



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 413**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04790318 .2**

96 Fecha de presentación : **12.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1673450**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2006**

54 Título: **Polipéptido VKORC1 de reciclaje de la vitamina K-epóxido, una diana terapéutica de la cumarina y sus derivados.**

30 Prioridad: **14.10.2003 US 511041 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2010

73 Titular/es: **Baxter International Inc.**
One Baxter Parkway
Deerfield, Illinois 60015, US
Baxter Healthcare S.A.

72 Inventor/es: **Oldenburg, Johannes;**
Müller-Reible, Clemens, R.;
Fregin, Andreas;
Strom, Tim-Matthias y
Rost, Simone

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

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

Polipéptido VKORC1 de reciclaje de la vitamina K-epóxido, una diana terapéutica de la cumarina y sus derivados.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos para identificar derivados de la cumarina, y reivindica asimismo polipéptidos de VKORC1 y ácidos nucleicos de VKORC1 que contienen una anomalía de secuencia asociada a una deficiencia asociada a VKORC1 tal como la resistencia a la warfarina, donde los polipéptidos de VKORC1 y los ácidos nucleicos de VKORC1 se pueden utilizar para diagnosticar estas deficiencias. Además, la invención se refiere a métodos para identificar aquellos derivados de cumarina que son útiles en el control contra plagas de roedores.

Antecedentes de la invención

La represión de la coagulación sanguínea prematura es la opción terapéutica seleccionada para el tratamiento agudo y la prevención a largo plazo de eventos trombóticos. De entre los anticoagulantes, las cumarinas se utilizan ampliamente para la prevención de la trombosis, por ejemplo en pacientes inmovilizados después de una cirugía, en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, en pacientes con enfermedad vascular aterosclerótica, en pacientes con tumores malignos y en mujeres embarazadas. Además, las cumarinas son los anticoagulantes orales más utilizados para el tratamiento y la profilaxis de la trombosis [Suttie, 1987]. Las cumarinas son derivados típicos de 6-hidroxycumarina, por ejemplo 3-(actonilbencil)-4-hidroxycumarina (COUMADIN®).

Las cumarinas tienen como objetivo la cascada de coagulación sanguínea indirectamente mediante la inhibición del ciclo de la vitamina K.

La vitamina K es un cofactor esencial para la activación post-traducción por la gamma-carboxilación de un grupo de proteínas reguladoras, las proteínas Gla. En diversas vías metabólicas, algunas proteínas clave necesitan una carboxilación para funcionar adecuadamente. La cascada de coagulación sanguínea es el ejemplo mejor estudiado. Aquí, los factores procoagulantes II, VII, IX y X, así como los factores anticoagulantes proteína C, proteína S, proteína Z, dependen de la gamma-carboxilación. Esta modificación post-traducción permite la fijación de las proteínas modificadas, en presencia de calcio, a las membranas fosfolipídicas bicapa, lo que representa una etapa esencial en la activación de la coagulación sanguínea [Sperling y col., 1978; Esmon y col., 1975]. Otras proteínas que requieren de la gamma-carboxilación son la proteína de matriz gla y la osteocalcina, ambas reguladoras del metabolismo óseo [Price, 1988] y “el gen específico de la inhibición del crecimiento”, una proteína señal de transducción del ciclo celular [Manfioletti y col., 1993; Stitt y col., 1995].

Durante la gamma-carboxilación se introduce un grupo carboxilo en los residuos glutamato de las proteínas diana mediante la enzima gamma-glutamyl carboxilasa (GGCX) en los microsomas del hígado [Furie & Furie, 1988; Suttie, 1987]. La reacción requiere como cofactor cantidades estequiométricas de vitamina K1-hidroquinona reducida (vitamina K1H2), que se oxida a vitamina K-2,3-epóxido [Cain y col., 1997]. La regeneración del cofactor activo es mediada por un complejo multiproteína denominado vitamina K-2,3-epóxido reductasa (VKOR) [Wallin & Martin, 1985]. El mismo complejo es el objetivo de los venenos de tipo cumarina utilizados en el control plaguicida de roedores. Este “ciclo de la vitamina K” se ha caracterizado bioquímicamente de forma detallada, pero los componentes moleculares no han sido purificados todavía hasta homogeneidad [Guenther y col., 1981]. Además, la naturaleza molecular de la actividad de la cumarina y las moléculas que interactúan con las cumarinas siguen siendo imprecisas.

En general se aprecia en la técnica que, a pesar de su gran eficacia, existe diversas limitaciones al uso de las cumarinas. En primer lugar, algunos seres humanos son insensibles al tratamiento con cumarina. El término resistencia a la warfarina (WR) se utiliza para individuos que mantienen actividades normales del factor de coagulación a pesar de la anticoagulación oral con cumarinas (Acceso OMIM N° 122700). Se ha observado una transmisión autosómica dominante en varios linajes [O'Reilly y col., 1964; O'Reilly, 1970]. La deficiencia combinada de todos los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (VKCFD) es un trastorno de sangrado muy raro en humanos con herencia autosómica recesiva, 14 casos descritos hasta la fecha [McMillan & Roberts, 1966; Fischer, 1966; Johnson y col., 1980; Goldsmith y col., 1982; Vicente y col., 1984; Ekelund y col., 1986; Pauli y col., 1987; Leonard, 1988; Pechlaner y col., 1992; Boneh & Bar-Ziv, 1996; Brenner y col., 1998; Spronk y col., 2000; Oldenburg y col., 2000]. Los síntomas clínicos de la enfermedad incluyen episodios de hemorragias intracerebrales perinatales, a veces con resultado fatal. Habitualmente, la tendencia al sangrado se invierte por completo mediante la administración oral de vitamina K. Los síntomas adicionales en recién nacidos se asemejan a la embriopatía por warfarina con hipoplasia falangiana basal y distal y calcificación prematura de la epífisis [Pauli y col., 1987]. La enfermedad puede resultar de una resorción/transporte defectuoso de la vitamina K al hígado [Prentice, 1985] o de mutaciones en uno de los genes implicados en la gamma-carboxilación. En el subtipo 1 (VKCFD1, OMIM # 277450), las mutaciones en el gen GGCX sobre el cromosoma 2p12 resultan en una carboxilación insuficiente de los factores de coagulación [Brenner y col., 1998; Spronk y col., 2000]. Se ha descrito una conexión de dos familias con la deficiencia múltiple familiar del factor de coagulación (FMFD, ahora renombrado: VKCFD2, OMIM # 607473) a un intervalo de 20 Mb de la región pericéntrica del cromosoma 16p12-q21 [Fregin y col., 2002]. Los pacientes con VKCFD2 mostraron niveles de suero con un notable aumento de vitamina K-epóxido, sugiriendo así un defecto en una de las subunidades del complejo VKOR. En su conjunto, es evidente que existen pacientes que presentan resistencia a la warfarina. Como

consecuencia, existe la necesidad de identificar nuevos derivados de cumarinas que sean anticoagulantes eficaces para tratar a estos pacientes, así como métodos para identificar estos derivados de la cumarina.

El uso de cumarinas se asocia con un riesgo de sangrado espontáneo, con un índice de mortalidad significativo. Además, la predicción de la dosis exacta de mantenimiento de la cumarina es difícil. En ausencia de la molécula diana sobre la que la cumarina ejerce un efecto, el régimen de tratamiento debe establecerse en base a cada paciente. Mientras el régimen óptimo no se ha establecido todavía, el paciente tiene un mayor riesgo de trombogénesis o de sangrado. Por tanto, es necesario un método para determinar el régimen óptimo de tratamiento lo más rápido y seguro posible. Además, el establecimiento de un régimen de tratamiento óptimo se complica por el hecho de que existe un retraso considerable entre la administración de las cumarinas y el desencadenamiento de su actividad anticoagulante. Dada la acción retardada de la cumarina y considerando el hecho de que la cumarina tiende a acumularse con el tiempo, existe la necesidad de derivados de cumarina que permitan la coagulación sanguínea de forma más rápida que las cumarinas conocidas en la técnica. De la misma manera, existe también la necesidad de cumarinas que se metabolicen más rápidamente, de forma que se pueda impedir o mejorar la acumulación de cumarina y, consecuentemente, reducir o suprimir el riesgo de sobredosis.

Se entenderá que cuando el tratamiento con cumarina se inicia durante un estado trombotico, los niveles de proteína C y S disminuyen, creando así temporalmente un potencial trombotico que normalmente es compensado superponiendo la administración de heparina y cumarina durante varios días. De nuevo, se necesita identificar la diana molecular de acción de la cumarina con el fin de poder buscar nuevos derivados de cumarina que no tengan estas limitaciones o al menos las tengan en menor medida.

A menudo, la terapia con cumarina provoca necrosis de la piel en el paciente y, cuando se aplica durante el embarazo, puede causar embriopatía, creando la necesidad de nuevos derivados de cumarina que no provoquen estos efectos.

Existen diversas interacciones entre los medicamentos y las cumarinas. Algunos de estos medicamentos, como el Fenobarbital, inducen niveles plasmáticos más bajos de las cumarinas debido a la mayor metabolización de la cumarina, que se piensa se debe a las oxidasas de función mixta, como las oxidasas de función mixta citocromo P450. Dicha interacción es de importancia clínica cuando se ha determinado el régimen apropiado, por ejemplo Fenobarbital y cumarina, y más tarde, al administrar solamente Fenobarbital, se suspende, conduciendo a un aumento del nivel plasmático de cumarina, lo que provoca una anticoagulación excesiva. Otros medicamentos como la Amiodarona provocan la metabolización retardada de la cumarina, conduciendo de nuevo a una anticoagulación excesiva cuando se administra conjuntamente con cumarinas. Debido a que no se conocen en la técnica moléculas afectadas por las cumarinas, existe la necesidad de desarrollar nuevas cumarinas y herramientas para identificar estas últimas con el fin de resolver estos problemas.

La WO 00/03015 describe secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de homólogos de proteínas transportadoras humanas, así como el uso de las mismas (véase, por ejemplo, página 1, líneas 5 a 7). Además, en la Base de Datos EMBL, librería de ADNc de *Mus musculus* (XP002318821) se describe un ADNc de una cabeza de embrión de *Mus musculus* de 13 días (véase por ejemplo el título). Además, Fregin, A. y col., Blood, Vol. 100, Nº 9, 1 de noviembre de 2002, describe la asignación de un segundo gen para la deficiencia combinada múltiple hereditaria del factor de coagulación al cromosoma 16 (véase, por ejemplo, página 3231, columna de izquierda, líneas 22 a 25) y Zimmermann, A. y col., Biochemical Pharmacology, Vol. 23, pp. 1033-1040, describe la influencia de la warfarina en la formación de protrombina y la regeneración de vitamina K a partir del vitamina K-2,3-epóxido (véase por ejemplo el resumen).

Finalmente, las cumarinas, en especial la warfarina, no sólo se utilizan en humanos, sino que, desde los años 50, las cumarinas se han empleado como ingrediente activo en composiciones rodenticidas. La base de la eficacia de la warfarina como rodenticida se basa en el hecho de que es un anticoagulante eficaz en pequeñas dosis múltiples. Una o dos dosis del compuesto son rara vez fatales si se toman a la concentración recomendada; por tanto, el riesgo de toxicidad aguda para el ser humano, animales domésticos y para la naturaleza se reduce en gran medida. Habitualmente, los roedores empiezan a morir después de cuatro o cinco dosis diarias de material y la población se reduce o se erradica en aproximadamente tres semanas. La muerte es causada por hemorragias, ocasionadas por la acción de la warfarina en la reducción del poder de coagulación de la sangre. Estas hemorragias pueden ser externas o internas y pueden empezar por una lesión muy leve o por un daño capilar. Otra ventaja de las cumarinas es que, como se necesitan múltiples ingestiones para matar los roedores, no desarrollan rechazo al cebo. A principios de 1969, los roedores, en particular ratas y en menor medida ratones, empezaron a mostrar resistencia a los cebos de warfarina. La suposición general era que dicha resistencia tenía una base genética. Por lo que se refiere al mecanismo, el complejo VKORC1 mencionado anteriormente es el blanco de los derivados de la warfarina utilizada para el control de plagas de roedores [Jackson y col., 1988]. La resistencia a los derivados de la cumarina ha surgido espontáneamente en varias poblaciones de roedores salvajes, provocando que el uso de estos medicamentos sea localmente ineficaz para el control de plagas. Se han mapeado los loci dominantes autosómicos para la resistencia a la warfarina en el ratón (War) al cromosoma 7 [Wallace y col., 1976] y en la rata (Rw) al brazo largo del cromosoma 1 [Greaves & Ayres, 1967; Kohn & Pelz, 1999]. Como el complejo VKOR es el blanco de los medicamentos con cumarina, se piensa que la resistencia es mediada por alteraciones en uno de sus componentes proteicos [Jackson, 1988]. El desarrollo de la resistencia en los roedores ha creado la necesidad de identificación del blanco de la acción de las cumarinas, lo que facilitaría el desarrollo de nuevos derivados de cumarina para su uso en el control de plagas.

En su conjunto, es un objeto de la presente invención proporcionar una molécula diana para la cumarina y sus derivados en los mamíferos. Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos para identificar nuevas cumarinas que resuelvan al menos uno de los problemas mencionados anteriormente. Otro objeto de la presente invención consiste en identificar los polipéptidos y ácidos nucleicos que codifican para las mismas, lo que causa la resistencia a la warfarina en mamíferos humanos y no humanos, preferentemente en roedores. También es objeto de la presente invención diagnosticar, prevenir y/o tratar trastornos y enfermedades seleccionadas de entre las enfermedades derivadas de la resistencia a la warfarina, deficiencia familiar múltiple del factor, trastorno o enfermedad asociada con el aumento de la coagulación sanguínea, por ejemplo en pacientes que padecen de un trombo y/o en pacientes que corren un alto riesgo de desarrollar un trombo, tal como un riesgo heredado creciente de trombogénesis, preferentemente un riesgo creciente de trombogénesis debida a una cirugía o debida al embarazo, y a la calcificación vascular creciente. Además, también es un objeto de la presente invención diagnosticar, prevenir y/o tratar enfermedades o trastornos asociados con la coagulación sanguínea atenuada, tal como hemofilia, trastorno asociado a la calcificación vascular reducida, así como trastornos y enfermedades con un alto riesgo de sangrado. Finalmente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para identificar la cumarina y sus derivados, los cuales son eficaces para el control de plagas de mamíferos no humanos, así como composiciones para eliminar roedores.

Sumario de la invención

Para resolver los objetivos mencionados anteriormente, se proporciona un método para identificar un derivado de cumarina que ejerza un efecto sobre la actividad del polipéptido VKORC1 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

- a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:1, 12 y 17;
- b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
- c) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de homología con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), caracterizada porque la secuencia polipeptídica tiene actividad de VKORC1; y
- d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) que tiene actividad de VKORC1,

método que incluye las etapas de:

- i. proporcionar una célula huésped en la que se ha introducido el ácido nucleico de VKORC1 o un vector que contiene el ácido nucleico de VKORC1;
- ii. expresar el polipéptido de VKORC1 en la célula huésped;
- iii. administrar un derivado de cumarina candidato;
- iv. determinar la actividad del polipéptido VKORC1 (valor de actividad del candidato);
- v. comparar el valor de la actividad del candidato con un valor de actividad de control; e
- vi. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado de la cumarina que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido de VKORC1, siempre que el valor de la actividad del candidato sea significativamente diferente al valor de actividad de control.

Además, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar una secuencia polipeptídica de VKORC1 que conlleva un efecto de la cumarina ejercido sobre la actividad de VKORC1, comprendiendo las etapas de:

- i. proporcionar una célula que expresa el polipéptido de VKORC1 de acuerdo con la invención, polipéptido de VKORC1 que tiene al menos una anomalía de secuencia;
- ii. administrar cumarina o un derivado de la misma a la célula;
- iii. determinar la actividad del polipéptido VKORC1 (valor de la actividad de la anomalía en la secuencia); y
- iv. comparar el valor de la actividad de la anomalía en la secuencia con el valor de actividad de la secuencia control,

donde una desviación significativa del valor de actividad de la anomalía en la secuencia con respecto al valor de actividad de la secuencia control indica que la anomalía en la secuencia del polipéptido VKORC1 transmite el efecto de la cumarina ejercido sobre el polipéptido VKORC1.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido VKORC1 de acuerdo con la invención, donde el polipéptido VKORC1 contiene al menos una anomalía de secuencia que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido VKORC1 y donde el polipéptido VKORC1 es el polipéptido según la SEQ ID NO:1 ó 12 y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C.

Además, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para diagnosticar la resistencia a la warfarina o una deficiencia múltiple del factor de coagulación de tipo 2 (VKCFD2) en un paciente, comprendiendo las etapas de:

- i. amplificar una muestra de ADN obtenida del paciente o realizar una transcripción inversa de una muestra de ARN obtenida del paciente en un ADN y amplificar el ADN; y
- ii. analizar el ADN amplificado de la etapa (i) para determinar al menos una anomalía de secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido VKORC1 o de una secuencia de aminoácido de un polipéptido de VKORC1;

donde la anomalía determinada de la secuencia indica que el paciente padece una deficiencia asociada a VKORC1; preferentemente, la anomalía de la secuencia ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido VKORC1.

Además, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar un derivado de cumarina que es toxicológicamente eficaz contra roedores resistentes a la warfarina, el cual comprende las etapas de:

- i. proporcionar un roedor resistente a la warfarina;
- ii. administrar al roedor un derivado de cumarina candidato;
- iii. determinar la toxicidad del derivado de cumarina candidato en el roedor (valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato);
- iv. comparar el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato con un valor de toxicidad de cumarina control;
- v. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado de cumarina rodenticida eficaz siempre que el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato sea significativamente superior al valor de toxicidad de la cumarina control.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra una comparación del intervalo candidato de 3cM en el mapa genético que contiene el locus del gen VKORC1 humano, de rata y de ratón. Se muestra el ideograma del cromosoma 16 humano, la zona de homocigocidad en las familias 1 y 2 se extiende de 16p11.2 a 16q13, lo que corresponde aproximadamente a 25 Mb. En la parte derecha de la figura, se muestran las partes homólogas de los cromosomas de ratón y rata. Se describen los genes sintéticos de 16p11.2 y 16q12.1 con las contrapartes homólogas en *Mus musculus* (MMU) y *Rattus norvegicus* (RNO). Los loci para el fenotipo de resistencia a la warfarina en el ratón (War) y la rata (Rw) se mapean en regiones homólogas a 16p11.2. MMU: *Mus musculus*; RNO: *Rattus norvegicus*; PRKCB1; Prkcb; IL4R: receptor de interleucina-4 (humano); Il4ra: receptor de interleucina-4 (murino); Il4r: receptor de interleucina-4 (rata); SPS2: selenofosfato sintetasa (humana); Sps2: selenofosfato sintetasa (murina/rata); HUMMLC2B: cadena ligera 2 de miosina (humana); Mylpf: cadena ligera 2 de miosina (murina); Myl2: cadena ligera 2 de miosina (rata); SPN: sialoforina (humana); Spn: sialoforina (murina/rata).

Figura 2: muestra mutaciones de VKORC1 en el factor 2 humano de coagulación dependiente de la vitamina K (VKCFD2) y en pacientes con resistencia a la warfarina (WR). La parte superior de la figura muestra la segregación de la mutación R98W en dos familias de VKCFD2 y los electroferogramas de un homocigoto mutante (izquierda) en comparación con un control (derecha). La parte inferior de la figura muestra las mutaciones heterocigotas de cuatro pacientes con WR (85G>T, 134T>C, 172A>G, 383T>G) y una rata con RW (416A>G).

Figura 3: muestra la alineación de secuencias de los polipéptidos de VKORC1 y la proteína 1 de tipo VKORC1 (VKORC1L1). La alineación fue generada por CLUSTALW y PRETTYBOX. Los polipéptidos VKORC1 humano (hVKORC1), de ratón (mVKORC1) y de rata (rVKORC1), así como VKORC1L1, es decir VKORC1L1 humano (hVKORC1L1), de ratón (mVKORC1L1) y de *Fugu rubripes* (fVKORC1L1), comparten aproximadamente un 84% de identidad de secuencia dentro de ambos grupos y aproximadamente un 50% de identidad entre ambos grupos de proteínas. xVKORC1 describe la secuencia de polipéptidos de VKORC1 de *Xenopus laevis*, fVKORC1 secuencia de polipéptidos de VKORC1 de *Fugu rubripes* y aVKORC1, secuencia de polipéptidos de VKORC1 de *Anopheles gambiae*. El análisis de árbol permite agrupar las proteínas de *Fugu rubripes*, *Xenopus laevis* y *Anopheles gambiae* en el grupo apropiado. Se subrayan los emplazamientos de los dominios transmembrana previstos. Los residuos 29, 45, 58 y 128 mutados en pacientes con WR se conservan en todas las especies. La arginina en la posición 98 mutada en los pacientes con VKCFD2 se conserva en los humanos, ratas y ratones (signo +).

Figura 4: muestra un análisis Northern blot de VKORC1 en tejidos humanos fetales y adultos. La mancha superior describe un Northern blot de tejido adulto, mientras que la mancha inferior describe un Northern blot de tejido fetal. Para más detalles, véase el Ejemplo 4. Las líneas con fragmentos de tamaño 2.4, 4.4, 7.5 y 9.5 KB indican marcadores de peso molecular y permiten la estimación del tamaño de todas las bandas visibles.

Figura 5: muestra el emplazamiento subcelular de VKORC1. Para más detalles, véase el Ejemplo 6. Con este fin, células COS-7 transfectadas transitoriamente con los constructos de VKORC1 se tiñeron con anti-calnexina (rojo; columna de la izquierda) y anti-GFP o anti-myc, respectivamente (verde; columna del medio). Las figuras unidas de las células con doble tinción se muestran en la columna de la derecha. Ambos constructos de VKORC1 (marcados con GFP o myc) se localizan juntos en la tinción con calnexina específica de ER. El constructo control (pEGFP-N1) muestra un modelo de tinción difusa por todo el citoplasma.

Figura 6: muestra una lista de secuencias de ARNsi para VKORC1 de *homo sapiens* y cebadores que codifican estos ARNsi que se pueden utilizar para su expresión utilizando por ejemplo el Sistema de Interferencia por ARN de siLentGene™ U6 Cassette.

Figura 7: muestra los emplazamientos de ARNsi diana en la secuencia de codificación de la subunidad del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *homo sapiens* (Hs_VKORC1), que se muestran en gris claro; las regiones que forman parte de dos ARNsi diana posibles se muestran en gris más oscuro; y las regiones con dos o más secuencias de ARNsi posibles se muestran en un gris aun más oscuro.

