	Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg Gly	
	225 230 235 240	
45	TCC AAG CCA TCA GCA TCT TCA GCA TCC CTG GAG AAG CGC ATG AAG ATG	768
	Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys Met	
	245 250 255	
50	GTG TCC CAG AGC ATC ACC CAG CGC TTC CGG CTG TCG CGG GAC AAG AAG	816
	Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Lys Lys	
	260 265 270	
55	GTG GCC AAG TCG CTG GCC ATC ATC GTG AGC ATC TTT GGG CTC TGC TGG	864
	Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys Trp	
	275 280 285	
60	GCG CCG TAC ACG CTC CTA ATG ATC ATC CGA GCT GCT TGC CAT GGC CGC	912
	Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly Arg	
	290 295 300	
65	TGC ATC CCC GAT TAC TGG TAC GAG ACG TCC TTC TGG CTT CTG TGG GCC	960
	Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp Ala	
	305 310 315 320	

ES 2 285 792 T3

	AAC TCG GCC GTC AAC CCC GTC CTC TAC CCA CTG TGC CAC TAC AGC TTC Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His Tyr Ser Phe 325 330 335	1008
5	CGC AGA GCC TTC ACC AAG CTC CTC TGC CCC CAG AAG CTC AAG GTC CAG Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu Lys Val Gln 340 345 350	1056
10	CCC CAC GGC TCC CTG GAG CAG TGC TGG AAG TGAGCAGCTG CCCCACCCTT Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys 355 360	1106
15	CTGAGGCCAG GCCCTTGATC TTGTTTGAGT GGGCAGCCGG AGCGTGGGCG GGGCCCTGGT CCATGCTCCG CTCCAAATGC CATGGCGGCC TCTTAGATCA TCAACCCCGC AGTGGGGTAG CATGGCAGGT GGGCCAAGAG CCCTAGTTGG TGGAGCTAGA GTGTGCTGGT TAGCTCTGCC	1166 1226 1286
20	GCCACATICT CCTTCACCAC ACAGAAGAGA CAATCCAGGA GTCCCAGGCA TGCCTTCAC CTACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACCACA GTGCAGTGCC AGTGATGTCC CCTTTTGCAT ATTTAGTGGT TGGTGTCTC CCTAATGCAA ACCTCGGTGT GTGCTCCCGG	1346 1406 1466
25	CTCCGGCCCT GGCAATGCGT GCGTGCGCC TGCATGTGCT CACACCCGCC ACACACCCGC CCGCCACACA CTGCAACAC CTCCTCTCTC CCAGAAGAGC TGGGGACGAT GCCCTTTGCT GCCACTGTCT CTGCTTAAT CCCAGAGCCT GGCTCCTTAT CCCCCACTCT CCCTTCAACT	1526 1586 1646
30	CTGCCCCACA AAGTGTGAG CGCCTCGGGA AACTTGAAGC TTCTCTGCTC CTCCACTCT GGATGTTTTT AGGAAGATGG AGGAGAAGAA AACACGCTG TGAACCTGAT GTTCCTTGGA TGTTTAATCA AGAGAGACAA AATTGCCGAG GAGCTCGGG CTGGATTGGC AGGTGTGGGC	1706 1766 1826
35	TCCCACGCCC TCCTCCCTCA TGCTGCAGC TTCCGGCTGA GCCCGCCAG CTGCTTCTGC CTGCCCCGCC CCCAGGCTTG GGACGATGGC CCTGCCCTGC TTGCCCCGTC TGTACAATCA GAATTTGGGG GTGGGTGGTT ATGGGGTAGA GCGGCTCTC ACTGTGCCCT AAAGGTCTCTG	1886 1946 2006
40	AGGCTCACAG GACAGTCAGC AGGAGAGCAG GCAGGCCCGC GACACCTGGG AGGAATGCTT TGCTCGTCC TGTGTACTCA CCTCAGGCTT CTGCATGCTC TGCTGCCCTT GTGCCCTGGT GTGCTGCCTC TGCCAATGTG AAAACACAAT AAAGTGTATT TTTTAAAAA AAAAAAAAAA	2066 2126 2186
50	AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAGGGCGGCC GC	2218

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:32:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD. 362 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:32.