Figura 8: proporciona una lista de secuencias de cebadores PCR así como las condiciones de PCR para la amplificación de VKORC1 de *Homo sapiens* y de VKORC1L1 de *Homo sapiens*.

Figura 9: proporciona una lista de las secuencias con sus respectivos SEQ ID NO.

Figura 10: muestra las actividades VKOR de células HEK293 transfectadas con ADNc de VKORC1. Los valores son dados como porcentaje de vitamina K-epóxido convertido en vitamina K-quinona (producto/sustrato residual + producto). Se define también la actividad VKORC1 de tipo salvaje que es sensible a la warfarina (un 4,3% de la actividad residual a 80 μ M de warfarina comparada con la no inhibida). Las mutaciones de Y139C y V29L que conducen a la resistencia a la warfarina muestran una actividad residual del 69% y del 11% a 80 μ M de warfarina respectivamente). Se llevaron a cabo todas las pruebas por duplicado. Las no transfectadas y mock-transfectadas mostraron actividades del 1,49% y del 0,96%, y fueron inhibidas en más del 90% por 10 μ M de warfarina. Para más detalles véase el Ejemplo 7.

Figura 11: muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de reciclaje de vitamina K-epóxido de *Homo sapiens* (HS_VKORC1; SEQ ID NO:1).

Figura 12: muestra el ácido nucleico que codifica la secuencia del polipéptido de reciclaje de vitamina K-epóxido de *Homo sapiens* (HS_VKORC1; SEQ ID NO:2).

Figura 13: muestra el resultado de un experimento ARMS-PCR para determinar si una rata sometida a prueba es resistente o no a la warfarina. Las ratas de tipo salvaje mostraron una banda a 123 pb (sonda # 3351, 3133, 3137, 3142, 4724, 4684, 3138, 3162), las ratas homocigotas para la mutación (sonda # 4701) mostraron una banda a 101 pb y, finalmente, las ratas con la mutación heterocigota (sonda # 3066, 3350, 3352, 3354, 3139, 3140, 4754, 3146, 3148, 3149) mostraron dos bandas, una banda a 101 y otra a 123 pb. Para más detalles véase el Ejemplo 9.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de satisfacer las necesidades de desarrollo de nuevos derivados de cumarina e identificar la diana de la cumarina y sus derivados, se clonó el polipéptido de reciclaje de vitamina K-epóxido (VKORC1). Este gen era anteriormente desconocido, abarcando una región genómica de 5.126 pb y comprendiendo tres exones que codifican para una proteína de 163 aminoácidos. El análisis topológico sugiere una proteína altamente hidrofóbica con al menos dos dominios transmembrana. Esto es compatible con el emplazamiento conocido de la actividad del complejo VKORC1 en las membranas del RE y con datos de inmunofluorescencia en células COS-7 transfectadas con constructos de VKORC1 (Fig. 5).

Sorprendentemente, el gen VKORC1 se identificó en un estudio de mutantes en pacientes resistentes a la warfarina (para más detalles, véanse los Ejemplos 1 y 2). Se ha identificado sorprendentemente un gen, VKORC1, que muta en pacientes con una deficiencia combinada de todos los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (VKCFD2) y con resistencia a la warfarina (WR), respectivamente, lo que demuestra que el polipéptido VKORC1 contiene un sitio de unión para la warfarina y es una diana de la cumarina y sus derivados. La evidencia de que las mutaciones son causantes de los dos fenotipos es la siguiente:

- i) una mutación R98W se segrega con la enfermedad en dos familias no relacionadas con VKCFD2;
- ii) esta arginina en la posición 98 se conserva en los genes humanos y en los genes homólogos de ratón y rata, respectivamente;

- iii) tres hermanos resistentes a la warfarina comparten una sustitución R58G;
- iv) este aminoácido y los demás residuos encontrados mutados en dos pacientes WR no relacionados (V29L y L128R) se conservan en todas las especies analizadas excepto para tres genes bacterianos (véase la Fig. 3); y
- v) ninguna de las 5 supuestas mutaciones se encontró en 192 muestras de ADN de control.

Además, las búsquedas de homología en las bases de datos genómicas y de proteínas no han revelado similitudes de VKORC1 con ninguna proteína o dominio peptídico de la función comentada. Sin embargo, se encuentran genes homólogos en los vertebrados (rata, ratón, *Xenopus*, Fugu), insectos (*Anopheles*) y bacterias (Fig. 3). Sorprendentemente, los tres mamíferos y el Fugu tienen cada uno un segundo gen de tipo VKORC1 de similitud moderada con el gen afín. Cierta número de posiciones de aminoácidos dentro de estos genes se conservan en toda la evolución. Esto está de acuerdo con el hecho bien establecido de que la gamma-carboxilación, y por tanto el uso de vitamina K como cofactor de este proceso, es una vieja modificación post-traduccion de la proteína evolutiva [Bandyopadhyay y col., 2002].

Una sustitución de valina 29, arginina 58, leucina 128, aunque dispersa sobre la totalidad del polipéptido VKORC1, hace que la inhibición de la actividad de VKORC1 por la warfarina sea obviamente ineficaz. Se especula sobre la posibilidad de que estos aminoácidos cooperen funcionalmente en la estructura terciaria de la proteína 1 de VKORC1. Tomando conjuntamente los datos sobre la mutación en pacientes con dos fenotipos diferentes, VKORC1 se ofrece como proteína diana tanto para la unión de la vitamina K como de la warfarina.

En el sentido de la invención, el término “polipéptido VKORC1” se refiere a la secuencia de longitud total del polipéptido VKORC1, que comprende, que preferentemente consiste en, una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

- a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO: 1, 12, 17, 21, 25 y 27;
- b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
- c) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de homología con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), secuencia polipeptídica que tiene la actividad de VKORC1; y
- d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b), o (c) que tiene la actividad de VKORC1.

Preferentemente, el polipéptido VKORC1 es una diana para la cumarina y sus derivados en mamíferos.

El término “polipéptido VKORC1” abarca también los polipéptidos aislados de VKORC1 y los polipéptidos de VKORC1 que se preparan por medio de métodos recombinantes, por ejemplo mediante aislamiento y purificación a partir de una muestra de una célula huésped que expresa el polipéptido VKORC1, mediante estudio de librerías y mediante síntesis de proteínas, siendo conocidos todos estos métodos por los especialistas en la técnica. Preferentemente, se puede sintetizar la totalidad del polipéptido VKORC1 o partes del mismo, por ejemplo, con la ayuda de síntesis convencionales, tal como la técnica de Merrifield. De forma especialmente preferente, el término “polipéptido VKORC1” engloba también los polipéptidos que tienen una homología de secuencia del 80% aproximadamente, en especial del 90% aproximadamente, en particular del 95% aproximadamente, con especial preferencia del 98% aproximadamente, con el polipéptido VKORC1 de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 1, 12, 17, 21, 25 y 27, siempre que dicho polipéptido VKORC1 tenga la actividad de VKORC1. Además, preferentemente el término “polipéptido VKORC1” engloba también polipéptidos homólogos que proceden de organismos distintos de los humanos, preferentemente de mamíferos no-humanos tales como roedores, por ejemplo ratones, ratas, o monos y cerdos y otros vertebrados e invertebrados, tales como aquellas secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 12, 17, 21, 25, 27, siempre que dicho polipéptido VKORC1 tenga la actividad de VKORC1. Es especialmente preferente que el término “polipéptido VKORC1” incluya también los polipéptidos de VKORC1 que están codificados por distintos alelos del gen, en diferentes individuos, en distintos órganos de un organismo o en distintas fases del desarrollo, siempre que dicho polipéptido VKORC1 tenga la actividad de VKORC1. Se pretende además que el término “polipéptido VKORC1” englobe preferentemente también mutaciones naturales o sintéticas que no ejercen ningún efecto o sólo efectos insignificantes sobre la actividad del polipéptido VKORC1. Otros polipéptidos englobados preferentemente por el término “polipéptido VKORC1” incluyen polipéptidos VKORC1 que pueden surgir de empalmes diferenciales de la transcripción de VKORC1, siempre que dicho polipéptido VKORC1 tenga la actividad de VKORC1.

El término “fragmento de la secuencia polipeptídica” pretende englobar secuencias parciales de los polipéptidos VKORC1, fragmentos que comprenden, que consisten preferentemente en, al menos alrededor del 60%, preferentemente al menos alrededor del 70%, con más preferencia al menos alrededor del 80%, en particular al menos alrededor del 90%, especialmente al menos alrededor del 95% de la secuencia de longitud total del polipéptido VKORC1. En particular, preferentemente el fragmento consiste en una única secuencia contigua del polipéptido VKORC1, pero pue-

de contener también al menos dos, al menos tres o al menos aproximadamente cinco distintas porciones de secuencias de un polipéptido VKORC1 de acuerdo con la invención que pueden tener o no una secuencia heteróloga intercalada o no contener ninguna secuencia polipeptídica extra.

5 El término “homología de secuencia” se entiende como el grado de identidad (% de identidad) de dos secuencias que, en el caso de los polipéptidos, puede ser determinada por medio de, por ejemplo, BlastP 2.0.1. y en el caso de ácidos nucleicos por medio de, por ejemplo, BLASTN 2.014, en el que se activa el filtro y BLOSUM es 62 (Altschul y col., 1997).

10 “Actividad de VKORC1” dentro del contexto de la presente invención pretende significar la actividad biológica del polipéptido VKORC1 de SEQ ID NO: 1. De forma especialmente preferente, se define “actividad de VKORC1” como actividad del polipéptido VKORC1 para convertir enzimáticamente (o soportar la conversión enzimática) de vitamina K-2,3-epóxido en vitamina K-quinona y/o la conversión de vitamina K-quinona en vitamina K-hidroquinona. Se puede determinar la actividad de VKORC1 por medio de un ensayo basado en los experimentos descritos detalladamente en el Ejemplo 7 y en la Figura 10. Por medio de este ensayo, el porcentaje medido de vitamina K-epóxido convertido en vitamina K-quinona (producto/sustrato + producto) en células que expresan determinado polipéptido de VKORC1, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido VKORC1, que eleva la actividad basal de VKOR de las células HEK293 desde aproximadamente un 1% (1,49 y 0,96% respectivamente para células HEK293 no transfectadas y mock-transfectadas) hasta aproximadamente un 15% o más, preferentemente hasta aproximadamente un 18% o más, en particular hasta aproximadamente un 20% o más, especialmente hasta aproximadamente un 25% o más, se considera actividad de VKORC1 dentro del significado de la invención.

Los polipéptidos de VKORC1 de acuerdo con la presente invención se pueden producir por medio del método descrito más detalladamente a continuación. Entre otras cosas, los polipéptidos VKORC1 son útiles para identificar derivados de la cumarina que evitan los problemas descritos anteriormente. En particular, son útiles para identificar derivados de cumarina que inhiben eficazmente la actividad de VKORC1 y que, en ensayos independientes, se someten a prueba (1) en cuanto a su vida media metabólica, con el fin de identificar derivados de la cumarina que se metabolizan más rápidamente que las cumarinas conocidas en la técnica, (2) en cuanto a su capacidad para provocar la necrosis de la piel, para identificar derivados de cumarina que no provoquen necrosis de la piel o en menor medida que las cumarinas conocidas en la técnica, (3) en cuanto a las interacciones entre el derivado de cumarina y el medicamento, con el fin de identificar derivados de cumarina con menos efectos secundarios que las cumarinas conocidas en la técnica. Además, los polipéptidos VKORC1 de acuerdo con la presente invención son útiles para identificar una secuencia de VKORC1 que interactúa con la cumarina y sus derivados, y para tratar a pacientes con actividad reducida o aumentada de VKORC1 con respecto a los niveles control.

35 El término “ácido nucleico de VKORC1” se refiere a ARN o ADN, que puede ser una molécula de una sola hebra o preferentemente de doble hebra. La secuencia de ácido nucleico de VKORC1 puede comprender además al menos un intrón y/o una secuencia poliA. El término “ácido nucleico de VKORC1” puede englobar asimismo una etapa precursora, por ejemplo un propolipéptido o prepolipéptido del mismo. Se entiende también que pueden estar presentes secuencias no traducidas en el extremo 5' y/o 3' del ácido nucleico sin que se altere significativamente la actividad del polipéptido codificado. Sin embargo, es particularmente preferente la región de ADN que codifica el polipéptido de VKORC1. En eucariotas, esta región empieza por el primer codón de inicio (ATG) que está localizado en una secuencia Kozak (Kozak, 1987) y se extiende hasta el siguiente codón de parada (TAG, TGA o TAA) que está localizado en el mismo marco de lectura que el ATG. En el caso de procariotas, esta región empieza por el primer AUG (o GUG) después de una secuencia Shine-Dalgarno y termina por el siguiente codón de parada (TAG, TGA o TAA) que está localizado en el mismo marco de lectura que el ATG. Además, el término “ácido nucleico de VKORC1” puede englobar asimismo secuencias que muestran al menos aproximadamente un 70%, en particular al menos aproximadamente un 80%, especialmente al menos aproximadamente un 90%, de homología de secuencia con la secuencia según las SEQ ID NO: 2, 13, 18, 22, 26 y 28, preferentemente con la secuencia según la SEQ ID NO: 2, siempre que el polipéptido de VKORC1 codificado por dicho ácido nucleico tenga actividad de VKORC1. En una realización preferente de la invención, el ácido nucleico comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria y/o antisentido a un ácido nucleico de VKORC1, el cual comprende, preferentemente consiste esencialmente en, una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo consistente en:

- 55 a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido VKORC1 de acuerdo con la invención;
- b) una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO: 2, 13, 18, 22, 26 y 28;
- 60 c) una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes a la secuencia de ácido nucleico definida en (a) o (b), secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con actividad de VKORC1;
- d) una secuencia de ácido nucleico que, salvo por la degeneración del código genético, se hibridizaría, preferentemente en condiciones astringentes, al ácido nucleico definido en (a), (b) o (c) y la secuencia de ácido nucleico codificando para un polipéptido con actividad de VKORC1; y
- 65

- e) un fragmento de la secuencia de ácido nucleico definida en (a), (b), (c) o (d), fragmento que codifica para un polipéptido con actividad de VKORC1.

Preferentemente, el ácido nucleico de VKORC1 codifica una diana para la cumarina y sus derivados en mamíferos.

El ácido nucleico de VKORC1 puede comprender asimismo una variante mutante no funcional del ácido nucleico de VKORC1 como se ha definido anteriormente, tal como una variante que contiene un polimorfismo de nucleótido único (SNP) tal como las secuencias de ácido nucleico según las SEQ ID NO: 8 y 9, siempre que el polipéptido VKORC1 codificado por dicho ácido nucleico tenga la actividad de VKORC1.

El término “condiciones astringentes de hibridación” se debe entender, en particular, como aquellas condiciones en las que tiene lugar una hibridación, por ejemplo, a 60°C en un tampón 2,5 x SSC seguido de varias etapas de lavado a 37°C en una concentración más baja de tampón y que permanece estable.

Se entiende que el término “fragmento de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene la actividad de VKORC1” engloba fragmentos de la secuencia de ácido nucleico que comprenden, que consisten preferentemente en, al menos alrededor del 60%, preferentemente al menos alrededor del 70%, con más preferencia al menos alrededor del 80%, particularmente al menos alrededor del 90%, especialmente al menos alrededor del 95% de la secuencia de longitud total que codifica para el polipéptido VKORC1 de acuerdo con la invención, preferentemente codificando para el polipéptido según la SEQ ID NO:1, siempre que el polipéptido codificado por dicho fragmento tenga la actividad de VKORC1. En particular, preferentemente el fragmento consiste en una sola secuencia contigua que codifica para el polipéptido VKORC1, pero puede contener también al menos dos, al menos tres o al menos alrededor de cinco porciones de secuencia diferentes, que pueden contener una secuencia heteróloga intercalada o no contener ninguna secuencia extra de ácido nucleico, siempre que todas las porciones de la secuencia estén dispuestas en el mismo marco de lectura. Es esencial para la definición de estos fragmentos que muestren la actividad de VKORC1.

Los ácidos nucleicos de VKORC1 se pueden producir por medio de métodos generalmente conocidos por el especialista en la técnica. Los ácidos nucleicos se pueden preparar de forma sintética. Así, los ácidos nucleicos de VKORC1 se pueden sintetizar por ejemplo químicamente, por ejemplo de acuerdo con el método del fosfotriéster, con ayuda de las secuencias de ADN tal como se ha definido anteriormente y/o con la ayuda de las secuencias de polipéptidos que se definen del mismo modo anteriormente, tal como la SEQ ID NO:1 y haciendo referencia al código genético (véase, por ejemplo, Uhlmann & Peyman, 1990). Preferentemente, los ácidos nucleicos de VKORC1 se producen por métodos de la tecnología genética recombinante bien conocidos por el especialista en la técnica.

Entre otras cosas, los ácidos nucleicos de VKORC1 son útiles (1) para identificar derivados de cumarina que eviten los problemas descritos anteriormente, (2) para producir cebadores para PCR, sondas de ADN y ARN, ARNsi o ARNsh, y para el polipéptido de VKORC1, (3) para tratar a pacientes con actividad reducida o incrementada de VKORC1 con respecto a los valores de control, y (4) para identificar aquellos derivados de cumarina que se pueden emplear para el control de plagas de roedores, todos ellos descritos detalladamente más abajo.

Tal como se emplea aquí, una célula huésped puede ser cualquier célula huésped tal como se define a continuación. Los métodos para seleccionar y cultivar células huésped y para que las células huésped puedan expresar un polipéptido son generalmente conocidos del especialista en la técnica. Lo mismo es aplicable con respecto a los métodos para aislar el polipéptido expresado de la célula huésped; con este fin, se puede utilizar un anticuerpo de acuerdo con la invención para la precipitación por inmunofluorescencia. Como alternativa, el vector puede contener una etiqueta (poli)peptídica que permita la precipitación por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos de etiquetado de acuerdo con los protocolos estándar conocidos del especialista (véase también más abajo).

También es posible añadir al menos otra “etiqueta polipeptídica”, por ejemplo con el propósito de purificar los polipéptidos de VKORC1 anteriormente descritos. Por ejemplo, las etiquetas proteicas adecuadas permiten que las proteínas de fusión que deben ser purificadas sean absorbidas con gran afinidad en una matriz. Esto es seguido después, por ejemplo, de lavados astringentes con tampones adecuados, sin eluir las proteínas de fusión hasta un punto significativo, y, posteriormente, la elución específica de las proteínas de fusión. Ejemplos de etiquetas proteicas conocidas por los especialistas en la técnica son la etiqueta (His)₆, etiqueta Myc, etiqueta FLAG, etiqueta hemaglutinina, etiqueta glutatión transferasa (GST), teniendo la íntima una etiqueta de unión de quitina de afinidad y una etiqueta proteica de unión a maltosa (MBP). Estas etiquetas proteicas se pueden localizar de forma N-terminal, C-terminal y/o interna con respecto al polipéptido de VKORC1. Las proteínas de fusión son útiles, por ejemplo, para la producción de VKORC1 y su aislamiento posterior. Además, las proteínas de fusión se pueden emplear para detectar la localización del producto de expresión en la célula o el organismo.

Con el fin de que se puedan utilizar los ácidos nucleicos de VKORC1 de acuerdo con la presente invención, éstos se pueden introducir en una célula eucariota o procariota por medio de transfección, transformación o infección, permitiendo así la expresión del polipéptido. El ácido nucleico de VKORC1 puede estar presente como plásmido o como parte de un vector viral o no viral. Vectores virales particularmente adecuados a este respecto son: baculovirus, virus vaccinia, adenovirus, adenovirus asociados y virus del herpes. Vectores no virales particularmente adecuados son, por ejemplo, virosomas, liposomas, lípidos catiónicos y ADN conjugado a polilisina. Los vectores pueden ser vectores de expresión procariotas o eucariotas. Ejemplos de vectores de expresión procariotas son los vectores pGEM o derivados de pUC, que se utilizan para la expresión en *E. coli*, y ejemplos de vectores de expresión eucariotas son

los vectores p426Met25 o p426GAL1 (Mumberg y col., 1994), que se utilizan para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, vectores de Baculovirus tales como los descritos en EP 0 127 839 B1 o EP 0 549 721 B1, que se utilizan para la expresión en células de insectos, así como los vectores Rc/CMV y Rc/RSV, o los vectores SV40, que se utilizan para la expresión en células de mamíferos, estando disponibles generalmente todos estos vectores. En general, los vectores de expresión contienen asimismo promotores que son apropiados para la célula respectiva, tal como el promotor trp para la expresión en *E. coli* (véase por ejemplo EP-0 154 133 B1), el promotor Met 25, GAL 1 o ADH2 para la expresión en levaduras (Russel y col., 1983; Mumberg, véase más arriba) y el promotor de polihedrina del baculovirus para la expresión en células de insectos (véase por ejemplo EP 0 127 839 B1).

Los promotores que permiten la expresión constitutiva, específica de tejidos, específica del tipo de células, específica del ciclo celular o específica del metabolismo en células eucariotas son adecuados, por ejemplo, para la expresión en células de mamíferos. Los elementos regulables de acuerdo con la presente invención son promotores, secuencias activadoras, potenciadores, silenciadores y/o secuencias represoras. Ejemplos de elementos regulables preferentes que permiten la expresión constitutiva en eucariotas son promotores que son reconocidos por la ARN polimerasa III o promotores virales, potenciador de CMV, promotor de CMV, promotor de SV40 o promotores de LTR, por ejemplo derivados de MMTV (virus de tumor mamario del ratón; Lee y col., 1981) y otros promotores virales y secuencias activadoras que derivan, por ejemplo, de HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV o VIH. Ejemplos de elementos regulables que permiten la expresión inducible en eucariotas son el operador de la tetraciclina en combinación con un represor apropiado (Gossen y col., 1994). La expresión de los ácidos nucleicos de VKORC1 tiene lugar preferentemente bajo el control de promotores específicos de tejidos. Los vectores de expresión se pueden utilizar para preparar polipéptidos VKORC1, sondas de ADN o ARN, o ARNsi o ARNsh, que se pueden utilizar de acuerdo con la invención.

“Actividad de VKORC1 alterada” dentro del significado de la invención se refiere a un nivel de actividad y/o expresión de la proteína de VKORC1 que es inferior al nivel de actividad y/o expresión del control (tal como se ha definido anteriormente) determinado en un sujeto sano; los niveles de actividad respectivos se pueden determinar también en base al ensayo que se describe en el Ejemplo 7.

Tal como se utiliza aquí, una célula huésped puede ser cualquier célula adecuada para la expresión de polipéptidos de VKORC1 y/o ácidos nucleicos de VKORC1, preferentemente una célula HEK293-EBNA. Las células pueden ser células procariotas o eucariotas, células heterólogas o autólogas. Ejemplos de células procariotas son *E. coli* y ejemplos de células eucariotas incluyen células primarias de hepatocitos, células de levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o células de insectos. Preferentemente, la célula huésped es una línea celular, por ejemplo, una célula COS tal como células COS-7 o líneas celulares de hepatocitos, tal como células HepG2. Además, la célula huésped es preferentemente una célula madre embrionaria no humana. Los métodos para seleccionar y cultivar células huésped y para que las células huésped expresen un polipéptido son generalmente conocidos por el especialista en la técnica. Los procesos para la transformación de células y/o células madre del mismo modo son conocidos por el especialista en la técnica e incluyen, por ejemplo, electroporación o microinyección. Las células huésped de la presente invención se pueden emplear por ejemplo en métodos de identificación de derivados de cumarina, para producir polipéptidos de VKORC1 y ácidos nucleicos de VKORC1, ARNsi y ARNsh de acuerdo con la invención, y para estudiar nuevos medicamentos, tales como derivados de cumarina que tienen la actividad y/o expresión de VKORC1.

En general, los animales transgénicos muestran una expresión incrementada específica de tejido de los polipéptidos VKORC1 y/o de los ácidos nucleicos de VKORC1 y se pueden utilizar para el análisis de trastornos de la coagulación y la resistencia a warfarina, así como para el desarrollo y la evaluación de estrategias terapéuticas para dichos trastornos. Los animales transgénicos se pueden emplear además en la producción de polipéptidos VKORC1. El polipéptido producido por el animal puede ser enriquecido por ejemplo en un fluido corporal del animal.

Los métodos para la preparación de animales transgénicos, en particular de ratones transgénicos, son también conocidos por el especialista en la técnica a partir de DE 196 25 049 y US 4.736.866; US 5.625.122; US 5.698.765; US 5.583.278 y US 5.750.825 e incluyen animales transgénicos que se pueden producir, por ejemplo, por inyección directa de los vectores de expresión de acuerdo con la presente invención en embriones o espermatozoides o por inyección de los vectores de expresión en el pronúcleo del huevo fertilizado o por medio de la transfección de los vectores de expresión en células madre embrionarias o por transferencia nuclear en células receptoras apropiadas (Polites & Pinkert, 1994; Doetschman, in Pinkert, 1994, *supra*; Wood in Pinkert, 1994, *supra*; Monastersky in Pinkert, 1994, *supra*).

Dentro del significado del término “deficiencia asociada a VKORC1” se pretende englobar un trastorno o enfermedad que se asocia con la resistencia a la warfarina, es decir que el paciente muestra una susceptibilidad reducida o anulada al tratamiento con cumarina o sus derivados; preferentemente, la resistencia a la warfarina resulta de una anomalía de secuencia en el polipéptido VKORC1. Además, el término engloba preferentemente también trastornos o enfermedades asociadas con un nivel de actividad y/o expresión de VKORC1 que difiere significativamente de la condición en pacientes sanos, preferentemente la expresión del polipéptido VKORC1 y/o su actividad se reduce significativamente o anula, lo que se puede determinar por ejemplo mediante medida del tiempo de la protrombina, por ejemplo por el protocolo del coeficiente internacional normalizado (INR). Dicha deficiencia asociada a VKORC1 puede ser provocada por una anomalía de secuencia en el polipéptido VKORC1 o en el ácido nucleico de VKORC1, tal como se describe detalladamente más abajo. Además, cuando el nivel de expresión y/o de actividad del polipéptido VKORC1 o del ácido nucleico de VKORC1 se reduce o incluso se anula completamente, la gamma-carboxilación de las proteínas dependientes de la vitamina K también puede verse alterada. Por tanto, en este contexto, el término “deficiencia asociada a VKORC1” engloba también enfermedades y/o trastornos seleccionados de entre la deficiencia

múltiple familiar del factor, trastornos o enfermedades asociadas a una coagulación reducida de la sangre, tal como hemofilia, y trastornos asociados a la calcificación vascular reducida, enfermedades y/o trastornos asociados con la gamma-carboxilación alterada de las proteínas dependientes de la vitamina K.

Se puede concebir también que el nivel de expresión y/o actividad del polipéptido VKORC1 será creciente con respecto a la condición en pacientes sanos. Dichas deficiencias que están englobadas también en el término “deficiencia asociada con el VKORC1” pueden ser causadas por una anomalía de secuencia en el polipéptido VKORC1 y/o en el gen correspondiente. Además, cuando el nivel de expresión y/o de actividad del polipéptido VKORC1 o del ácido nucleico de VKORC1 aumenta, la gamma-carboxilación de las proteínas dependientes de la vitamina K también puede verse facilitada. Así, en este contexto, el término “deficiencia asociada con VKORC1” puede comprender además deficiencias seleccionadas de entre enfermedades o trastornos asociados a un aumento de la coagulación de la sangre, incluidos los pacientes que padecen de trombos y/o pacientes con alto riesgo de desarrollar trombos, preferentemente debido a una anomalía de secuencia en el polipéptido VKORC1 o en su gen, enfermedades y/o trastornos asociados con la gamma-carboxilación mejorada de las proteínas dependientes de la vitamina K.

También es posible que una anomalía de secuencia en el polipéptido VKORC1 y/o en el gen correspondiente pueda aumentar la susceptibilidad al tratamiento con cumarina y sus derivados en un paciente que posee dicha anomalía de secuencia. Como consecuencia, los pacientes que reciben un tratamiento con cumarina pueden mostrar valores muy bajos de coagulación sanguínea. Se pretende también que dichos trastornos asociados a la mayor sensibilidad al tratamiento con cumarina estén englobados por el término “deficiencia asociada con VKORC1”. Los pacientes que portan un gen VKORC1 con una mutación de parada sufren de dicha deficiencia asociada con una sensibilidad incrementada a la cumarina.

El término “muestra” se refiere a un biomaterial que comprende una célula o un tejido adulto o fetal, preferentemente tejido o células, preferentemente aislados o derivados del corazón, riñón y pulmón, páncreas, cerebro, placenta y músculo esquelético, así como sangre, preferentemente hepática. La muestra se puede aislar de un paciente o de otro sujeto por medio de métodos que incluyen métodos invasivos o no invasivos. Son bien conocidos por los especialistas los métodos invasivos y comprenden, por ejemplo, aislamiento de la muestra mediante punción, eliminación quirúrgica de la muestra del cuerpo abierto o por medio de instrumentos endoscópicos. Los métodos mínimamente invasivos y no invasivos son conocidos también por el especialista en la técnica e incluyen, por ejemplo, la recogida de fluidos corporales tales como sangre, preferentemente por venipuntura, o de orina o heces. El término “muestra” puede englobar asimismo una librería genómica o de expresión, construida preferentemente en base a una muestra aislada procedente de un paciente, en cuyo caso se pueden utilizar técnicas para el aislamiento de ADNc que son bien conocidas por el especialista.

De acuerdo con la presente invención, el término “anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo” se entiende también en referencia a anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos preparados por ingeniería genética y opcionalmente modificados, tales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multifuncionales, anticuerpos bi- u oligo-específicos, anticuerpos monohebra, fragmentos F(ab) o F(ab)₂ (véase, por ejemplo, EP 0 368 684 B1, US 4.816.567, US 4.816.397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación de un derivado de cumarina que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido VKORC1 tal como se ha definido anteriormente, preferentemente un polipéptido VKORC1 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

- a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia según las SEQ ID NO:1, 12 y 17;
- b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
- c) una secuencia polipeptídica con al menos un 80% de homología con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), caracterizada porque la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y
- d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) con la actividad de VKORC1,

que comprende las etapas de:

- I. proporcionar una célula huésped donde se ha introducido el ácido nucleico de VKORC1 o un vector que contiene el ácido nucleico de VKORC1;
- II. expresar el polipéptido VKORC1 en la célula huésped;
- III. administrar un derivado de cumarina candidato;
- IV. determinar la actividad del polipéptido VKORC1 (valor de actividad del candidato);

V. comparar el valor de actividad del candidato con un valor de actividad de control; e

VI. identificar el derivado de cumarina candidato como un derivado de cumarina que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido VKORC1, siempre que el valor de actividad del candidato sea significativamente diferente del valor de actividad del control.

La actividad determinada del polipéptido VKORC1 es la conversión dependiente de ditiotreitól de vitamina K-2,3-epóxido en vitamina K-quinona y se caracteriza porque el valor de actividad significativamente diferente es un valor de actividad del candidato que es significativamente más alto que el valor de actividad del control, tal como se ha descrito de forma más detallada anteriormente así como en el Ejemplo 7 y la Figura 10. Si esencialmente la misma concentración del derivado de cumarina candidato produce un porcentaje más bajo de vitamina K-epóxido convertido en vitamina K-quinona (producto/sustrato + producto) que el correspondiente a la warfarina a esta concentración, es indicativo de que el derivado de cumarina candidato tiene un efecto inhibitor más fuerte que la warfarina, y viceversa.

Preferentemente, en el método de identificación de un derivado de cumarina de acuerdo con la presente invención, el valor de actividad de control se determina por medio de un método que comprende las etapas de:

A. proporcionar una célula huésped de acuerdo con la etapa (I);

B. expresar el polipéptido VKORC1 en la célula huésped; y

C. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de actividad de control).

De forma especialmente preferente, en el método de identificación de un derivado de cumarina de acuerdo con la presente invención, se introduce al menos un compuesto adicional en la célula huésped, compuesto que se selecciona de entre el grupo consistente en vitamina K, citocromo B5, un ácido nucleico que codifica para la gamma-glutamyl-carboxilasa, para la epoxidehidrolasa microsomal, para la calumenina o para la glutatión-S-transferasa. Los métodos para introducir ácidos nucleicos en células huésped han sido descritos en detalle más arriba. Preferentemente, los ácidos nucleicos se expresan bajo el control de un promotor constitutivamente activo o de un promotor que se puede activar específicamente en la célula huésped seleccionada.

Los métodos para identificar derivados de cumarina son útiles para desarrollar nuevos derivados de cumarina que evitan al menos una de las limitaciones de la cumarina y de sus derivados conocidos en la técnica. Cuando se incluye un análisis de la cinética de coagulación sanguínea como ensayo individual en la determinación de la actividad del polipéptido de VKORC1, el método de acuerdo con la invención puede resultar útil para identificar los derivados de cumarina que median en la coagulación sanguínea más rápidamente que la cumarina y sus derivados conocidos en la técnica y/o que se metabolizan más rápidamente, de tal modo que la acumulación de cumarina y de sus derivados se puede prevenir o mejorar, reduciendo con ello el riesgo de sobredosis sustancialmente o incluso eliminándolo. Además, dicho método de identificación se puede combinar con otros ensayos de forma que puedan identificarse los derivados de cumarina que tienen un efecto más fuerte (más débil) sobre la actividad de VKORC1 y, por tanto, a su vez, sobre la coagulación sanguínea, derivados de cumarina que, en ensayos independientes, demuestran (1) ser metabolizados más rápidamente, de forma que se puede prevenir o mejorar la acumulación de cumarina y con ello reducir sustancialmente o eliminar el riesgo de sobredosis, (2) no provocar o provocar en menor medida la necrosis de la piel en pacientes o la embriopatía cuando se aplican durante el embarazo, y/o (3) ser metalizados más rápidamente o ser menos/más estables y/o verse menos afectados por otros medicamentos como el Fenobarbital o la amiodarona. Los ensayos adecuados para buscar dichas propiedades de los derivados de la cumarina, y que se deben combinar en un estudio con el método de identificación de un derivado de cumarina de acuerdo con la invención, son bien conocidos por el especialista en la técnica.

Se entiende que el término “cumarina” significa 3-(acetonilbencil)-4-hidroxicumarina, es decir COUMADIN® o warfarina sódica.

Se entiende que el término “derivado de cumarina” engloba compuestos orgánicos o inorgánicos, péptidos, polipéptidos o complejos de los mismos, siempre que ejerzan un efecto sobre la actividad y/o la expresión del polipéptido VKORC1, preferentemente un efecto que inhibe la actividad del polipéptido VKORC1, de forma especialmente preferente un efecto específico del polipéptido VKORC1, es decir que el derivado de cumarina no interactúa directamente con otras moléculas implicadas en la vía de la coagulación. Ejemplos de dichos compuestos son moléculas orgánicas que proceden de librerías de compuestos, preferentemente aquellas que han sido analizadas en cuanto a su actividad farmacológica. Debido a su interacción, los derivados de cumarina pueden influir en la actividad del polipéptido VKORC1 *in vivo* y/o *in vitro* e iniciar interacciones covalentes o no covalentes con ellas. Cuando el derivado de cumarina es un compuesto quiral, se entiende que “derivado de cumarina” engloba también las formas enantioméricas respectivas R- y L- del compuesto, como aquellas descritas en la WO 00/43003. En particular, el término “derivado de cumarina” se refiere a compuestos derivados de 4-hidroxicumarina, especialmente compuestos derivados de COUMADIN. De forma especialmente preferente, “derivado de cumarina” incluye también cualquier coagulante que inhiba la regeneración de vitamina K activa.

Se entiende que el término “derivado de cumarina candidato” engloba compuestos orgánicos o inorgánicos, péptidos, polipéptidos o complejos. Ejemplos de dichos compuestos son moléculas orgánicas que proceden de librerías de

compuestos, preferentemente aquellas que han sido analizadas en cuanto a su actividad farmacológica. Preferentemente, el término se refiere a compuestos que están relacionados estructuralmente o que derivan de la 4-hidroxycumarina, especialmente compuestos relacionados o derivados de COUMADIN. Si el derivado de cumarina candidato es un compuesto quiral, se entiende que las formas enantioméricas respectivas R- y L- del compuesto, como aquellas descritas en la WO 00/43003, están incluidas también en el término “derivado de cumarina candidato”.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una secuencia polipeptídica VKORC1 que conduce a un efecto de la cumarina ejercido sobre la actividad de VKORC1, el cual comprende las etapas de:

- I. proporcionar una célula que expresa un polipéptido VKORC1 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:
 - a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO:1, 12 y 17;
 - b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
 - c) una secuencia polipeptídica con al menos un 80% de homología con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), caracterizada porque la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y
 - d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) con la actividad de VKORC1,

preferentemente un polipéptido de acuerdo con las SEQ ID NO:1, 12, 17, 21, polipéptido VKORC1 que tiene al menos una anomalía de secuencia, preferentemente una anomalía de secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C;
- II. administrar la cumarina o un derivado de la misma a la célula;
- III. determinar la actividad del polipéptido VKORC1 (valor de actividad de la anomalía de secuencia); y
- IV. comparar el valor de actividad de la anomalía de secuencia con el valor de actividad de la secuencia de control,

donde una desviación significativa del valor de la actividad de la anomalía de secuencia con respecto al valor de la actividad de la secuencia control indica que la anomalía de secuencia del polipéptido VKORC1 confiere el efecto de la cumarina ejercido sobre el polipéptido VKORC1. La actividad del polipéptido VKORC1 se puede determinar tal como se ha descrito en detalle anteriormente.

De forma especialmente preferente, en el método de determinación de la secuencia polipeptídica de VKORC1 se determina la actividad de la secuencia de control mediante un método que comprende las etapas de:

- I. proporcionar una célula que expresa un polipéptido de VKORC1, la cual comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:
 - a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO:1, 12 y 17;
 - b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
 - c) una secuencia polipeptídica con al menos un 80% de homología con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), caracterizada porque la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y
 - d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) con la actividad de VKORC1,
- II. administrar la cumarina o un derivado de la misma a la célula;
- III. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de actividad de la secuencia de control).

La actividad determinada de VKORC1 es la conversión dependiente de ditiotreitól de vitamina K-2,3-epóxido en vitamina K-quinona y el valor significativamente diferente es un valor de actividad de la anomalía de secuencia que es significativamente más alto que el valor de actividad de la secuencia control. Se proporcionan más detalles más arriba así como en el Ejemplo 7 y la Figura 10. El método puede servir para identificar aquellos polipéptidos de VKORC1 que sean menos sensibles a la cumarina. Al introducir polipéptidos de VKORC1 con distintas anomalías de secuencia,

este método permite la identificación de sitios del polipéptido que son críticos para la interacción de la cumarina y el VKORC1 sometidos a prueba. Dicho conocimiento será útil, por ejemplo, para diseñar nuevas cumarinas.

Es particularmente preferente en el método de determinación de una secuencia polipeptídica de VKORC1 que se introduzca al menos un compuesto adicional en la célula, compuesto que se selecciona de entre el grupo consistente en vitamina K, citocromo B5, y un ácido nucleico que codifica para la gamma-glutamyl-carboxilasa, para la epoxidehidrolasa microsomal, para la calumenina o para la glutatión-S-transferasa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido de VKORC1 caracterizado porque el polipéptido de VKORC1 contiene al menos una anomalía de secuencia que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido de VKORC1 y donde el polipéptido de VKORC1 es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 ó 12, y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C.

Dicho polipéptido de VKORC1 que contiene al menos una anomalía de secuencia se puede generar por métodos generalmente conocidos por el experto, incluyendo técnicas recombinantes y, por ejemplo, mutagénesis sitio-dirigida, o mediante aislamiento del polipéptido de VKORC1 que tiene la al menos una anomalía de secuencia de una muestra obtenida de un paciente, preferentemente de un paciente que padece deficiencias asociadas con VKORC1. Se han descrito detalladamente más arriba los métodos para aislar proteínas de una muestra.

El polipéptido de VKORC1 que contiene al menos una anomalía de secuencia que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido de VKORC1 se puede utilizar, por ejemplo, para generar anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos de VKORC1. Estos anticuerpos a su vez se pueden utilizar para diagnosticar deficiencias asociadas con VKORC1.

El término “anomalía de secuencia” engloba adiciones, inserciones, deleciones, sustituciones de al menos un aminoácido, que resultan en una alteración de la secuencia polipeptídica de VKORC1, preferentemente de la secuencia polipeptídica de VKORC1 de acuerdo con la SEQ ID NO:1. Asimismo están incluidas las adiciones, inserciones, deleciones, sustituciones de al menos un nucleótido que conducen a una secuencia alterada de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de VKORC1. También se incluyen los cambios de la secuencia de ácido nucleico de VKORC1 que conducen a un cambio en el marco de lectura de la secuencia del ácido nucleico.

Las anomalías de secuencia están indicadas en el código de aminoácidos con una sola letra, colocándose el aminoácido original a la izquierda del número que indica el número del aminoácido en la secuencia polipeptídica de acuerdo con la SEQ ID NO:1. El número a la derecha del número de aminoácido indica el aminoácido que sustituye al aminoácido original. Por ejemplo, la anomalía de secuencia V29L indica que en la posición 29 del polipéptido de VKORC1 de SEQ ID NO:1, el aminoácido valina (V) ha sido sustituido por leucina (L). En caso de que la anomalía de secuencia tenga lugar en un polipéptido de VKORC1 distinto del polipéptido de VKORC1 de SEQ ID NO:1, el número en el código se refiere a la posición de la secuencia de acuerdo con la numeración de los aminoácidos en aquel otro polipéptido particular.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar la resistencia a la warfarina o una deficiencia múltiple del factor de coagulación de tipo 2 (VKCFD2) en un paciente, el cual comprende las etapas de:

- I. amplificar una muestra de ADN obtenida del paciente o la transcripción inversa de una muestra de ARN obtenida del paciente en un ADN y amplificar el ADN; y
- II. analizar el ADN amplificado de la etapa (I) para determinar al menos una anomalía de secuencia en una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de VKORC1 o en una secuencia de aminoácido de un polipéptido de VKORC1;

donde la anomalía determinada de la secuencia indica que el paciente sufre una deficiencia asociada a VKORC1, preferentemente resistencia a la warfarina; preferentemente la anomalía de secuencia ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido VKORC1, preferentemente la anomalía de secuencia se selecciona de entre V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C.

Los métodos para obtener muestras de un paciente y para aislar ARN total o ARNm son bien conocidos por el especialista, algunos de los cuales han sido descritos más arriba. Las técnicas para la amplificación de ADN no están particularmente limitadas e incluyen técnicas PCR que han sido descritas también más arriba. De la misma manera, se han mencionado anteriormente técnicas para la transcripción inversa, y no están particularmente limitadas e incluyen la transcripción inversa por medio de protocolos convencionales; los kits comerciales suelen emplear la transcriptasa inversa y cebadores oligo-dT. El análisis puede basarse también en el ADN genómico aislado de una muestra obtenida de un paciente.

Cuando se amplifica, el ADN se analiza con el fin de determinar al menos una anomalía de secuencia en una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido VKORC1. Los métodos para analizar el ADN amplificado no están particularmente limitados. Preferentemente, el ADN amplificado se analiza por medio de una técnica seleccionada de entre el grupo consistente en análisis basado en PCR, utilizando preferentemente cebadores para PCR específicos de la anomalía de secuencia, análisis de digestión de restricción y análisis de secuenciación de ADN.

En una realización preferente, el ácido nucleico que porta la anomalía de secuencia codifica para una secuencia de VKORC1 que tiene una anomalía de secuencia y se selecciona de entre el grupo compuesto de V29L (85 G>T), V45A (134 T>C), R58G (172 A>G), R98W (292 C>T) y L128R (383 T>G), Y139C (416 A>G). En una realización preferente del método de diagnóstico, el ADN amplificado codifica al menos una secuencia parcial del polipéptido de VKORC1 de acuerdo con la SEQ ID NO:1. Se proporciona en el Ejemplo 8 una forma de determinar una anomalía de secuencia que está asociada con una deficiencia asociada con VKORC1.

Se proporcionan secuencias de VKORC1 de acuerdo con la invención, las cuales contienen las mutaciones 85 G>T, 134 T>C, 172 A>G, 292 C>T y 383 T>G en las SEQ ID NO:3 a 7 y se pueden utilizar como sondas para diagnosticar una deficiencia asociada con VKORC1 por medio del análisis basado en la técnica de hibridación de muestras de ácido nucleico obtenidas de un paciente.

Como alternativa, la expresión de VKORC1 se puede detectar a nivel del polipéptido de VKORC1. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar en un paciente la resistencia a la warfarina o la deficiencia múltiple del factor de coagulación de tipo 2 (VKCFD2), que comprende las etapas de:

- I. proporcionar una muestra obtenida del paciente; y
- II. detectar en la muestra un polipéptido de VKORC1 con una anomalía de secuencia, utilizando un anticuerpo o un fragmento del mismo, el cual reconoce específicamente y se une al polipéptido de VKORC1 de la reivindicación 10,

donde la anomalía de secuencia determinada indica que el paciente padece una deficiencia asociada con VKORC1. Preferentemente, la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C.