65

ES 2 285 792 T3

Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu Thr Gly Arg
 1 5 10 15
 5 Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val Val Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr Asp
 35 40 45
 10 Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala Gln Gln Gly
 50 55 60
 15 Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp Val Leu Ala
 65 70 75 80
 Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr Leu Ser Gly
 85 90 95
 20 Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr Asn
 100 105 110
 25 Trp Tyr Phe Leu Ile Ser Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe
 115 120 125
 Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln Arg
 130 135 140
 30 Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 35 Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Cys Trp
 165 170 175
 Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Arg Tyr
 180 185 190
 40 Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Ala Gly Glu Ala Ala Leu
 195 200 205
 45 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ser Ser
 210 215 220
 Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg Gly
 225 230 235 240
 50 Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys Met
 245 250 255

55

60

65

ES 2 285 792 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

GAC ACG AGA CGG GCC GTT CGG AAG ATG GCA CTG GTG TGG GTG CTG GCC 240
 Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp Val Leu Ala
 65 70 75 80

TTC CTG CTG TAT GGG CCT GCC ATC CTG AGT TGG GAG TAC CTG TCT GGT 288
 Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr Leu Ser Gly
 85 90 95

GGC AGT TCC ATC CCC GAG GGC CAC TGC TAT GCT GAG TTC TTC TAC AAC 336
 Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr Asn
 100 105 110

TGG TAC TTT CTC ATC TCG GCC TCC ACC CTC GAG TTC TTC ACG CCC TTC 384
 Trp Tyr Phe Leu Ile Ser Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe
 115 120 125

CTC AGC GTT ACC TTC TTC AAC CTC AGC ATC TAC CTG AAC ATC CAG AGG 432
 Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln Arg
 130 135 140

CGC ACC CGC CTT CGG CTT GAT GGG GGC CGT GAG GCT GGC CCA GAA CCC 480
 Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly Pro Glu Pro
 145 150 155 160

CCA CCA GAT GCC CAG CCC TCG CCA CCT CCA GCT CCC CCC AGC TGC TGG 528
 Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Cys Trp
 165 170 175

GGC TGC TGG CCA AAA GGG CAT GGC GAG GCC ATG CCG TTG CAC AGG TAT 576
 Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Arg Tyr
 180 185 190

GGG GTG GGT GAG GCA GGC CCT GGT GTT GAG GCT GGG GAG GCT GCC CTC 624
 Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Ala Gly Glu Ala Ala Leu
 195 200 205

GGG GGT GGC AGT GGT GGA GGT GCT GCT GCC TCG CCC ACC TCC AGC TCT 672
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ser Ser
 210 215 220

GGC AGC TCC TCA AGG GGC ACT GAG AGG CCA CGC TCA CTC AAA AGG GGC 720
 Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg Gly
 225 230 235 240

TCC AAG CCA TCA GCA TCT TCA GCA TCC CTG GAG AAG CGC ATG AAG ATG 768
 Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys Met
 245 250 255

GTG TCC CAG AGC ATC ACC CAG CGC TTC CGG CTG TCG CGG GAC AAG AAG 816
 Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Lys Lys
 260 265 270

GTG GCC AAG TCG CTG GCC ATC ATC GTG AGC ATC TTT GGG CTC TGC TGG 864
 Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys Trp
 275 280 285

GCG CCG TAC ACG CTC CTA ATG ATC ATC CGA GCT GCT TGC CAT GGC CGC 912
 Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly Arg
 290 295 300

ES 2 285 792 T3

Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr
1 5 10 15

5 **Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp**
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:37:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (D) TOPOLOGÍA lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:37:

20 **Tyr Phe Leu Ile Ser Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe Leu**
1 5 10 15

25 **Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu**
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:38:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:38:

40 **Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr**
1 5 10 15

Leu Leu Met Ile Ile
20

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

50 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

55 (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIAL: SEC ID NO:39:

60 **Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu**
1 5 10 15

Tyr Pro Leu Cys His
20

65