Ya se han descrito detalladamente métodos para obtener muestras. Los métodos para la detección del polipéptido de VKORC1 con una anomalía de secuencia no están particularmente limitados, siempre que el método permita la detección específica de la proteína que porta la(s) anomalía(s) de secuencia. Ejemplos de dichos métodos incluyen preferentemente detección inmunohistoquímica, inmunoblotting, preferentemente Western blotting, y ELISA del polipéptido, con particular preferencia con anticuerpos específicos del polipéptido de VKORC1 con una anomalía de secuencia tal como se ha definido anteriormente. El análisis de anomalías de secuencia a nivel de la secuencia de aminoácidos no está particularmente limitado y se puede llevar a cabo por ejemplo por medio de los anticuerpos de VKORC1 que reconocen específicamente y se unen al polipéptido de VKORC1 que tiene una o más anomalías de secuencia.

Preferentemente, los métodos de diagnóstico se utilizan para diagnosticar enfermedades y/o trastornos seleccionados de entre resistencia a la warfarina, deficiencia familiar múltiple del factor, trastorno o enfermedad asociada a la coagulación reducida o anulada de la sangre, tal como hemofilia y trastornos asociados a la calcificación vascular reducida, enfermedades y/o trastornos asociados a la gamma-carboxilación alterada de las proteínas dependientes de la vitamina K.

Además, los métodos de diagnóstico se pueden utilizar también para diagnosticar trastornos y enfermedades asociadas a un aumento de la coagulación sanguínea, incluyendo pacientes y/o pacientes con un alto riesgo de desarrollar trombos debido a una anomalía de secuencia en el polipéptido de VKORC1 o en su gen, enfermedades y/o trastornos asociados con la gamma-carboxilación mejorada de las proteínas dependientes de la vitamina K.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un derivado de cumarina que ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad de un polipéptido VKORC1 con al menos una anomalía de secuencia, el cual comprende las etapas de:

- I. proporcionar una célula que expresa un polipéptido de VKORC1, donde el polipéptido de VKORC1 contiene al menos una anomalía de secuencia, que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido de VKORC1, y donde el polipéptido de VKORC1 es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 ó 12 y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C, preferentemente un polipéptido codificado por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en 3, 4, 5, 6, 7, 14 y 94;
- II. administrar un derivado de cumarina candidato a la célula;
- III. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de actividad de la anomalía de secuencia); y
- IV. comparar el valor de actividad de la anomalía de secuencia con el valor de actividad de la secuencia de control,
- V. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado de cumarina que ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad de un polipéptido de VKORC1, cuando la administración del derivado de cumarina

candidato resulta en un valor de actividad de la anomalía de secuencia que es significativamente más bajo que el valor de actividad de la secuencia de control.

De forma especialmente preferente, el valor de actividad de la secuencia de control se determina por medio de un método que comprende las etapas de:

- I. proporcionar una célula que expresa el polipéptido de VKORC1 de la reivindicación 1, preferentemente un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 ó 12;
- II. administrar cumarina a la célula;
- III. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de actividad de la secuencia de control).

La actividad del polipéptido de VKORC1 se puede determinar tal como se describe detalladamente más arriba, y se puede adoptar el método a partir del método descrito en el Ejemplo 7. Dicho método de identificación de un derivado de cumarina sirve para identificar derivados de cumarina que se pueden utilizar como anticoagulantes en pacientes con resistencia a la warfarina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación de un derivado de cumarina que es toxicológicamente eficaz en roedores resistentes a la warfarina, el cual comprende las etapas de:

- I. proporcionar un roedor resistente a warfarina;
- II. administrar un derivado de cumarina candidato al roedor;
- III. determinar la toxicidad del derivado de cumarina candidato sobre el roedor (valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato);
- IV. comparar el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato con un valor de toxicidad de una cumarina control; y
- V. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado de cumarina toxicológicamente eficaz, siempre que el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato sea significativamente más alto que el valor de toxicidad de la cumarina control,

donde el roedor resistente a warfarina es un roedor transgénico para un polipéptido de VKORC1 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

- a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:1, 12 y 17;
- b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
- c) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de homología con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), donde la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y
- d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) que tiene la actividad de VKORC1,

donde el polipéptido de VKORC1 contiene al menos una anomalía de secuencia que provoca la resistencia a la warfarina, preferentemente un polipéptido codificado por la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:14 o una rata resistente a la warfarina comercial o una rata salvaje capturada con resistencia a la warfarina. En particular, el polipéptido VKORC1 es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:12 y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L (85 G>T), V45A (134 T>C), R58G (172 A>G), R98W (292 C>T), L128R (383 T>G) e Y139C (416 A>G).

La muestra puede ser cualquier órgano, tejido, fluido corporal o sonda siempre que contenga ADN genómico o ARNm procedente de la rata que ha de someterse a prueba. Preferentemente, la muestra es sangre, tejido de la cola o del oído, orina o heces. Se proporcionan más detalles sobre el método en el Ejemplo 9.

Se han descrito roedores resistentes a warfarina (Kohn & Pelz, 1999) y se pueden obtener de suministradores comerciales (por ejemplo, The Federal Biological Research Center for Agriculture and Forestry, Institute for Nematology and Vertebrate Research, Toppeideweg 88, 48161 Münster, Alemania). En una realización preferente, el roedor resistente a warfarina es un roedor transgénico para el polipéptido de VKORC1 que contiene al menos una anomalía de secuencia, anomalía de secuencia que provoca la resistencia a la warfarina. En particular, el polipéptido de VKORC1 que contiene al menos una anomalía de secuencia es el polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las SEQ ID NO:3 a 7, y 15, y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en

V29L (85 G>T), V45A (134 T>C), R58G (172 A>G), R98W (292 C>T), L128R (383 T>G) e Y139C (416 A>G). Se han descrito anteriormente los métodos para generar el roedor, en particular ratones transgénicos para los polipéptidos de VKORC1 enumerados.

- 5 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere al uso de cebadores para PCR de acuerdo con las SEQ ID NO:88 a 91 para determinar si una rata tiene o no un genotipo de resistencia a la warfarina en una muestra obtenida de una rata.

10 La administración de cumarina y sus derivados no está particularmente limitada. Las composiciones toxicológicamente eficaces que contienen típicamente cumarina (warfarina) se formulan como composiciones granulares de cebo que contienen aproximadamente de 50 a 300 ppm, preferentemente alrededor de 250 ppm, de cumarina y sus derivados. El cebo se formula típicamente con un 0,5% hasta un 2,5% de concentrado de warfarina en un ligante adecuado, tal como aceite de maíz. Cuando se utiliza aceite de maíz como ligante, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 2% de la composición total. El ligante y la warfarina se mezclan
15 entonces, por ejemplo, con un producto basado en cereales, harina de maíz, avena arrollada, alimentos mixtos para animales y productos similares conocidos en la técnica. La administración, es decir la cantidad, formulación, frecuencia y duración de la administración, puede seguir protocolos estándar para evaluar la toxicidad de la warfarina en los roedores, preferentemente sigue protocolos estándar para evaluar el valor de dosis letal 50 (LD₅₀) para determinado veneno que ha de someterse a prueba, todo ello generalmente conocido por el especialista y descrito en el Ejemplo 9.

20 Para que el derivado de cumarina sea toxicológicamente eficaz es conveniente que se exijan múltiples ingestiones para matar el roedor, de forma que no desarrolle rechazo al cebo. Por tanto, es preferible repetir cierta cantidad de veces la administración de las composiciones con el derivado de cumarina candidato. Normalmente, los roedores empiezan a morir después de cuatro o cinco dosis diarias de las composiciones. Además, puede resultar preferente suprimir el dolor en las ratas con el fin de reducir su sufrimiento durante los experimentos mediante la administración de agentes supresores del dolor generalmente conocidos por especialista. La inclusión de supresores del dolor en la composición de cumarina y del derivado de la cumarina puede resultar además ventajosa para suprimir también la posibilidad de que los roedores desarrollen rechazo al cebo.

30 Después de la administración, se determina la toxicidad del derivado de cumarina candidato en el roedor, lo que resulta en el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato. Los métodos para determinar la toxicidad de los derivados de cumarina candidatos son generalmente conocidos por el especialista e incluyen el análisis de la LD₅₀, análisis de la coagulación sanguínea mediante la determinación del tiempo de protrombina, por ejemplo, por medio del protocolo del coeficiente internacional normalizado (INR). El valor determinado para la toxicidad del derivado de cumarina candidato se compara entonces con un valor apropiado de toxicidad de la cumarina control determinado en base a someter un espécimen diferente de roedor resistente a la warfarina al mismo tratamiento pero cambiando la administración del derivado de cumarina por la administración de una composición estándar de cumarina para roedores a la que los roedores son resistentes, comúnmente utilizada para el control de plagas. Se utilizan para el control las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente para la administración del derivado de cumarina candidato.
40 Cuando el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato es igual o, en particular, significativamente más alto estadísticamente que el valor de toxicidad de la cumarina control, el derivado de cumarina candidato representa un derivado toxicológicamente eficaz de la cumarina.

45 La invención además se ilustra ahora a continuación con la ayuda de las figuras y ejemplos que representan las realizaciones y características preferentes de la invención.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Caracterización de la región genómica candidata

55 Se mapeado el locus para la deficiencia combinada del factor de coagulación dependiente de la vitamina K de tipo 2 (VKCFD2) con la región pericentromérica del cromosoma 16 entre los marcadores D16S3131 y D16S419 [Fregin y col., 2002]. Esta región comprende aproximadamente 20 Mb. Los genes responsables de la resistencia a la warfarina en ratas (Rw) y ratones (War) habían sido mapeados en el cromosoma 1 [Kohn y col., 1999] y el cromosoma 7 [Wallace, 1976; Greaves & Ayres, 1967] en estrecha conexión con el gen de cadena ligera 2 de miosina (Myl2). El ortólogo humano de Myl2, HUMMLC2B, se localiza en el cromosoma 16p11 dentro de la región candidata de VKCFD2 y
60 forma parte de un grupo de enlace de genes conservados. En base a esta sintenia y de consideraciones bioquímicas, se plantea la hipótesis de que VKCFD2 y la resistencia a la warfarina pueden deberse a mutaciones alélicas del mismo gen. Si es así, esto reduciría el intervalo crítico en humanos a una región de aproximadamente 4,5 Mb entre el gen receptor de interleucina 4 (IL4R) y el gen de cadena alfa M integrina (ITGAM) en el brazo corto del cromosoma 16 (Fig. 1).

65 De acuerdo con el montaje del genoma, esta región contiene 141 genes Ensembl con aproximadamente 1.000 exones. De entre estos genes, se anotaron como conocidos 117. Muchos de estos genes se pudieron excluir de otro análisis debido a que su función estaba bien establecida y obviamente no relacionada con las etapas metabólicas del

ciclo de la vitamina K. Por otra parte, se incluyen los genes aguas arriba y aguas abajo de esta región, los cuales se consideraban como candidatos funcionales en el estudio de la mutación.

5 Ejemplo 2

Estudio de la mutación

Utilizando ADN genómico procedente de dos sujetos con VKCFD2 y tres con WR, se inició un estudio sistemático de la mutación mediante secuenciación comparativa de los genes candidatos restantes. Se han descrito anteriormente los datos clínicos de las familias con VKCFD2 [Oldenburg y col., 2000]. Se determinaron los pacientes resistentes a la warfarina debido a su respuesta anormal a la administración oral de warfarina durante el tratamiento o la prevención contra la trombosis. Los pacientes C y E son casos esporádicos. El paciente D tiene dos hermanos que padecen también de resistencia a la warfarina. Los pacientes C y D necesitaron aproximadamente 150-250 mg de warfarina por semana para conseguir un rango terapéutico de anticoagulación oral, mientras que el paciente E no mostró ninguna respuesta. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado antes de su participación.

Sorprendentemente, se encontraron mutaciones de sentido erróneo en un gen de función desconocida en todos los sujetos con VKCFD2 y WR investigados (Fig. 2). Este gen (IMAGE3455200) abarca una región genómica de 5.126 pb y comprende tres exones que codifican para una proteína de 163 aminoácidos. Se denominó proteína 1 de reciclaje de vitamina K-epóxido (VKORC1). Se descubrió que ambos pacientes con VKCFD2 no relacionados y sus hermanos afectados albergaban la misma mutación de un punto homocigoto en el tercer exón (292 C>T) mientras que se descubrió que los padres eran heterocigotos. La mutación se debe a la sustitución de arginina por triptófano en el residuo 98 de los aminoácidos (R98W). Las familias son de origen alemán y libanés. Los haplotipos en la región de homocigotidad alrededor del gen mutado eran diferentes en ambas familias, indicando eventos independientes de mutación. En los pacientes con WR, se descubrieron tres mutaciones heterocigotas diferentes conduciendo a una sustitución de valina por leucina (paciente C: V29L), una sustitución de arginina por glicina (paciente D: R58G) y un intercambio de leucina por arginina (paciente E: L128R). La mutación R58G es compartida por los dos hermanos afectados del paciente con índice D. No existían mutaciones de sentido erróneo en los 384 cromosomas de control. La secuenciación de los cromosomas de control reveló dos polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos (C43C; L120L).

Se obtuvieron secuencias del genoma y su anotación de NCBI, UCSC y Ensembl. Se diseñaron cebadores para el estudio de la mutación por medio del software Primer3 integrado en una rutina, el ExonPrimer, para permitir el diseño automático del cebador. Para el estudio de la mutación, se amplificaron exones con cebadores intrónicos y se analizaron fragmentos amplificados mediante secuenciación directa con el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (ABI). Se podía disponer de las secuencias de cebadores mediante solicitud. Se realizaron predicciones de la topología por medio de TMPRED y TMHM.

40 Ejemplo 3

Homología y estructura proteica

Un ortólogo del gen VKORC1 estaba presente en los ratones (NM-178600) y los ortólogos en ratas y en *Fugu rubripes* se establecieron por medio de búsquedas de homología y RT-PCR (Fig. 3). Las proteínas correspondientes comparten del 79% al 84% de identidad con la proteína humana. Las búsquedas en la base de datos no mostraron homología con un gen conocido ni tampoco con ningún dominio proteico caracterizado. Los programas de predicción de la topología anticiparon tres dominios transmembrana (TM). El primer TM se sitúa entre los residuos 10 y 29 en todos los programas ensayados. Las predicciones son discordantes para el segundo y el tercer TM, que están localizados entre los aminoácidos 100 y 150. El servidor PSORTII predijo una señal de retención en la membrana del ER (KKXX o KKKXX) en la posición 159-163 del VKORC1 humano con una probabilidad del 67% [Jackson y col., 1990]. La secuencia de consenso estaba presente también en las demás proteínas de VKORC1. Esto coincide con el emplazamiento probable del complejo de VKORC1 dentro del sistema de membrana del RE [Cain y col., 1997].

Las búsquedas Tblastn con VKORC1 detectaron un gen homólogo humano (BC027734) y de ratón (AK009497) que mostraban cada uno un 50% de identidad de proteína. Ambos ARNm se predijeron erróneamente para codificar para proteínas que no muestran homología con VKORC1. La proteína humana predicha empieza en la tercera metionina. La secuencia de ARNm de ratón es incompleta con una proteína predicha en un marco de lectura diferente. Se estableció el ADNc completo en ratón así como en *Fugu rubripes* y parcialmente en rata. Estas proteínas se designaron proteína 1 de tipo VKORC1 (VKORC1L1). Las proteínas humana, de ratón y de rata VKORC1L1 comparten aproximadamente un 84% de identidad entre sí y aproximadamente un 50% de identidad con las proteínas de VKORC1 correspondientes. Se detectó además una proteína homóloga en *Xenopus laevis* (AAH43742) y, con una homología más débil (1e-14), en *Anopheles gambiae* (EAA06271). Tres análisis sugirieron que ambas de estas proteínas son ortólogas al gen VKORC1.

Ejemplo 4

Análisis de la expresión

5 Parece que VKORC1 se expresa ampliamente. La entrada correspondiente en UniGene contiene más de 100 ESTs en varios tejidos. La expresión de VKORC1 en tejidos humanos fetales y adultos se examina por análisis Northern blot. Con este fin, los Northern blots de múltiples tejidos humanos (Fetal Blot 1, Stratagene; Human 12-Lane, BD Clontech) contenían 2 µg de poli(A)+-ARN. Se radioetiquetó ADNc humano de longitud completa de VKORC1 utilizando el sistema de etiquetado de ADN con cebadores aleatorios (Invitrogen Life Technologies) y se hibridizó utilizando High-
10 Performance Hybridization Solution miracleHyb (Stratagene). Para la hibridación de control, se utilizó una sonda de β-actina suministrada con el Northern blot de múltiples tejidos.

Se pueden observar los niveles más altos de expresión de VKORC1 en hígado fetal y de adulto (Fig. 4). Se observaron también altos niveles de expresión en corazón, riñón y pulmón fetales, así como en corazón y páncreas adultos. El
15 cerebro fetal, placenta adulta y músculo esquelético mostraron niveles intermedios de expresión. Se detectaron niveles menores de expresión en cerebro, pulmón y riñón adultos.

Ejemplo 5

20 *Clonación de VKORC1 y construcción de los vectores de expresión*

La amplificación de la secuencia de codificación completa de VKORC1 se realizó a partir de ADNc de hígado y riñón humanos (Marathon-Ready cDNA, BD Biosciences Clontech) con los siguientes cebadores incluidos los sitios
25 de segmentación para HindIII y EcoRI:

VKORC1-HindIII-F: ATTAAGCTTCACCATGGGCAGCACCTGGGGGAGCCCT
30 (SEQ ID NO:53);

VKORC1-EcoRI-R: ATTGAATTCCGTGCCTCTTAGCCTTGCCCTG (SEQ ID
35 NO:54).

Se clonó el producto en el vector pBluescript II (Stratagene) que se segmentó con las enzimas de restricción correspondientes y se comprobó por secuenciación directa. Para los experimentos de inmunocitoquímica, se volvió a clonar el inserto en vectores de expresión de mamíferos pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech) y pcDNA3.1/myc-His
40 (Invitrogen).

Para los estudios de expresión, el ADNc de VKORC1 se clonó en el vector pcDNA3 (Invitrogen) después de la amplificación con los cebadores VKORC1-pcdna3-F: GGGCGGAAGCTTGAGATAATGGGCA (SEQ ID NO:92) y VKORC1-pcdna3-R: GCTTGAATTCAGGGCTCAGTGC (SEQ ID NO:93). Se realizó la mutagénesis por medio
45 del kit de mutagénesis QuikChange (Stratagene). Se volvieron a clonar los ADNc mutados y de tipo salvaje para la expresión en pCEP4 (Invitrogen) utilizando los sitios HindIII y XhoI. Se comprobaron todos los constructos por secuenciación.

Ejemplo 6

Cultivo celular, transfección transitoria e inmunocitoquímica y localización subcelular

A partir de experimentos de fraccionación bioquímica, se sabe que la actividad de VKORC1 se purifica con la
55 fracción microsómica de membrana [Cain y col., 1997]. Además, se ha localizado la gamma-glutamyl-carboxilasa en la membrana del retículo endoplásmico por inmunocitoquímica [Presnell, 2002#31]. Con el fin de estudiar la localización subcelular del VKORC1 humano, se generaron constructos de la proteína de fusión de VKORC1 etiquetada con el epítipo GFP y myc para experimentos de transfección transitoria de células COS-7. Se utilizaron anticuerpos primarios contra las etiquetas con epítipos y anticuerpos secundarios etiquetados con fluorocromo para visualizar
60 las proteínas de fusión. Un anticuerpo contra la proteína específica del RE, la calnexina, sirvió de control. Con este fin se mantuvieron células COS-7 (DSMZ, Braunschweig) en medio Eagle modificado por Dulbecco con un 10% de suero de ternera fetal. Se colocaron las células sobre placas recubiertas de vidrio en placas de seis pocillos y, después de 18-24 horas en cultivo, se transfectaron con los constructos del vector de expresión utilizando Effectene (QIAGEN) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Tras 48-60 horas más de cultivo, se lavaron las células
65 con PBS y se fijaron en un 70% de acetona/30% de metanol a -20°C durante 15 minutos. Después de la fijación, las células se permeabilizaron en PBS, un 0,1% de Nonidet P-40 (SIGMA N-6507), y luego se bloquearon con PBS, un 2% de BSA y un 0,1% de NP-40 a 37°C. Los anticuerpos primarios, Living Colors A.v. (JI-8) (BD Biosciences

Clontech), anticuerpo anti-myc (Invitrogen) y anti-calnexina (SIGMA) se diluyeron (1:100) en la solución bloqueante y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Las plaquitas recubiertas se lavaron en PBS, un 0,1% de NP-40 durante 30 minutos. Se utilizaron los mismos procedimientos de incubación y lavado para los anticuerpos secundarios, es decir, anti-ratón-IgG-FITC (SIGMA) y anti-conejo-IgG F(ab')₂ fragmento-Cy3 (SIGMA). Las placas recubiertas se contratiñeron con DAPI (1:500) durante 1 minuto, se lavaron con agua desionizada, se montaron en placas utilizando Vectashield (Vector) y se visualizaron por medio de un microscopio de fluorescencia Leica.

La inmunofluorescencia verde de las proteínas de fusión de VKORC1 decoraban las estructuras de tipo malla del RE dentro del citoplasma y se co-localizaron perfectamente con la etiqueta del marcador de RE, calnexina (rojo) (Fig. 5).

Ejemplo 7

15 Ensayo para determinar la actividad enzimática de VKORC1

Se cultivaron células HEK293-EBNA (Invitrogen) en MEM con un 10% de FCS. Para cada experimento, se colocaron en placas 6 x 10⁵ células en placas Petri de 94 mm. Después de 30 horas a 37°C y un 5% de CO₂, se realizó la transfección (20 µg de constructo de ADN por placa) utilizando el método de fosfato de calcio. Tras 40 horas a 35°C y un 3% de CO₂, se lavaron las células transfectadas (casi cultivadas hasta confluencia) en PBS, se cosecharon y se lisaron en 450 µl de imidazol 0,25 mM, (pH = 7,6), 0,5% de CHAPS. Se comprobó la eficacia de la transfección mediante secuenciación de los productos por RT-PCR de una parte alícuota de las células.

Se midió la actividad enzimática de VKOR con 30 µl de los extractos de células totales, que se resuspendieron en 500 µl de tampón A (0,25 mM imidazol, (pH = 7,6), 0,5% de CHAPS). Luego se añadieron 20 µl de DTT 125 mM con un minuto de incubación. Después se añadieron 5 µl de CaCl₂ 400 mM, y warfarina en 10 µl de DMSO (concentración final de 0-80 µM). La reacción empezó por la adición de 2 µl de vitamina K-2,3-epóxido (concentración final de 5 µM) y se incubó a 30°C durante una hora. Se interrumpió la reacción con la extracción del sustrato (vitamina K-2,3-epóxido) y de los productos de reacción (vitamina K-quinona e hidroquinona) utilizando 1 ml de 2-propanol/hexano (3:2, volumen/volumen); se recogió el sobrenadante orgánico, se secó y se redujo en 50 µl de metanol y se analizó con una HPLC a 254 nm. La vitamina K-quinona se separó del epóxido por HPLC en columna C18 de fase inversa. Durante el procedimiento de extracción, la vitamina K-hidroquinona se oxidó cuantitativamente en forma de quinona. La producción de la HPLC se analizó automáticamente mediante el cálculo de la zona por debajo de la línea de extinción de cada pico. El porcentaje de conversión del sustrato se evaluó fijando la zona del pico de sustrato residual (epóxido) más el pico de producto (quinona) como 100 por ciento. Las mediciones se realizaron por duplicado y la actividad se da como porcentaje de sustrato convertido en quinona. Se preparó vitamina K-2,3-epóxido mediante oxidación de la vitamina K-quinona (Sigma-Aldrich) con H₂O₂. Se añadió warfarina (Sigma-Aldrich) en DMSO (< 1% en volumen).

La dosis-respuesta a la inhibición de la warfarina se midió a 5 hasta 80 µM de concentración final (Walin & Martin, 1985). Las células no transfectadas y mock-transfectadas mostraron baja actividad basal, lo cual demostraba la sensibilidad a la warfarina. La sobreexpresión de VKORC1 de tipo salvaje resultó en un estímulo de choque de la actividad de VKOR. La producción de vitamina K-quinona aumentó en 14 a 21 veces en comparación con las células no tratadas y mock-transfectadas. La actividad fue inhibida por la warfarina de forma dosis-dependiente (Figura 10).

Se determinó también la actividad de VKOR después de la transfección con constructos de VKORC1 mutado (Figura 10). La expresión recombinante de la mutación R98W observada en las dos familias de VKCFD2 aumentó sólo ligeramente la actividad de VKOR en las células HEK293. Los episodios espontáneos de sangrado y los altos niveles en suero de vitamina K-epóxido en estos pacientes sugieren que la eficacia del reciclaje de vitamina K se reduce drásticamente también *in vivo* (Oldenburg y col., 2000). Las cinco mutaciones de WR mostraron una actividad reducida de VKOR que oscilaba entre el 5% en la variante L128R y el 96% en la mutación V29L. Las mutaciones V45A, R58G e Y139C mostraron aproximadamente un 23%, 21% y 48% de actividad respectivamente (Tabla 1). La actividad reducida de VKOR asociada con la demanda más alta en vitamina K, así como la muerte por sangrado espontáneo se observó en ratas Rw heterocigotas y homocigotas (Martin y col., 1979, Thijssen & Pelz 2001, Fasco y col., 1983b). De forma similar, en nuestro sistema de expresión que imita condiciones homocigotas, las mutaciones de WR condujeron a una eficacia funcional más baja del complejo de VKOR. Mientras a nivel fenotípico todas las variantes de WR mostraron al menos una resistencia parcial hacia el efecto de anticoagulación de la warfarina, ambas proteínas de tipo salvaje y mutantes fueron sensibles a la warfarina *in vitro*. A concentraciones por encima de 20 µM, las mutaciones V29L e Y139C conservaron actividades de VKOR más altas que el tipo salvaje, mientras que en las mutaciones V45A, R58G, L128R, la actividad de VKOR cayó por debajo del límite de detección (Figura 10).

Ejemplo 8

65 Método para diagnosticar una anomalía de secuencia de VKORC1

Se aísla el ADN genómico del espécimen (paciente humano o mamífero) según los procedimientos estándar bien conocidos por el especialista. El ADN genómico del exón deseado (1-3) de VKORC1 se amplifica por PCR utilizando

ES 2 344 413 T3

cebadores específicos que puede diseñar también el especialista. El producto de PCR se purifica entonces por medio, por ejemplo, de SAP/Exo (fosfatasa alcalina del camarón y exonucleasa) en condiciones estándar. El ADN purificado se somete entonces a procedimientos de secuenciación estándar tales como: adición de 0,3 μ l de un cebador que es 10 pmol/ μ l (cebador hacia adelante o inverso) a 1 μ l del producto purificado por PCR; seguido de la adición de 8 μ l de DTCS-Mix (Beckman-Coulter) y 10,7 μ l de agua, seguido de secuenciación del ciclo a

Primera fase	96°C	60 segundos
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Alineamiento	Cebadores específicos (55-60°C)	30 segundos
Alargamiento	60°C	4 minutos

Después de la secuenciación del ciclo, sigue la purificación por precipitación:

- añadir 2 μ l de EDTA 100 Mm, 2 μ l de NaOAc 5M (pH 4,8), 1 μ l de Glycogen, agitar,
- añadir 60 μ l de etanol al 95%, agitar,
- centrifugación a 13.000 g (10 min),
- eliminar el sobrenadante,
- lavar los gránulos con 180 μ l de etanol al 70%
- secar los gránulos,
- reducir los gránulos en 35 μ l de Solución de Carga de Muestra (SLS).

Después, las sondas se pipeteen en una placa de microvaloración recubierta de una gota de aceite de parafina. Luego, sigue la separación en el secuenciador a 4,2 V durante 60-120 minutos. Se analizan los datos en bruto y las secuencias se alinean con las secuencias de control utilizando el software CEQ 2000 XL (Versión 4.3.9, Beckman Coulter). Las diferencias entre las secuencias de control (preferentemente la secuencia de ácido nucleico genómico de VKORC1 o su secuencia de codificación según la SEQ ID NO:2) y el ADN secuenciado indican que la secuencia de las sondas representa un ácido nucleico de VKORC1 que contiene una anomalía de secuencia.

Ejemplo 9

Ensayo basado en PCR para determinar la resistencia a la warfarina en ratas

Para determinar si una rata (*Rattus norvegicus*) es o no es resistente a la warfarina, es decir si la secuencia de codificación de VKORC1 de acuerdo con la SEQ ID NO:13 porta una mutación Y139C (416A>G), se empleó el siguiente ensayo basado en ARMS-PCR utilizando heces de rata como fuente de ADN genómico de rata.

El principio del ensayo consiste en incluir en la reacción PCR (1) un cebador para PCR (rVKORC1-innerF) que se hibridiza específicamente a la secuencia de ADN que contiene el alelo mutado 416G resistente a la warfarina y (2) otro cebador para PCR (rVKORC1-innerR) que se hibridiza específicamente a la secuencia de ADN de tipo salvaje que contiene el alelo de tipo salvaje 416A. Además, estos dos cebadores están orientados en dirección opuesta, de modo que se emparejan con uno de dos cebadores adicionales para PCR incluidos en la reacción. Estos últimos cebadores están localizados a distintas distancias en dirección a y en dirección opuesta a con respecto al sitio 416 y, como consecuencia, dependiendo de si el sitio 416 está mutado o no, el cebador rVKORC1-innerR o el cebador rVKORC1-innerF se alineará y la reacción PCR resultará en ADN amplificado de un tamaño diferente, lo que indica el genotipo de la rata cuyo ADN ha sido analizado. En ratas de tipo salvaje, la reacción PCR resultará en una banda de 123 pb, mientras que en ratas homocigotas a la mutación 416G, la reacción PCR producirá una banda a 101 pb. Finalmente, en ratas con un genotipo heterocigota, la reacción PCR dará lugar a dos bandas, una banda a 101 y la otra a 123 pb.

El ADN genómico se aisló de las heces utilizando procedimientos estándar de aislamiento de ADN generalmente conocidos por el especialista. Se combinaron los siguientes componentes en una reacción PCR: 1 μ l de ADN (rata), 1 μ l de Betaína 5M (Sigma), 2 pmol de Cebador-outerF (1 μ l de una dilución al 1:50), 2 pmol de Cebador-outerR (1 μ l de una dilución al 1:50), 10 pmol de Cebador-innerF (1 μ l de una dilución al 1:10), 10 pmol de Cebador-innerR (1 μ l de una dilución al 1:10), 0,25 μ l de Taq/Pfu-Polimerasa (1,25 U Taq (Invitrogen) y 0,25 U Pfu (Stratagene)), añadir 25 μ l de tampón de PCR (1 ml de tampón de PCR contiene: 100 μ l de 10 x tampón de PCR (Invitrogen), 160 μ l de solución madre de nucleótidos (1,25 mM de dNTPs), 30 μ l de MgCl₂, 610 μ l de agua destilada). Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 3 min, seguido de 32 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 62°C durante 20 segundos,

ES 2 344 413 T3

y 70°C durante 10 segundos. Finalmente, la reacción se incubó a 70°C durante 3 minutos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel en un 3,5% de TAE-Agarosa-Gel con bromuro de etidio (10 µl de una solución madre al 1% para cada 100 ml). La electroforesis en gel se mantuvo durante 30 minutos a 130 V.

Se utilizaron los siguientes cebadores:

- rVKORC1-outerF: ATC CTG AGT TCC CTG GTG TCT GTC GCT G (SEQ ID NO:88),
- rVKORC1-outerR: TCA GGG CTT TTT GAC CTT GTG TTC TGG C (SEQ ID NO:89),
- cebador "rVKORC1-innerF" para PCR específico del alelo mutante 416G: TGA TTT CTG CAT TGT TTG CAT CAC CAC ATG (SEQ ID NO:90),
- cebador "rVKORC1-innerR" para PCR específico del alelo de tipo salvaje 416A: CAA CAT CAG GCC CGC ATT GAT GGA AT (SEQ ID NO:91).

Para este ensayo se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) con y sin resistencia a la warfarina. Los resultados de la PCR se muestran en la Figura 13. Las ratas de tipo salvaje mostraban una banda a 123 pb, las ratas homocigotas a la mutación mostraban una banda a 101 pb y, finalmente, las ratas con la mutación heterocigota mostraban dos bandas, una banda a 101 y la otra a 123 pb.

Consecuentemente, estos datos demuestran que este ensayo se puede emplear para determinar si determinada rata es o no es resistente a la warfarina. Estos ensayos son muy versátiles con el fin de manejar el control de plagas en determinada región, ya que el conocimiento de la frecuencia de ratas resistentes a la warfarina es crítica para decidir qué pesticida puede ser empleado eficazmente. Si en determinada región predominan en gran medida las ratas resistentes a la warfarina, la warfarina y análogos de la misma resultan ser un medio inadecuado para matar las ratas. Sin embargo, si la frecuencia determinada de ratas resistentes a la warfarina es baja, se puede utilizar eficazmente la warfarina para combatir los roedores.

Lista de referencias

Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402

Bandyopadhyay, P. K., Garrett, J. E., Shetty, R. P., Keate, T., Walker, C. S., and Olivera, B. M. (2002). gamma-Glutamyl carboxylation: An extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods, and chordates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1264-1269.

Boneh, A., and Bar-Ziv, J. (1996). Hereditary deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors with skeletal abnormalities, *Am J Med Genet* 65, 241-243.

Brenner, B., Sanchez-Vega, B., Wu, S. M., Lanir, N., Stafford, D. W., and Solera, J. (1998). A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors, *Blood* 92, 4554-4559.

Cain, D., Hutson, S. M., and Wallin, R. (1997). Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane, *J Biol Chem* 272, 29068-29075.

Chen, CA and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.

Dockal, M., Carter, D. C., and Ruker, F. (1999). The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties, *J Biol Chem* 274, 29303-29310.

Dockal, M., Chang, M., Carter, D. C., and Ruker, F. (2000). Five recombinant fragments of human serum albumin-tools for the characterization of the warfarin binding site, *Protein Sci* 9, 1455-1465.

Doetschman, Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, page 115 to 146 in Pinkert, 1994.

Ekelund, H., Lindeberg, L., and Wranne, L. (1986). Combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX, and X: a case of probable congenital origin, *Pediatr Hematol Oncol* 3, 187-193.

Esmon, C. T., Suttie, J. W., and Jackson, C. M. (1975). The functional significance of vitamin K action. Difference in phospholipid binding between normal and abnormal prothrombin, *J Biol Chem* 250, 4095-4099.

Fasco, M. J., Principe, L. M., Walsh, W. A., and Friedman, P. A. (1983). Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes, *Biochemistry* 22, 5655-5660.

Fasco, M. J., Preusch, P. C., Hildebrandt, E. & Suttie, J. W. (1983b). Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 258, 4372-4380

Fischer, M., and E., Z. (1966). Kongenitaler Mangel der Faktoren II, VIII und X, *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 95, 309-323.

Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Krebsova, A., Muller, C. R., and Oldenburg, J. (2002). Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16, *Blood* 100, 3229-3232.

Furie, B., and Furie, B. C. (1988). The molecular basis of blood coagulation, *Cell* 53, 505-518.

Goldsmith, G. H., Jr., Pence, R. E., Ratnoff, O. D., Adelstein, D. J., and Furie, B. (1982). Studies on a family with combined functional deficiencies of vitamin K-dependent coagulation factors, *J Clin Invest* 69, 1253-1260.

Gossen M. et al. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 516-20

Greaves, J. H., and Ayres, P. (1967). Heritable resistance to warfarin in rats, *Nature* 215, 877-878.

Guenthner, T. M., Cai, D., and Wallin, R. (1998). Co-purification of microsomal epoxide hydrolase with the warfarin-sensitive vitamin K1 oxide reductase of the vitamin K cycle, *Biochem Pharmacol* 55, 169-175.

Harlow & Lane, 1998, Using Antibodies: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Press*, New York, USA, Chapter 5, pp. 53-135

Jackson, M. R., Nilsson, T., and Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensue motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum, *Embo J* 9, 3153-3162.

Jackson, W. B., Ashton, A. D., and Delventhal, K. (1988). Overview of anticoagulant rodenticide usage and resistance. In Current advances in vitamin K research, J. W. Suttie, ed. (New York, *Elsevier*), pp. 381-397.

Johnson, C. A., Chung, K. S., McGrath, K. M., Bean, P. E., and Roberts, H. R. (1980). Characterization of a variant prothrombin in a patient congenitally deficient in factors II, VII, IX and X, *Br J Haematol* 44,461-469.

Kohn, M. H., and Pelz, H. J. (1999). Genomic assignment of the warfarin resistance locus, Rw, in the rat, *Mamm Genome* 10, 696-698.

Kozak, 1987, *Nucleic. Acids Res.* 15: 8125-48

Lee et al. (1981) *Nature* 214, 228-232

Leonard, C. O. (1988). Vitamin K responsive bleeding disorder: a genocopy of the warfarin embryopathy, *Proceedings of the Greenwood Genetic Center* 7, 165-166.

Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., and Schneider, C. (1993). The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade, *Mol Cell Biol* 13, 4976-4985.

Martin, A. D., Steed, L. C., Redfern, R., Gill, J. E. & Huson, L. W. Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Laboratory Animals*, 209-214 (1979).

McManus et al. 2002, *Nature Reviews* 3: 737-747, Gene Silencing in Mammals by small interfering RNAs

McMillan, C. W., and Roberts, H. R. (1966). Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. Report of a case, *N Engl J Med* 274, 1313-1315.

- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. M., and Fournier, D. (1994).** Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5922-5926.
- Monastersky, Gene Transfer Technology; Alternative Techniques and Applications,** page 177 to 220 in Pinkert, 1994, *supra*
- Mumberg et al. (1994)** *Nucl. Acids Res.*, 22, 5767-5768
- Nellen and Lichtenstein, 1993,** *Trends Biochem. Sci.* 18: 419-23; **Stein, 1992,** *Leukemia* 6: 967-74
- Oldenburg, J., von Brederlow, B., Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Eberl, W., Eber, S., Lenz, E., Schwaab, R., Brackmann, H. H., et al. (2000).** Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex, *Thromb Haemost* 84, 937-941.
- O'Reilly, R. A. (1970).** The second reported kindred with hereditary resistance to oral anticoagulant drugs, *N Engl J Med* 282, 1448-1451.
- O'Reilly, R. A., Aggeler, P. M., Silvija Hoag, M., Leong, L. S., and Kropatkin, M. L. (1964).** Hereditary transmission of exceptional resistance to coumarin anticoagulant drugs: the first reported kindred, *N Engl J Med* 271, 809-815.
- Pauli, R. M., Lian, J. B., Mosher, D. F., and Suttie, J. W. (1987).** Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin embryopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives, *Am J Hum Genet* 41, 566-583.
- Pechlaner, C., Vogel, W., Erhart, R., Pumpel, E., and Kunz, F. (1992).** A new case of combined deficiency of vitamin K dependent coagulation factors, *Thromb Haemost* 68, 617.
- Petersen, C. E., Ha, C. E., Curry, S., and Bhagavan, N. V. (2002).** Probing the structure of the warfarin-binding site on human serum albumin using site-directed mutagenesis, *Proteins* 47, 116-125.
- Prentice, C. R. (1985).** Acquired coagulation disorders, *Clin Haematol* 14, 413-442.
- Presnell, S. R., and Stafford, D. W. (2002).** The vitamin K-dependent carboxylase, *Thromb Haemost* 87, 937-946.
- Polites and Pinkert,** DNA Microinjection and Transgenic Animal Production, page 15 to 68 in Pinkert, 1994, Transgenic animal technology: a laboratory handbook, *Academic Press*, London, UK
- Price, P. A. (1988).** Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism, *Annu Rev Nutr* 8, 565-583.
- Russel et al. (1983),** *J. Biol. Chem.* 258, 2674-2682
- Sperling, R., Furie, B. C., Blumenstein, M., Keyt, B., and Furie, B. (1978).** Metal binding properties of gamma-carboxyglutamic acid. Implications for the vitamin K-dependent blood coagulation proteins, *J Biol Chem* 253, 3898-3906.
- Spronk, H. M., Farah, R. A., Buchanan, G. R., Vermeer, C., and Soute, B. A. (2000).** Novel mutation in the gamma-glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors, *Blood* 96, 3650-3652.
- Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., and et al. (1995).** The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases, *Cell* 80, 661-670.
- Suttie, J. W. (1987).** The biochemical basis of warfarin therapy, *Adv Exp Med Biol* 214, 3-16.
- Thijssen, H. H. & Pelz, H. J.** in *Advances in vertebrate pest management* (eds. Pelz, H. J., Cowan, D. P. & Feare, C. J.) 181-192 (Filander-Verlag, Fürth, 2001).
- Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990)** *Chemical Reviews*, 90, 543-584, No. 4
- Vicente, V., Maia, R., Alberca, I., Tamagnini, G. P., and López Borrascas, A. (1984).** Congenital deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors and protein C, *Thromb Haemost* 51, 343-346.
- Wallace, M. E., and MacSwiney, F. J. (1976).** A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse, *J Hyg (Lond)* 76, 173-181.

ES 2 344 413 T3

Wallin, R., and Martin, L. F. (1985). Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin, *J Clin Invest* 76, 1879-1884.

Winter and Milstein, 1991, *Nature* 349:293-299

Wood, *Retrovirus-Mediated Gene Transfer*, page 147 to 176 in Pinkert, 1994, *supra*

Zheng and Kemeny, 1995, *Clin. Exp. Immunol.* 100: 380-2.

REIVINDICACIONES

5 1. Método para identificar un derivado de cumarina que ejerce un efecto sobre la actividad de un polipéptido de VKORC1 (subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa) que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

- a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:1, 12 y 17;
- 10 b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
- c) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), donde la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y
- 15 d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) que tiene la actividad de VKORC1,

que incluye las etapas de:

- 20 I. proporcionar una célula huésped donde se introducido el ácido nucleico de VKORC1 o un vector que contiene el ácido nucleico de VKORC1;
- II. expresar el polipéptido de VKORC1 en la célula huésped;
- 25 III. administrar un derivado de cumarina candidato;
- IV. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de actividad del candidato);
- 30 V. comparar el valor de la actividad del candidato con un valor de actividad de control; e
- VI. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado de la cumarina que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido de VKORC1, siempre que el valor de actividad del candidato sea significativamente diferente del valor de actividad control.

35 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el valor de actividad de control se determina por medio de un método que comprende las etapas de:

- A. proporcionar una célula huésped de acuerdo con la etapa (I);
- 40 B. expresar el polipéptido de VKORC1 en la célula huésped; y
- C. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de la actividad de control).

45 3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la actividad determinada del polipéptido de VKORC1 es la conversión dependiente de ditiotreitól de vitamina K-2,3-epóxido en vitamina K-quinona y **caracterizado** porque el valor de actividad significativamente diferente es un valor de actividad del candidato que es significativamente más alto que el valor de actividad de control.

50 4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se introduce al menos un compuesto adicional en la célula huésped, compuesto que se selecciona de entre el grupo consistente en vitamina K, citocromo B5, y un ácido nucleico que codifica para la gamma-glutamyl-carboxilasa, para la epoxidehidrolasa microsomal, para la calumenina o para la glutatión-S-transferasa.

55 5. Método de determinación de la secuencia polipeptídica de VKORC1 que transfiere un efecto de cumarina ejercido sobre la actividad de VKORC1, el cual comprende las etapas de:

- I. proporcionar una célula que expresa un polipéptido de VKORC1 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:
- 60 a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO:1, 12 y 17;
- b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);
- 65 c) una secuencia polipeptídica con al menos un 80% de identidad con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), donde la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y

- d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) con la actividad de VKORC1, polipéptido de VKORC1 que tiene al menos una anomalía de secuencia;

II. administrar la cumarina o un derivado de la misma a la célula;

III. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de actividad de la anomalía de secuencia); y

IV. comparar el valor de actividad de la anomalía de secuencia con el valor de actividad de la secuencia de control,

donde una desviación significativa del valor de actividad de la anomalía de secuencia con respecto al valor de actividad de la secuencia de control indica que la anomalía de secuencia del polipéptido de VKORC1 transmite el efecto de la cumarina ejercido sobre el polipéptido de VKORC1.

6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se determina el valor de actividad de la secuencia de control por medio de un método que comprende las etapas de:

I. proporcionar una célula que expresa un polipéptido de VKORC1, la cual comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO:1, 12 y 17;

b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);

c) una secuencia polipeptídica con al menos un 80% de identidad con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), donde la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y

d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) con la actividad de VKORC1,

II. administrar la cumarina o un derivado de la misma a la célula;

III. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de la actividad de la secuencia de control).

7. Método de determinación según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la actividad determinada es la conversión dependiente de ditiotreitol de vitamina K-2,3-epóxido en vitamina K-quinona y **caracterizado** porque el valor significativamente diferente es un valor de actividad de la anomalía de secuencia que es significativamente más alto que el valor de la actividad de la secuencia de control.

8. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se introduce al menos un compuesto adicional en la célula, compuesto que se selecciona de entre el grupo consistente en la vitamina K, citocromo B5, y un ácido nucleico que codifica para la gamma-glutamyl-carboxilasa, para la epoxidehidrolasa microsomal, para la calumenina, o para la glutatión-S-transferasa.

9. Polipéptido de VKORC1, **caracterizado** porque el polipéptido de VKORC1 contiene al menos una anomalía de secuencia que ejerce un efecto sobre la actividad del polipéptido de VKORC1 y **caracterizado** porque el polipéptido de VKORC1 es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 ó 12, y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C.

10. Método para diagnosticar en un paciente una resistencia a la warfarina o una deficiencia múltiple del factor de coagulación de tipo 2 (VKCFD2), el cual comprende las etapas de:

I. amplificar una muestra de ADN obtenida del paciente o la transcripción inversa de una muestra de ARN obtenida del paciente en un ADN y amplificar el ADN; y

II. analizar el ADN amplificado de la etapa (I) para determinar al menos una anomalía de secuencia en una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de VKORC1 o en una secuencia de aminoácido de un polipéptido de VKORC1;

donde la anomalía determinada de la secuencia indica que el paciente sufre de una deficiencia asociada con VKORC1, preferentemente resistencia a la warfarina.

11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el ADN amplificado codifica al menos una secuencia parcial del polipéptido de VKORC1 de acuerdo con la SEQ ID NO:1 y **caracterizado** porque la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L, V45A, R58G, R98W, L128R e Y139C.

12. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque se analiza el ADN amplificado por medio de una técnica seleccionada de entre el grupo consistente en análisis basado en PCR, análisis de digestión de restricción y análisis de secuenciación de ADN.

13. Método para diagnosticar en un paciente la resistencia a warfarina o la deficiencia múltiple del factor de coagulación de tipo 2 (VKCFD2), que comprende las etapas de:

I. proporcionar una muestra obtenida del paciente; y

II. detectar en la muestra un polipéptido de VKORC1 con una anomalía de secuencia utilizando un anticuerpo o un fragmento del mismo, el cual reconoce específicamente y se une al polipéptido de VKORC1 según la reivindicación 9,

donde la anomalía de secuencia determinada indica que el paciente padece una deficiencia asociada con VKORC1.

14. Método según la reivindicación 13, **caracterizado** porque se analiza la muestra por medio de una técnica seleccionada de entre el grupo consistente en detección inmunohistoquímica, inmunoblotting, preferentemente Western blotting, y ELISA.

15. Método de identificación de un derivado de cumarina que ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad de un polipéptido de VKORC1 con al menos una anomalía de secuencia, el cual comprende las etapas de:

I. proporcionar una célula que expresa un polipéptido de VKORC1 según la reivindicación 9, preferentemente un polipéptido codificado por una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7, 14 y 94;

II. administrar un derivado de cumarina candidato a la célula;

III. determinar la actividad del polipéptido de VKORC1 (valor de la actividad de la anomalía de secuencia);

IV. comparar el valor de actividad de la anomalía de secuencia con el valor de la actividad de la secuencia de control,

V. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado de cumarina que ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad de un polipéptido de VKORC1 cuando la administración del derivado de cumarina candidato resulta en un valor de la actividad de la anomalía de secuencia que es significativamente más bajo que el valor de la actividad de la secuencia de control.

16. Método de identificación de un derivado de cumarina que es toxicológicamente eficaz contra roedores resistentes a la warfarina, el cual comprende las etapas de:

I. proporcionar un roedor resistente a la warfarina;

II. administrar un derivado de cumarina candidato al roedor;

III. determinar la toxicidad del derivado de cumarina candidato en el roedor (valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato);

IV. comparar el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato con un valor de toxicidad de la cumarina de control;

V. identificar el derivado de cumarina candidato como derivado toxicológicamente eficaz de la cumarina siempre que el valor de toxicidad del derivado de cumarina candidato sea significativamente más alto que el valor de toxicidad de la cumarina de control,

donde el roedor resistente a la warfarina es un roedor transgénico para un polipéptido de VKORC1 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en:

a) una secuencia polipeptídica seleccionada de entre el grupo consistente en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO:1, 12 y 17;

b) una secuencia polipeptídica de un alelo de la secuencia polipeptídica definida en (a);

c) una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia polipeptídica definida en (a) o (b), donde la secuencia polipeptídica tiene la actividad de VKORC1; y

d) una secuencia polipeptídica de un fragmento de la secuencia polipeptídica definida en (a), (b) o (c) que tiene la actividad de VKORC1,

ES 2 344 413 T3

donde el polipéptido de VKORC1 contiene al menos una anomalía de secuencia que provoca la resistencia a la warfarina, preferentemente un polipéptido codificado por la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:14.

5 17. Método según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el polipéptido de VKORC1 es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:12 y la anomalía de secuencia se selecciona de entre el grupo consistente en V29L (85 G>T), V45A (134 T>C), R58G (172 A>G), R98W (292 C>T), y L128R (383 T>G) e Y139C (416 A>G).

10 18. Utilización de los cebadores para PCR de acuerdo con las SEQ ID NO:88 a 91 para determinar si una rata tiene o no un genotipo de resistencia a la warfarina en una muestra obtenida de una rata.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

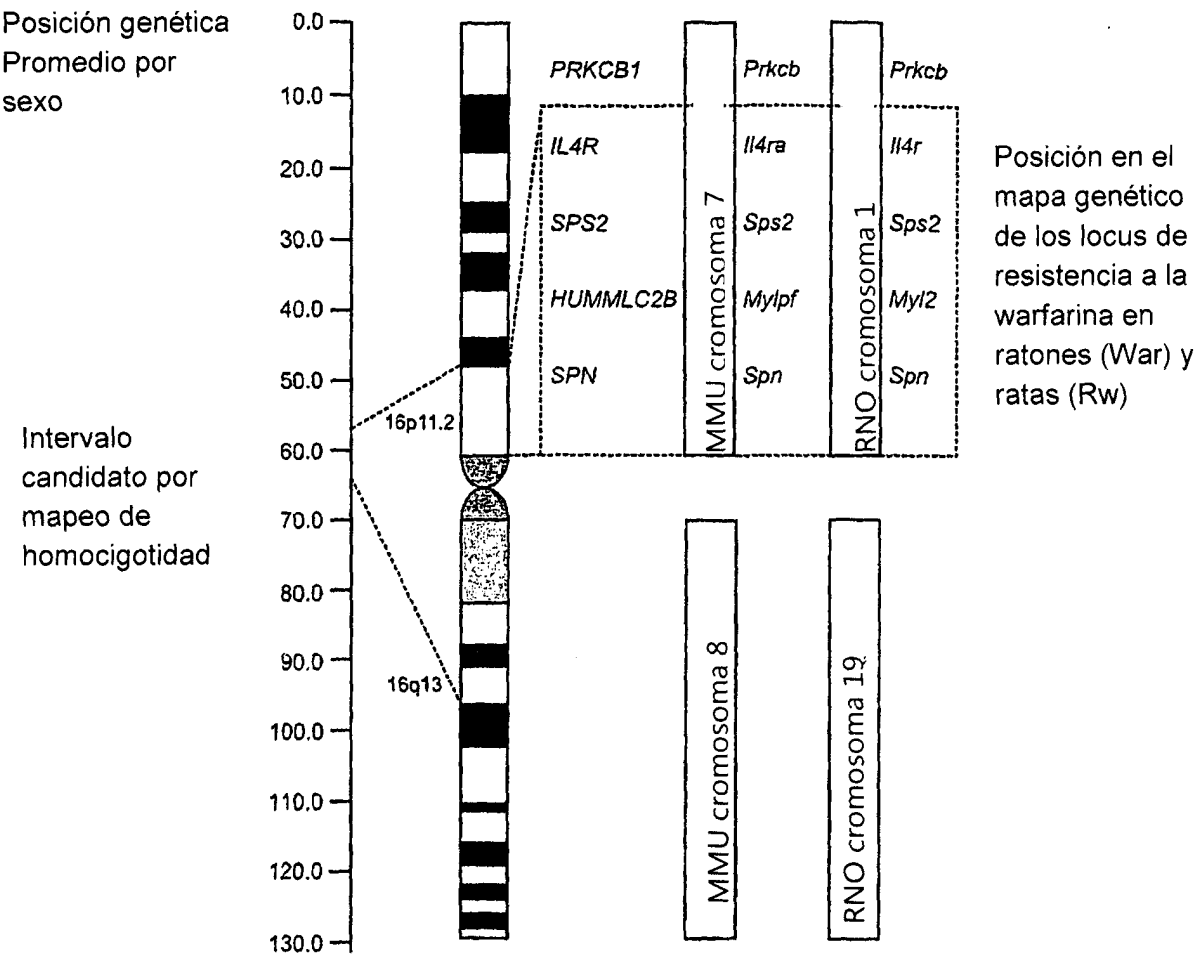


FIGURA 2

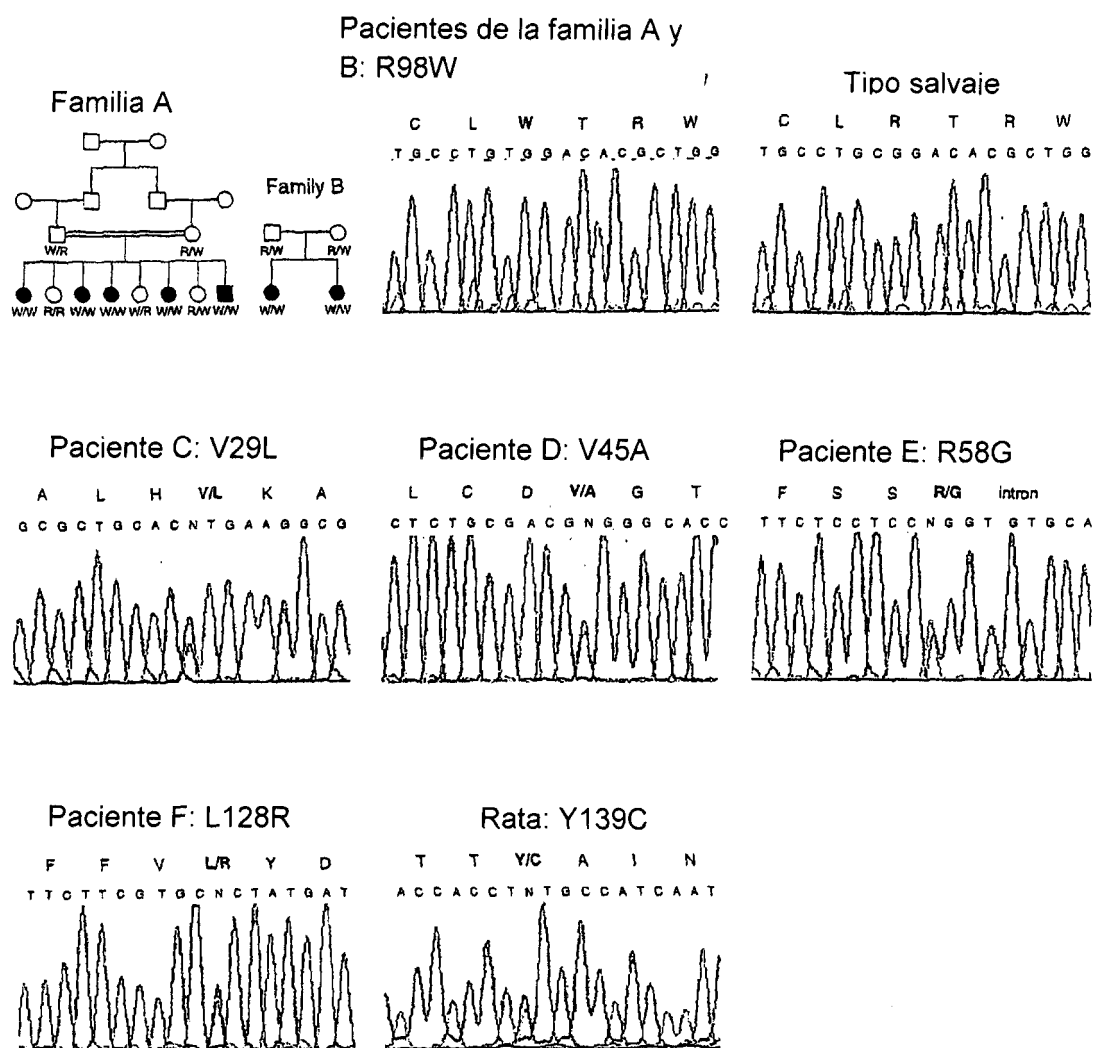


FIGURA 3

```
PRETTYBOX of: all.msf{*} April 7, 2003 18:53:55.47
```

mVKORC1	~ ~ ~ ~ ~	MG T	TWRSPGGLVRL	ALCLAGLALS	LYALHVKAAR	ARDENYRALC	DVGTAISCSR	53
rVKORC1	~ ~ ~ ~ ~	MGT	TWRSPGRLRL	ALCLAGLALS	LYALHVKAAR	ARNEDYRALC	DVGTAISCSR	53
hVKORC1	~ ~ ~ ~ ~	MGS	TWSPGWVRL	AVCLAGLALS	LYALHVKAAR	ARNEDYRALC	DVGTAISCSR	53
hVKORC1L1	MAAPVULRV	MG S	VPRWERVARY	AVCAAAGL	LYALHVKAAR	ERDPHERALC	DVGTAISCSR	60
mVKORC1L1	MAAPVULRV	MG S	VPRWERVARY	AVCAAAGL	LYALHVKAAR	ERDPHERALC	DVGTAISCSR	60
fvVKORC1L1	MAAPVULRV	MG S	VPRWERVARY	AVCAAAGL	LYALHVKAAR	ERDPHERALC	DVGTAISCSR	59
xVKORC1	~ ~ ~ ~ ~	MA	VPTWERTVRL	LCLVGGIAL	LYAFHVETSR	ERDPSSYKALC	DVGTAISCSR	52
fvVKORC1	~ ~ ~ ~ ~	MA	VPTWERTVRL	LCLVGGIAL	LYAFHVETSR	ERDPSSYKALC	DVGTAISCSR	52
avVKORC1	~ ~ ~ ~ ~	MSILAGN	CKCTYTLALV	GLSVCGFLL	LYTSYVVELRA	ERDPDYRAMC	DVGTAISCSR	57
mVKORC1	VFSSRWGRGF	GF	GLVEHMLGAD	SVLNQSN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	113
rVKORC1	VFSSRWGRGF	GF	GLVEHMLGAD	SVLNQSN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	113
hVKORC1	VFSSRWGRGF	GF	GLVEHMLGAD	SVLNQSN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	113
hVKORC1L1	ALASRWGRGF	GF	GLLGSIFGKD	GVLNQPN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	120
mVKORC1L1	ALASRWGRGF	GF	GLLGSIFGKD	GVLNQPN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	120
fvVKORC1L1	VFSSRWGRGF	GF	GLLGSIFGKD	GVLNQPN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	119
xVKORC1	VFSSRWGRGF	GF	GLVQFVLGQQ	SALNQPN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	112
fvVKORC1	VFSSRWGRGF	GF	GLVQFVLGQQ	SALNQPN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	112
avVKORC1	VFSSRWGRGF	GF	GLVQFVLGQQ	SALNQPN	GLFFYTLQLL	LGCLRGRAWAS	ILLVLLSSLV	117
mVKORC1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~161
rVKORC1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~161
hVKORC1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~163
hVKORC1L1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~176
mVKORC1L1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~176
fvVKORC1L1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~175
xVKORC1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~169
fvVKORC1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~163
avVKORC1	VAGSYYLAWI	I	LVFVLYDFCI	VCLTYYA	GLMLLSFQKV	PEHKTKKH	~ ~ ~	~176

FIGURA 4

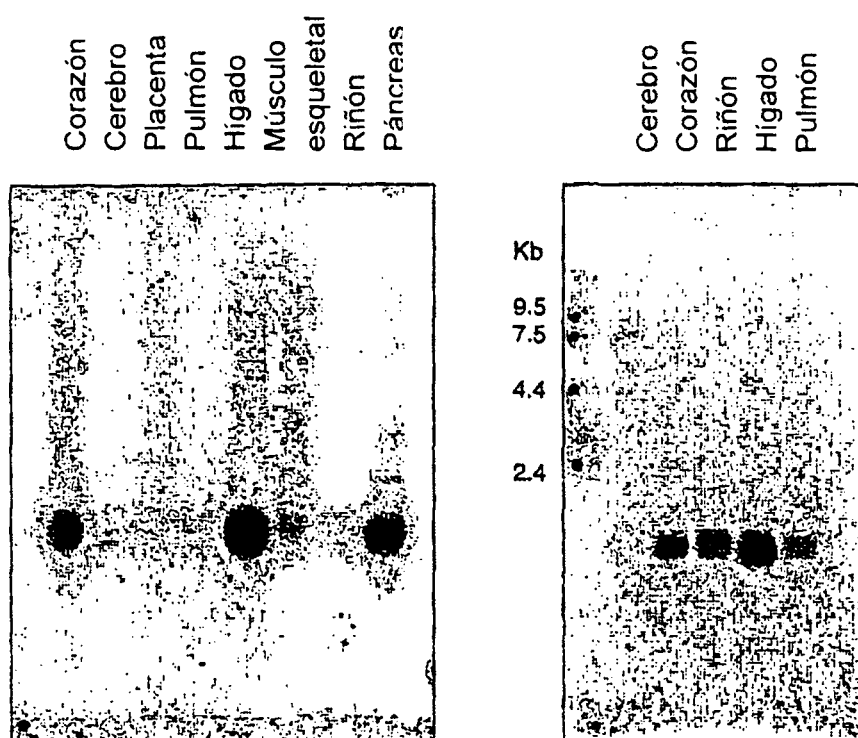


FIGURA 5

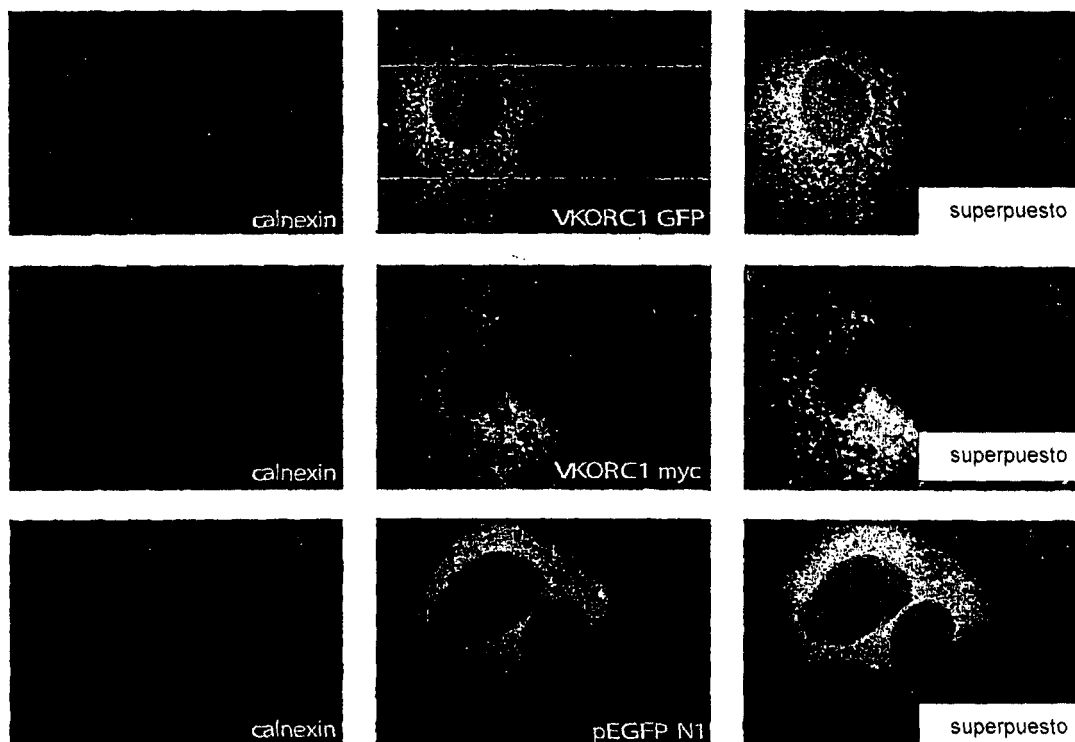


FIGURA 6

Secuencias de ARNsi para VKORC1 de Homo sapiens y cebadores para expresarlas utilizando por ejemplo el Sistema de Interferencia por ARN en Cassette siLentGene™ U6			
	Secuencia Terminador (subrayado)	Secuencia diana (en negrita)	Coincidencia cassette U6 (cursiva)
Secuencia de ARNsi	Generan versiones codificadas del ARNsi para su uso como controles	Posición introducida en la secuencia	% GC
GGUUGCAUCUUCUACACACUU (SEQ ID NO:29) 19 bases UCCAACGUAGAAGAUGUGUG (SEQ ID NO:30)		249-268	47% GC
Cebador A aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA <u>GGTTGCATCTTCTACACAC</u> GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO:31) Cebador B aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA <u>GTGTGTAGAAGATGCAACC</u> GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO:32)			
GUCUCUCGCGUGGUUCUGUCUU (SEQ ID NO:33) 19 bases UUCAGAGAGCGACCAAGACAG (SEQ ID NO:34)		335-354	58% GC
Cebador A aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA <u>GTCTCTCGCTGGTTCTGTC</u> GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO:35) Cebador B aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA <u>GACAGAACCAGCGAGAGAC</u> GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO:36)			
GGCCUGGAUCCUGUUCUUCUU (SEQ ID NO:37) 19 bases UCCGGACCUAGGACAAGAAG (SEQ ID NO:38)		359-378	58% GC
Cebador A aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA <u>GGCCTGGATCCTGTTCTTC</u> GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO:39) Cebador B aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA <u>GAAGAACAGGATCCAGGCC</u> GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO:40)			
GAUCCUGUUCUUCGUGCUCUU (SEQ ID NO:41) 19 bases UUCUAGGACAAGAAGCACGAG (SEQ ID NO:42)		365-384	53% GC

ID NO: 42)			
Cebador A aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA GATCCTGTTCTTCGTGCTC GGTGTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO: 43)			
Cebador B aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA GAGCACGAAGAACAGGATC GGTGTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO: 44)			
GCAUUGUUUGUAUCACCACUU (SEQ ID NO: 45)			
19 bases		394-413	42% GC
UUCGUAACAAACAUAGUGGUG (SEQ ID NO: 46)			
Cebador A aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA GCATTGTTTGTATCACCAC GGTGTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO: 47)			
Cebador B aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA GTGGTGATACAAACAATGC GGTGTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO: 48)			
GCUCAGUUUCCGGAAGGUCUU (SEQ ID NO: 49)			
19 bases		440-459	58% GC
UUCGAGUCAAGGCCUCCAG (SEQ ID NO: 50)			
Cebador A aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA GCTCAGTTTCCGGAAGGTC GGTGTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO: 51)			
Cebador B aguas abajo: 5' <u>CAAAA</u> ACTGTAAAAA GACCTTCCGGAACTGAGC GGTGTTCGTCCTTTCCACAAGA 3' (SEQ ID NO: 52)			

FIGURA 7

Localizaciones de las dianas de ARNsi en la secuencias de codificación de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)

```

1  ATGGGCAGCA CCTGGGGGAG CCCTGGCTGG GTGCGGCTCG CTC TTG CCT GACGGGCTTA
61  GTGCTCTCGC TCTACGGCGT GCACGTGAAG GCGGCGCGCG CCGGGACCG GGATTACCGC
121  GCGCTCTGGC ACGTGGGCAC CGCCATCAGC TGTTCGCGCG TCTTCTCCTC CAGGTGGGGC
181  AGGGGTTTCG GGCTGGTGGG GCATGTGCTG GGACAGGACA GCATCCTCAA TCAATCCAAC
241  AGCATATTCC GTTGCATCTT CTACACACGA CAGCTATTGT TAGGTTGCCT GCGGACACCG
301  TGGGCCCTCG TCCTGATGCT GCTGAGCTCC CTGGTGTCTC TCGCTGGTTC TGTCTACCTG
361  GCGTGCATTC TCGCTGATGCT GCTGTATGAT TTCTGCAATG TTGTATCAC CACCTATGCT
421  ATCAACGTGA GCCTGATGTG GCTCAGTTTC GCGAAGGTCC AAGAACCCCA GGGCAAGGCT
481  AAGAGGCACT GA

```

FIGURA 8

Secuencias de cebadores y condiciones de PCR para VKORC1 de Homo sapiens y VKORC1L1 de Homo sapiens			
SEQ ID No:	Cebador	Secuenci	Temp. de alineamiento
55	Hs_VKORC1-Ex1-F	CAATCGCCGAGTCAGAGG	58°C
56	Hs_VKORC1-Ex1-R	TAATCATCTGGCATCCTGGC	
57	Hs_VKORC1-Ex2-F	CAAGGCACTGGGTTGACAG	58°C
58	Hs_VKORC1-Ex2-R	GAGTGGGGCTGAGCTGAC	
59	Hs_VKORC1-Ex3-F	GACATCATGGAGTGTTCGGG	58°C
60	Hs_VKORC1-Ex3-R	CTTAGGCAAGGCTCACATGC	
61	Hs_VKORC1-cDNA-F	GGCAGGAGGGTTTTCTCC	55°C
62	Hs_VKORC1-cDNA-R	CTCACATGCCAAAGCAAAG	
63	Rn_VKORC1-cDNA-F	GGCGGGTTCTTCGGCTCTT	55°C
64	Rn_VKORC1-cDNA-R	CATGTGCTAAGSCAAAGCAA	
65	Rn_VKORC1-cDNA-F-nes	TTGTGTCTGCGCTGTACTGTC	60°C
66	Rn_VKORC1-cDNA-R-nes	GTCAGCCTGGCATGAGGT	
67	Fr_VKORC1-cDNA-F	TCTTTTCCATTTGATTGGTCTT	55°C
68	Fr_VKORC1-cDNA-R	TCAATTTAGTGGCACCTCTG	
69	Fr_VKORC1-cDNA-F-nes	GTGGCCATCTGAGCAGAAAC	60°C
70	Fr_VKORC1-cDNA-R-nes	TGCTGGATTTCACTGGGAAC	
71	Hs_VKORC1L1-cDNA-F	TGGGTCCGGCCCCGACGG	55°C
72	Hs_VKORC1L1-cDNA-R	TTTAAATCCATCGGCTAAAAC	
73	Hs_VKORC1L1-cDNA-F-nes	GGCGGCTGAGGTGGAG	60°C
74	Hs_VKORC1L1-cDNA-R-nes	AGCAATGGTTGCTCACTTTAC	
75	Fr_VKORC1L1-cDNA-F	CGAGCTCCCTGCGTATGTAT	55°C
76	Fr_VKORC1L1-cDNA-R	GACGTTGTTGTTTGTTTATTGAT	
77	Fr_VKORC1L1-cDNA-F-nes	CGTATGTATGCGTGTCTCCAG	60°C
78	Fr_VKORC1L1-cDNA-Rnes	TTTTACCGCCGTTCTGA	
79	Rn_VKORC1L1-cDNA-F	GGCGGCGTCTGAGTGGAG	60°C
80	Rn_VKORC1L1-cDNA-R	ACAGGTTTAAATCCATCGGC	
81	Rn_VKORC1L1-cDNA-F-nes	CTGAGTGGAGGCGGAGG	60°C
82	Rn_VKORC1L1-cDNA-R-nes	TTTCATGTTTATGATCACATTTTG	
83	Rn_VKORC1L1-cDNA-R-short	CTGGCTGTATGCCAAGTAA	
84	Mm_VKORC1L1-cDNA-F	GGAAGATGGGGGGCGCCCG	58°C
85	Mm_VKORC1L1-cDNA-R	TCTGCTGTCAACACTGCACC	
86	Mm_VKORC1L1-cDNA-F-nes	GGTATGCAGTGTGCGCC	58°C
87	Mm_VKORC1L1-cDNA-R-nes	GCATTTCCAAGATGTTCTG	
Hs, Homo sapiens; Rn, rattus norvegicus; Fr, fugu rubripes; Mm, mus musculus; nes, cebador para PCR anidada			

FIGURA 9

TABLA DE SECUENCIAS		
SEQ ID NO:	Nombre	Especie
1	Secuencia proteica de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa (Hs_VKORC1)	Homo sapiens
2	Secuencia de codificación de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	Homo sapiens
3	Factor de coagulación dependiente de la vitamina K, de tipo 2 (VKCFD2)-mutación (292C>T; R98W) de la secuencia Hs_VKORC1	Homo sapiens
4	Resistencia a warfarina (WR)-secuencia 1 de mutación (85G>T; V29L) de la secuencia de Hs_VKORC1	Homo sapiens
5	Resistencia a warfarina (WR)-secuencia 2 de mutación (134T>C; V45A) de la secuencia de Hs_VKORC1	Homo sapiens
6	Resistencia a warfarina (WR)-secuencia 3 de mutación (172A>G; R58G) de la secuencia de Hs_VKORC1	Homo sapiens
7	Resistencia a warfarina (WR)-secuencia 4 de mutación (383T>G; L128R) de la secuencia de Hs_VKORC1	Homo sapiens
8	Polimorfismo de nucleótido único (SNP) 1 (129C>T, C43C) de la secuencia de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	Homo sapiens
9	SNP 2 (358C>T, L120L) de la secuencia de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	Homo sapiens

10	Secuencia proteica de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Homo sapiens (Hs_-VKORC1L1)	Homo sapiens
11	Secuencia de codificación de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Homo sapiens (Hs_-VKORC1L1)	Homo sapiens
12	Secuencia proteica de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Rattus norvegicus (Rn_VKORC1)	Rattus norvegicus
13	Secuencia de codificación de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Rattus norvegicus (Rn_VKORC1)	Rattus norvegicus
14	Resistencia a warfarina de la rata (Rw)-secuencia de mutación (416A>G; Y139C) de la secuencia de Rn_VKORC1	Rattus norvegicus
15	Secuencia proteica de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Rattus norvegicus (Rn_VKORC1L1)	Rattus norvegicus
16	Secuencia de codificación de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Rattus norvegicus (Rn_VKORC1L1)	Rattus norvegicus
17	Secuencia proteica de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Mus musculus (Mm_VKORC1)	Mus musculus
18	Secuencia de codificación de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de Mus musculus (Mm_VKORC1)	Mus musculus
19	Secuencia proteica de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Mus musculus (Mm_VKORC1L1)	Mus musculus
20	Secuencia de codificación de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Mus musculus (Mm_VKORC1L1)	Mus musculus

21	Secuencia proteica de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Fugu rubripes (Fr_VKORC1)	Fugu rubripes
22	Secuencia de codificación de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Fugu rubripes (Fr_VKORC1)	Fugu rubripes
23	Secuencia proteica de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Fugu rubripes (Fr_VKORC1L1)	Fugu rubripes
24	Secuencia de codificación de la proteína 1 de tipo VKORC1 de Fugu rubripes (Fr_VKORC1L1)	Fugu rubripes
25	Secuencia proteica de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Xenopus laevis (XI_VKORC1)	Xenopus laevis
26	Secuencia de codificación de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Xenopus laevis (XI_VKORC1)	Xenopus laevis
27	Secuencia proteica de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Anopheles gambiae (Ag_VKORC1L1)	Anopheles gambiae
28	Secuencia de codificación de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Anopheles gambiae (Ag_VKORC1L1)	Anopheles gambiae
29	Secuencia 1 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
30	Secuencia 2 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	

31	Cebador 1 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
32	Cebador 2 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
33	Secuencia 3 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
34	Secuencia 4 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
35	Cebador 3 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
36	Cebador 4 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
37	Secuencia 5 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
38	Secuencia 6 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
39	Cebador 5 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	

40	Cebador 6 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
41	Secuencia 7 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
42	Secuencia 8 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
43	Cebador 7 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
44	Cebador 8 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
45	Secuencia 9 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
46	Secuencia 10 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
47	Cebador 9 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
48	Cebador 10 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	

49	Secuencia 11 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
50	Secuencia 12 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
51	Cebador 11 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
52	Cebador 12 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (Hs_VKORC1)	
53	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de codificación completa de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (VKORC1-HindIII-F)	
54	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de codificación completa de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de Homo sapiens (VKORC1-HindIII-F)	
55	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-Ex1-F	
56	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-Ex1-R	
57	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-Ex2-F	

58	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-Ex2-R	
59	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-Ex3-F	
60	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-Ex3-R	
61	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-ADNc-F	
62	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1-ADNc-R	
63	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1-ADNc-F	
64	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1-ADNc-R	
65	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1-ADNc-F-nes	
66	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1-ADNc-R-nes	
67	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1-ADNc-F	
68	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1-ADNc-R	
69	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1-ADNc-F-nes	

70	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1-ADNc-R-nes	
71	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1L1-ADNc-F	
72	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1L1-ADNc-R	
73	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1L1-ADNc-F-nes	
74	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Homo sapiens Hs_VKORC1L1-ADNc-R-nes	
75	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1L1-ADNc-F	
76	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1L1-ADNc-R	
77	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1L1-ADNc-F-nes	
78	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Fugu rubripes Fr_VKORC1L1-ADNc-R-nes	
79	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1L1-ADNc-F	
80	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1L1-ADNc-R	
81	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1L1-ADNc-F-nes	

82	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1L1-ADNc-R-nes	
83	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Rattus norvegicus Rn_VKORC1L1-ADNc-R-corto	
84	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Mus musculus Mm_VKORC1L1-ADNc-F	
85	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Mus musculus Mm_VKORC1L1-ADNc-R	
86	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Mus musculus Mm_VKORC1L1-ADNc-F-nes	
87	Cebador para PCR para la amplificación de la secuencia de Mus musculus Mm_VKORC1L1-ADNc-R-nes	
88	Cebador para PCR para rVKORC1-outerF	
89	Cebador para PCR para rVKORC1-outerR	
90	Cebador para PCR para rVKORC1-innerF	
91	Cebador para PCR para rVKORC1-innerR	
92	Cebador para PCR para VKORC1-pcdna3-F	
93	Cebador para PCR para VKORC1-pcdna3-R	
94	VKORC1 de Homo sapiens con mutación 416A>G de resistencia a warfarina en rata	

FIGURA 10

Actividades¹ de VKOR de células HEK293 transfectadas con constructos de ADNc de VKORC1

Mutación	Fenotipo	Warfarina [μM]					
		0	5	10	20	40	80
WT	normal	20.29	8.66	6.39	4.33	2.71	0.88
R98W	VKCFD2	1.81	0.73	0.42	0.16	<0.10	<0.10
V29L	WR	19.59	6.34	5.08	5.26	4.69	2.19
V45A	WR	4.67	1.12	1.14	0.57	<0.10	<0.10
R58G	WR	4.20	1.02	1.03	0.72	0.40	<0.10
L128R	WR	1.05	0.30	0.30	0.31	<0.10	<0.10
Y139C	Rw	9.74	10.44	9.47	8.77	8.23	6.71

FIGURA 11**Secuencia de aminoácidos del polipéptido de reciclaje de vitamina K-
epóxido de Homo sapiens (HS_VKORC1; SEQ ID NO:1)**

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

FIGURA 12

Secuencia de codificación de ácido nucleico del polipéptido de reciclaje de vitamina K-epóxido de Homo sapiens (HS_VKORC1; SEQ ID NO:2)

atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgcggctcg ctctttgctt gacgggctta
60

gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc
120

gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgctcgcgcg tcttctcttc caggtggggc
180

aggggtttcg ggctggtgga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac
240

agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc
300

tgggcctctg tcttgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg
360

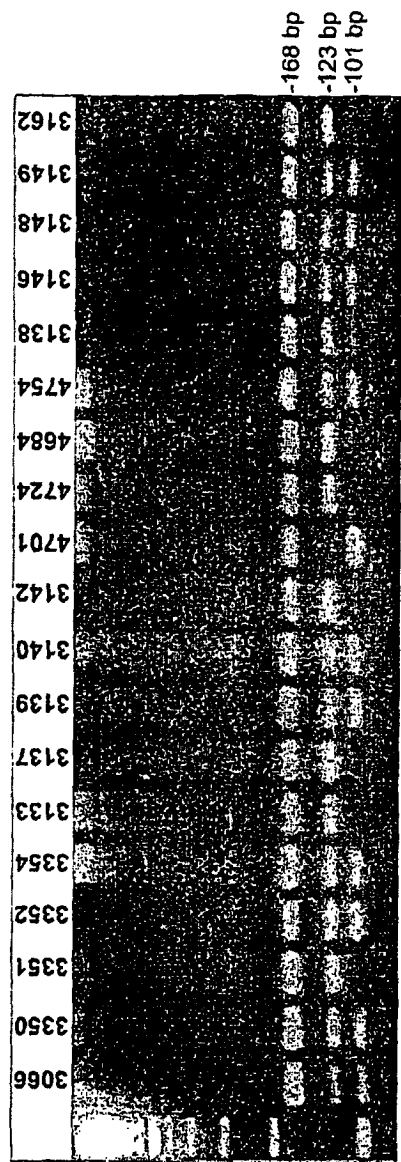
gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct
420

atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaaggctc aagaacccca gggcaaggct
480

aagaggcact ga
492

FIGURA 13

Detección de la mutación Y139C (416A>G) de resistencia a warfarina del gen VKORC1 en el genoma de *Rattus norvegicus* por ARMS-PCR



Sonda : 3066 3350 3351 3352 3354 3133 3137 3139 3140 3142 4701 4724 4684 3146 3138 3148 3149 3162
Alelo A-G A-G A-A A-G A-G A-A A-A A-G A-G A-G A-G A-G A-G A-G A-G A-A

A-A: homocigotos tipo salvaje;
G-G: homocigotos 416 A>G;
A-G: heterocigotos

ES 2 344 413 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Baxter International, Inc. Oldenburg, Johannes Müller-Reible, Clemens Fregin, Andreas Rost, Simone Strom, Tim

5

<120> Polipéptido de reciclaje de vitamina K-epóxido, VKORC1, diana terapéutica de la cumarina y sus derivados

<130> B2174

10

<160> 94

<170> PatentIn versión 3.1

15

<210> 1

<211> 163

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

Met	Gly	Ser	Thr	Trp	Gly	Ser	Pro	Gly	Trp	Val	Arg	Leu	Ala	Leu	Cys
1				5					10					15	

30

Leu	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Leu	His	Val	Lys	Ala	Ala
			20					25					30		

35

40

Arg	Ala	Arg	Asp	Arg	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu	Cys	Asp	Val	Gly	Thr	Ala
		35					40					45			

45

Ile	Ser	Cys	Ser	Arg	Val	Phe	Ser	Ser	Arg	Trp	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly
	50					55					60				

50

55

60

65

ES 2 344 413 T3

Leu Val Glu His Val Leu Gly Gln Asp Ser Ile Leu Asn Gln Ser Asn
65 70 75 80

5

Ser Ile Phe Gly Cys Ile Phe Tyr Thr Leu Gln Leu Leu Leu Gly Cys
85 90 95

10

Leu Arg Thr Arg Trp Ala Ser Val Leu Met Leu Leu Ser Ser Leu Val
100 105 110

15

Ser Leu Ala Gly Ser Val Tyr Leu Ala Trp Ile Leu Phe Phe Val Leu
115 120 125

20

Tyr Asp Phe Cys Ile Val Cys Ile Thr Thr Tyr Ala Ile Asn Val Ser
130 135 140

25

Leu Met Trp Leu Ser Phe Arg Lys Val Gln Glu Pro Gln Gly Lys Ala
145 150 155 160

30

Lys Arg His

35

<210> 2

40

<211> 492

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 2

50

atgggcagca cctgggggag ccctgggtgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta 60

55

gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc 120

60

gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc caggtggggc 180

aggggtttcg ggctgggtgga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac 240

65

ES 2 344 413 T3

	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
5	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctgggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
10	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaagggtcc aagaacccca gggcaaggct	480
	aagaggcact ga	492
15		
	<210> 3	
	<211> 492	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 3	
	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
30	gtgctctcgc tctacgcgt gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
	gcgctctgcg acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctctc caggtggggc	180
35	agggggtttc ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
40	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gtggacacgc	300
	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctgggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
45	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaagggtcc aagaacccca gggcaaggct	480
50	aagaggcact ga	492
55		
	<210> 4	
	<211> 492	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65		

ES 2 344 413 T3

<400> 4

	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
5	gtgctctcgc tctacgcgct gcacttgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
	gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc caggtggggc	180
10	aggggtttcg ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
20	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaagggtc aagaacccca gggcaaggct	480
25	aagaggcact ga	492

<210> 5

30 <211> 492

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 5

	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
40	gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
	gcgctctcgc acgcgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc caggtggggc	180
45	aggggtttcg ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
55	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaagggtc aagaacccca gggcaaggct	480
60	aagaggcact ga	492

<210> 6

65 <211> 492

<212> ADN

ES 2 344 413 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

5	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgaggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
	gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
10	gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc cgggtggggc	180
	aggggtttcg ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
15	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
20	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
25	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaagggtc aagaacccca gggcaaggct	480
30	aagaggcact ga	492

<210> 7

<211> 492

35 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

40	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgaggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
	gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
45	gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc cagggtggggc	180
	aggggtttcg ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
50	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
55	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
60	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaagggtc aagaacccca gggcaaggct	480
65	aagaggcact ga	492

<210> 8

<211> 492

ES 2 344 413 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 8

	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
10	gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
	gcgctctgtg acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc caggtggggc	180
15	aggggtttcg ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
20	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
25	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaaggctc aagaacccca gggcaaggct	480
30	aagaggcact ga	492

<210> 9

35 <211> 492

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 9

	atgggcagca cctgggggag ccctggctgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
45	gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
	gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc caggtggggc	180
50	aggggtttcg ggctgggtga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
55	tgggcctctg tctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacttg	360
	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctatgct	420
60	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaaggctc aagaacccca gggcaaggct	480
65	aagaggcact ga	492

ES 2 344 413 T3

<210> 10

<211> 176

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

10
    Met Ala Ala Pro Val Leu Leu Arg Val Ser Val Pro Arg Trp Glu Arg
    1              5              10              15

15

    Val Ala Arg Tyr Ala Val Cys Ala Ala Gly Ile Leu Leu Ser Ile Tyr
    20              20              25              30

25
    Ala Tyr His Val Glu Arg Glu Lys Glu Arg Asp Pro Glu His Arg Ala
    35              40              45

30

    Leu Cys Asp Leu Gly Pro Trp Val Lys Cys Ser Ala Ala Leu Ala Ser
    50              55              60

35

    Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly Leu Leu Gly Ser Ile Phe Gly Lys Asp
    40

45

50

55

60

65

```

ES 2 344 413 T3

	65	70	75	80
5	Gly Val Leu Asn Gln Pro Asn Ser Val Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Ile			
	85		90	95
10	Leu Gln Leu Leu Leu Gly Met Thr Ala Ser Ala Val Ala Ala Leu Ile			
	100	105	110	
15	Leu Met Thr Ser Ser Ile Met Ser Val Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala			
	115	120	125	
20	Tyr Ile Leu Tyr Phe Val Leu Lys Glu Phe Cys Ile Ile Cys Ile Val			
	130	135	140	
25	Thr Tyr Val Leu Asn Phe Leu Leu Leu Ile Ile Asn Tyr Lys Arg Leu			
	145	150	155	160
30	Val Tyr Leu Asn Glu Ala Trp Lys Arg Gln Leu Gln Pro Lys Gln Asp			
	165	170	175	

<210> 11

<211> 531

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

atggcggctc ccgtcctgct aagagtgtcg gtgccgcggt gggagcgggt ggcgccgtat	60
gcagtgtgcy ctgccggaat cctgctctcc atctacgcct accacgtgga gcgggagaag	120
gagcgggacc ccgagcaccg ggcctctctgc gacctggggc cctgggtgaa gtgctccgcc	180
gcccttgccct ccagatgggg tcgaggattt ggtcttttgg gttccatttt tggaaaggat	240
ggtgtattaa accagccaaa cagtgtcttt ggacttatat tttatatact acagttatta	300

ES 2 344 413 T3

cttggcatga cagcaagegc tgtggcgget ttgatcctca tgacgtcctc catcatgtcg 360
 5 gtctgtgggggt ccctgtacct ggcctacatt ctgtactttg tgctgaagga gttctgcatc 420
 atctgcatcg tcacgtacgt gctgaacttc cttcttctca ttatcaacta caaacgacta 480
 10 gtttacttga acgaggcctg gaagcggcag ctgcaaccca agcaggactg a 531
 <210> 12
 <211> 161
 15 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 20 <400> 12
 Met Gly Thr Thr Trp Arg Ser Pro Gly Arg Leu Arg Leu Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 25
 Leu Ala Gly Leu Ala Leu Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala Ala
 30 20 25 30
 35 Arg Ala Arg Asn Glu Asp Tyr Arg Ala Leu Cys Asp Val Gly Thr Ala
 35 40 45
 40
 Ile Ser Cys Ser Arg Val Phe Ser Ser Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly
 45 50 55 60
 50 Leu Val Glu His Val Leu Gly Ala Asp Ser Ile Leu Asn Gln Ser Asn
 65 70 75 80
 55 Ser Ile Phe Gly Cys Met Phe Tyr Thr Ile Gln Leu Leu Leu Gly Cys
 85 90 95
 60
 Leu Arg Gly Arg Trp Ala Ser Ile Leu Leu Ile Leu Ser Ser Leu Val
 65

ES 2 344 413 T3

100

105

110

5

Ser Val Ala Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Trp Ile Leu Phe Phe Val Leu

115

120

125

10

Tyr Asp Phe Cys Ile Val Cys Ile Thr Thr Tyr Ala Ile Asn Ala Gly

15

130

135

140

20

Leu Met Leu Leu Ser Phe Gln Lys Val Pro Glu His Lys Val Lys Lys

145

150

155

160

25

Pro

30

<210> 13

<211> 486

<212> ADN

35

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 13

40

atgggcacca cctggaggag ccctggacgt ttgcggcttg cactatgcct cgctggccta 60

45

gccctctcac tgtacgcact gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgcaatga ggattaccgc 120

gcgctctgcg acgtgggcac ggccatcagc tgttcccgcg tcttctcttc tcggtggggc 180

50

cggggccttg ggctggtgga gcacgtgtta ggagctgaca gcatcctcaa ccaatccaac 240

agcatatctg gttgcatggt ctacaccata cagctgttgt taggttgctt gaggggacgt 300

55

tgggcctcta tcctactgat cctgagttcc ctggtgtctg tcgctggttc tctgtacctg 360

60

gcctggatcc tgttctttgt cctgtatgat ttctgcattg tttgcatcac cacctatgcc 420

atcaatgcgg gcctgatggt gcttagcttc cagaaggtgc cagaacacaa ggtcaaaaag 480

65

ccctga 486

ES 2 344 413 T3

<210> 14

<211> 486

<212> ADN

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 14

```

10      atgggcacca cctggaggag ccctggacgt ttgcggcttg cactatgcct cgctggccta      60
15      gccctctcac tgtacgcact gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgcaatga ggattaccgc      120
      gcgctctgcg acgtgggcac ggccatcagc tgttcccgcg tcttctcctc tcggtggggc      180
20      cggggccttg ggctgggtgga gcacgtgtta ggagctgaca gcatcctcaa ccaatccaac      240
      agcatatttg gttgcatggt ctacaccata cagctgttgt taggttgctt gaggggacgt      300
25      tgggcctcta tctactgat cctgagttcc ctggtgtctg tcgctgggtc tctgtacctg      360
      gcctggatcc tgttctttgt cctgtatgat ttctgcattg tttgcatcac cacctgtgcc      420
30      atcaatgcgg gcctgatggt gettagcttc cagaagggtc cagaacacaa ggtcaaaaag      480
35      ccctga
                                         486
  
```

40 <210> 15

<211> 176

<212> PRT

45 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 15

```

50      Met Ala Ala Pro Val Leu Leu Arg Val Ser Val Pro Arg Trp Glu Arg
      1              5              10              15
55
      Val Ala Arg Tyr Ala Val Cys Ala Ala Gly Ile Leu Leu Ser Ile Tyr
      20              25              30
60
65
  
```

ES 2 344 413 T3

Ala Tyr His Val Glu Arg Glu Lys Glu Arg Asp Pro Glu His Arg Ala
35 40 45

5

Leu Cys Asp Leu Gly Pro Trp Val Lys Cys Ser Ala Ala Leu Ala Ser
50 55 60

10

Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly Leu Leu Gly Ser Ile Phe Gly Lys Asp
65 70 75 80

15

Gly Val Leu Asn Gln Pro Asn Ser Val Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Ile
85 90 95

20

Leu Gln Leu Leu Leu Gly Met Thr Ala Ser Ala Val Ala Ala Leu Val
100 105 110

25

Leu Met Thr Ser Ser Ile Val Ser Val Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala
115 120 125

30

Tyr Ile Leu Tyr Phe Val Leu Lys Glu Phe Cys Ile Ile Cys Val Thr
130 135 140

35

Thr Tyr Val Leu Asn Phe Leu Leu Leu Ile Ile Asn Tyr Lys Arg Leu
145 150 155 160

40

Val Tyr Leu Asn Glu Ala Trp Lys Arg Gln Leu Gln Pro Lys Glu Asp
165 170 175

45

50

55 <210> 16
<211> 531
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

60

65

ES 2 344 413 T3

<400> 16

```

    atggcgggcg cgcgcctgct gagagtgtcg gtgcgcgggt gggaacgggt ggcccgggtat      60
5    gcagtgtgcg ccgccgggat cctgctctcc atctacgct accacgtgga gcgggagaag      120
    gagagggacc cggagcaccg ggccctctgc gacctggggc cctgggtgaa gtgctccgcc      180
10   gccctggcct ccagatgggg tcgaggattt ggtcttttgg gttccatttt tggaaaagat      240
    ggtgtattaa accagccaaa cagtgtcttt ggacttatat tttatatact acagttatta      300
    cttggcatga cagccagcgc agttgcagct ctggctctca tgacctctc catcgtgtcc      360
20   gtgggtgggg ctttgtacct ggccacatt ctgtactttg tgctgaagga gttttgcac      420
    atctgcgtca ccacatatgt gctgaacttc cttctctca tcatcaacta caaacgactg      480
25   gtttacttga atgaggcctg gaagcgacaa ctgcagccta aggaagactg a              531

```

30 <210> 17

<211> 161

<212> PRT

35 <213> *Mus musculus*

<400> 17

```

40   Met Gly Thr Thr Trp Arg Ser Pro Gly Leu Val Arg Leu Ala Leu Cys
    1              5              10              15

45   Leu Ala Gly Leu Ala Leu Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala Ala
    20              25              30

50   Arg Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Arg Ala Leu Cys Asp Val Gly Thr Ala
    35              40              45

60   Ile Ser Cys Ser Arg Val Phe Ser Ser Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly
    50              55              60

```

65

ES 2 344 413 T3

Leu Val Glu His Met Leu Gly Ala Asp Ser Val Leu Asn Gln Ser Asn
65 70 75 80

5

Ser Ile Phe Gly Cys Leu Phe Tyr Thr Leu Gln Leu Leu Leu Gly Cys
10 85 90 95

15

Leu Arg Gly Arg Trp Ala Ser Ile Leu Leu Val Leu Ser Ser Leu Val
100 105 110

20

Ser Val Ala Gly Ser Val Tyr Leu Ala Trp Ile Leu Phe Phe Val Leu
115 120 125

25

Tyr Asp Phe Cys Ile Val Cys Ile Thr Thr Tyr Ala Ile Asn Val Gly
30 130 135 140

35

Leu Met Leu Leu Ser Phe Gln Lys Val Pro Glu His Lys Thr Lys Lys
145 150 155 160

40

His

45

<210> 18

<211> 486

<212> ADN

50

<213> *Mus musculus*

<400> 18

55

atgggcacca cctggaggag ccctggactc gtgcggcttg cactgtgcct cgctggctta 60

gccctctcac tgtacgcact gcacgtgaag gcggcgcgcg cccgcgatga aaattaccgc 120

60

gcgctctgcg atgtgggcac ggccatcagc tgttccgcg tcttctcttc tcggtggggc 180

65

cggggctttg ggctgggtga gcacatgcta ggagcggaca gcgtcctcaa ccaatccaac 240

ES 2 344 413 T3

```

    agcatatttg gttgcctggt ctacacotta cagctgttgt taggttgctt gaggggacgt      300
    tgggcctcta tcctactggt gctgagttcc ctggtgtccg tcgctgggtc cgtgtacctg      360
5    gcctggatcc tgttctttgt gttatatgat ttctgcattg tgtgcattac cacctatgcc      420
    atcaatgtgg gtctgatggt gcttagcttc cagaaggtag cagaacacaa gacccaaaag      480
    cactga                                          486
15    <210> 19
    <211> 176
    <212> PRT
20    <213> Mus musculus
    <400> 19
25    Met Ala Ala Pro Val Leu Leu Arg Val Ser Val Pro Arg Trp Glu Arg
        1          5          10          15
30    Val Ala Arg Tyr Ala Val Cys Ala Ala Gly Ile Leu Leu Ser Ile Tyr
        20          25          30
35
40    Ala Tyr His Val Glu Arg Glu Lys Glu Arg Asp Pro Glu His Arg Ala
        35          40          45
45    Leu Cys Asp Leu Gly Pro Trp Val Lys Cys Ser Ala Ala Leu Ala Ser
        50          55          60
50
55    Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly Leu Leu Gly Ser Ile Phe Gly Lys Asp
        65          70          75          80
60
    Gly Val Leu Asn Gln Pro Asn Ser Val Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Ile
        85          90          95
65

```

ES 2 344 413 T3

Leu Gln Leu Leu Leu Gly Met Thr Ala Ser Ala Val Ala Ala Leu Val
100 105 110

5

Leu Met Thr Ser Ser Ile Val Ser Val Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala
115 120 125

10

Tyr Ile Leu Tyr Phe Val Leu Lys Glu Phe Cys Ile Ile Cys Val Thr
130 135 140

15

Thr Tyr Val Leu Asn Phe Leu Leu Leu Ile Ile Asn Tyr Lys Arg Leu
145 150 155 160

20

Val Tyr Leu Asn Glu Ala Trp Lys Arg Gln Leu Gln Pro Lys Glu Asp
165 170 175

25

30

<210> 20

<211> 531

35

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 20

40

atggcgggcg cgcgtcctgct gagagtgtcg gtgccgcggt gggaacgggt ggcccgggtat 60

45

gcagtgtgcg ccgccgggat cctgctctcc atctacgct accacgtgga gcgggagaag 120

gagagggacc cggagcaccg ggccctctgc gacctggggc cctgggtgaa gtgctccgcc 180

50

gccctggcct ccagatgggg tcgaggattt ggtcttttgg gttccatttt tggaaaagat 240

ggtgtattaa accagccaaa cagtgtcttt ggacttatat tttatatact acagttatta 300

55

cttggcatga cagccagcgc agttgcagct ctggctctca tgacctctc cattgtgtct 360

60

gtggtgggct ctttgtacct ggcctacatt ctgtactttg tgctgaaaga gttttgcac 420

atctgcgtca ccacatatgt gctgaacttc ctctctctca tcatcaatta caaacgacta 480

65

gtttatttga atgaggcctg gaagcgacag ctgcagccta aggaagactg a 531

ES 2 344 413 T3

<210> 21

<211> 163

<212> PRT

5 <213> *Fugu rubripes*

<400> 21

```

10      Met Ala Ile Pro Thr Trp Glu Arg Lys Val Arg Ile Phe Leu Cys Val
      1              5              10              15

15

20      Phe Gly Leu Leu Leu Ser Val Tyr Ala Leu His Val Glu Leu Ser Arg
      20              25              30

25      Glu Arg Asn Pro Asp Tyr Arg Ala Met Cys Asp Leu Gly Glu Ser Val
      35              40              45

30

35      Ser Cys Ser Lys Val Phe Ser Ser Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly Leu
      50              55              60

40      Val Gln Tyr Phe Val Asp Lys Asp Ser Pro Leu Asn Gln Pro Asn Ser
      65              70              75              80

45      Val Leu Gly Ile Ile Phe Tyr Thr Leu Gln Met Cys Leu Gly Leu Ser
      85              90              95

50

55      Leu Ser Arg Lys Ala Ala Leu Phe Leu Val Phe Ser Ser Trp Val Ser
      100             105             110

60      Val Ala Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Ala Phe Val Leu Gly
      115             120             125

65

```

ES 2 344 413 T3

Asp Phe Cys Met Val Cys Val Ser Thr Tyr Leu Val Asn Phe Val Leu
130 135 140

5

Leu Phe Thr Asn Leu Lys Arg Arg Arg Ala Ile Glu Gly Leu Lys Glu
145 150 155 160

10

15 Lys Ser Gly

<210> 22

20

<211> 492

<212> ADN

<213> *Fugu rubripes*

25

<400> 22

30 atggcgatcc ccacatggga gagaaaagtg cgcataatttc tctgtgtttt tggattactt 60

ttgtctgttt acgcgctcca cgtcgagcta tcccagagaga gaaaccggga ttacagggcg 120

35

atgtgcgacc tgggggagtc tgtgagctgc tctaagggtt tcagctccag atggggacgg 180

40

ggttttggcc tagtccagta ctttgttgac aaagatagcc ctctgaacca gccaacagct 240

gtgcttggca tcatttttta cactctgcag atgtgtcttg gactgtctct gtccagaaaa 300

45

gctgcgctgt ttttagtctt ctccctcctgg gtgtctgttg ccggctccct ctatctggca 360

tcgattctag cgtttgttct gggagacttc tgtatggtct gtgtgtcaac atatcttgtt 420

50

aacttcgtac tgctcttcac taacctgaaa cgacggagag caattgaagg actgaaggag 480

55

aagtctggat ag 492

<210> 23

60

<211> 175

<212> PRT

<213> *Fugu rubripes*

65

ES 2 344 413 T3

<400> 23

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

65
 <210> 24
 <211> 528

ES 2 344 413 T3

<212> ADN

<213> *Fugu rubripes*

5 <400> 24

```

10      atggcgggcgc cgcctctgag agtatccacc cctcggtggg aaagaatagc ccgggtcctc      60
      gtgtgcctcc tgggcatact gctgtctctg tacgccttcc acgtggagag ggaacatgct      120
15      cgggatccca gttataaggc tttgtgogac gtcagtagct ccatcagctg ttctaaagtg      180
      ttcggctcca ggtggggccg aggatttgga ctcttgggct ccatttttgg gaatgacagc      240
20      gcactgaacc aaccaacag cgtctacggg atcgtctttt acgccttcca gcttttacta      300
      ggaatgacgg tcagtgcgat ggcgggccctg atcctcatga ccacgtccat catgtcggtg      360
25      gtgggctcgc tctacctggg ctacatcctc tactttgtcc tcaaggacct gtgcgtcatc      420
      tgcgtcacca cgtacgcgct gaacttcac ctttttgtcc tcaactacaa gcgactgggt      480
30      tacttgaacg aggcttgga gcagaagctc caggccaagc aggactaa      528

```

35

<210> 25

<211> 169

40 <212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 25

45

```

      Met Ser Val Pro Gly Trp Glu Arg Pro Val Arg Leu Leu Leu Cys Ser
50      1              5              10              15

      Val Gly Ile Ala Leu Ser Leu Tyr Ala Phe His Val Glu Thr Ser Arg
55              20              25              30

```

60

65

ES 2 344 413 T3

Glu Arg Asp Pro Asp Tyr Thr Ala Leu Cys Asp Ile Asn Pro Ser Ile
 35 40 45
 5
 Ser Cys Ser Lys Val Phe Thr Ser Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly Leu
 50 55 60
 10
 Val Glu Gln Phe Leu Gly Gln Gln Ser Leu Leu Asn Gln Pro Asn Ser
 65 70 75 80
 15
 Val Phe Gly Val Leu Phe Tyr Gly Leu Gln Leu Leu Leu Gly Phe Ser
 85 90 95
 20
 Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ser Thr Leu Leu Gly Thr Ser Leu Met Ser
 100 105 110
 25
 Ile Gly Gly Ser Met Tyr Leu Ala Tyr Ile Leu Val Tyr Val Leu Arg
 115 120 125
 30
 Asp Phe Cys Val Ile Cys Val Ser Thr Tyr Val Leu Asn Leu Leu Leu
 130 135 140
 35
 Leu Leu Leu Asn Leu Lys Arg Leu Ser Ser Leu Arg Ala Pro Pro Lys
 145 150 155 160
 40
 Lys His Lys Asn Lys Arg Lys Lys Asn
 165
 50
 <210> 26
 <211> 510
 <212> ADN
 <213> *Xenopus laevis*
 55
 60
 65

ES 2 344 413 T3

<400> 26

```

atgtctgtgc cgggctggga gaggccagtg aggctgttgc tgtgctctgt gggatttggc      60
ctgtcactat atgccttcca tgtagagacc tcccgggaaa gagaccccgga ctataccgct      120
ctgtgtgaca tcaacccttc catcagctgc tccaaggtct tcaattccag atggggggcga      180
ggatttgggc tcgtggagca attcctgggg cagcagagtt tgctgaatca gccaacagc      240
gtgtttggag tctgtttcta cggcctgcag ctctgctggg gtttcagcgg atccctgget      300
gccgcctcca cgctactggg aacgtctctg atgtccatcg ggggctccat gtacttggcc      360
tatatcctgg tctatgtact gcgcgacttc tgcgttatct gcgtctccac ctacgtcctg      420
aacctcctcc tcctcctgct caacctcaag cgcctgtcct ccctccgagc gccccccaaa      480
aagcacaaga acaaacgcaa gaagaactaa      510

```

<210> 27

<211> 176

<212> PRT

<213> *Anopheles gambiae*

<400> 27

```

Met Ser Ile Leu Ala Gly Asn Cys Lys Cys Thr Tyr Thr Leu Ala Leu
1           5           10           15

Val Gly Leu Ser Val Cys Gly Phe Leu Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Tyr
20           25           30

Val Glu Leu Arg Ala Glu His Asp His Thr Tyr Gln Ala Met Cys Asp
35           40           45

Ile Ser Glu Arg Ile Ser Cys Thr Lys Val Phe Thr Ser Arg Tyr Gly
50           55           60

```

ES 2 344 413 T3

Arg Gly Phe Gly Ile Val Gly Pro Leu Leu Gly Asp Asp Ser Leu Leu
65 70 75 80

Asn Val Pro Asn Gly Phe Tyr Gly Ile Phe Tyr Tyr Phe Leu Val Ala
85 90 95

Gly Leu Ser Phe Ser Asn Asn Leu Ala Val Ser Arg Leu Thr Ser Tyr
100 105 110

Leu Ile Leu Leu Ser Asn Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Tyr Leu Leu
115 120 125

Tyr Phe Val Leu Gln Asp Met Cys Val Val Cys Val Thr Thr Tyr Ala
130 135 140

Val Asn Leu Val Ser Leu Ile Leu Ala Leu Gln Lys Ile Gln Ala Leu
145 150 155 160

Ile Arg Glu Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Lys Val Gly Lys Ala Lys
165 170 175

<210> 28

<211> 528

<212> ADN

<213> *Anopheles gambiae*

<400> 28

atgagcatcc tggcgggcaa ctgcaaatgc acgtacacgc tcgcgctcgt cggcctgagc 60

gtgtgcgggt ttctgctgtc gctgtacacg tcctacgtgg agctgcgggc cgagcacgac 120

catacctacc aggccatgtg cgacattagc gagcgcacatca gctgcaccaa agtggtttacc 180

ES 2 344 413 T3

	tccaggtacg ggcgtgggtt tggcattgtc gggccgttgc tcggcgacga ctcgctgctg	240
5	aacgtgccga acgggttcta cggcatcttc tactacttcc tagtggccgg cctcagcttc	300
	agcaacaatc tggccgtctc gcggctgacc agctacctca tactgctgtc caacgggctg	360
10	tcgctctacc tcgcctacct gctctacttc gtgctgcagg acatgtgcgt cgtgtgcgtc	420
	accacgtacg cggccaatct ggtcagcctg atactggcgc tgcagaaaat tcaggctctg	480
15	atccgggagg agcaggtaat gcgcgcgctc aaggttggca aggcaaag	528
	<210> 29	
20	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia 1 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (Hs_VKORC1)	
30	<400> 29	
	ggugcaucu ucuacacacu u	21
	<210> 30	
35	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia 2 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo de vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (Hs_VKORC1)	
45	<400> 30	
	uuccaacgua gaagaugugu g	21
	<210> 31	
50	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador 1 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (Hs_VKORC1)	
60	<400> 31	
	caaaaactgt aaaaagggtg catcttctac acacgggtgt tcgtcctttc cacaaga	57
65	<210> 32	
	<211> 57	
	<212> ADN	

ES 2 344 413 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador 2 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 32

10 **caaaaactgt aaaaagtgtg tagaagatgc aaccggtgtt tcgtcctttc cacaaga** 57

<210> 33

<211> 21

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia 3 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 33

25 **gucucucgcu gguucugucu u** 21

<210> 34

<211> 21

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia 4 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 34

40 **uucagagagc gaccaagaca g** 21

<210> 35

<211> 57

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador 3 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 35

55 **caaaaactgt aaaaagtctc tcgtctggttc tgcggtgtt tcgtcctttc cacaaga** 57

<210> 36

<211> 57

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Cebador 4 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

ES 2 344 413 T3

<400> 36

caaaaactgt aaaaagacag aaccagcgag agacggtgtt tcgtcctttc cacaaga 57

5 <210> 37

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia 5 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

15

<400> 37

ggccuggauc cuguucuucu u 21

20 <210> 38

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia 6 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

30

<400> 38

uuccggaccu aggacaagaa g 21

35 <210> 39

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Cebador 5 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

45

<400> 39

caaaaactgt aaaaaggcct ggatcctgtt cttcggtgtt tcgtcctttc cacaaga 57

50 <210> 40

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Cebador 6 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

60

<400> 40

caaaaactgt aaaaagaaga acaggatcca ggccggtgtt tcgtcctttc cacaaga 57

65

<210> 41

<211> 21

ES 2 344 413 T3

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia 7 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

10 <400> 41
 gauccuguuc uucgugcucu u **21**

<210> 42
 15 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia 8 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

25 <400> 42
 uucuaggaca agaagcacga g **21**

<210> 43
 30 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador 7 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

40 <400> 43
 caaaaactgt aaaaagatcc tgttcttcgt gtcggtggt tcgtcctttc cacaaga **57**

45 <210> 44
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador 8 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

55 <400> 44
 caaaaactgt aaaaagagca cgaagaacag gatcggtggt tcgtcctttc cacaaga **57**

60 <210> 45
 <211> 21
 <212> ARN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 344 413 T3

<223> Secuencia 9 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 45

gcauuguuug uaucaccacu u

21

<210> 46

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia 10 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 46

uucguaacaa acauaguggu g

21

<210> 47

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 9 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 47

caaaaactgt aaaaagcatt gtttgatatca ccacggtggt tcgtcctttc cacaaga

57

<210> 48

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 10 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

<400> 48

caaaaactgt aaaaagtggg gatacaaaca atgcggtggt tcgtcctttc cacaaga

57

<210> 49

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia 11 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de *Homo sapiens* (Hs_VKORC1)

ES 2 344 413 T3

	<400> 49		
	gcucaguuuc cggaaggucu u	21	
5	<210> 50		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Secuencia 12 de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (Hs_VKORC1)		
15	<400> 50		
	uucgagucaa aggccuucca g	21	
20	<210> 51		
	<211> 57		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 11 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (Hs_VKORC1)		
30	<400> 51		
	caaaaactgt aaaaagctca gtttcggaaggcggtgtt tcgtcctttc cacaaga	57	
35	<210> 52		
	<211> 57		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 12 aguas abajo para la secuencia de ARNsi de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (Hs_VKORC1)		
45	<400> 52		
	caaaaactgt aaaaagacct tcgggaaact gagcggtgtt tcgtcctttc cacaaga	57	
50	<210> 53		
	<211> 37		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR para la amplificación de la secuencia de codificación completa de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (VKORC1-HindIII-F)		
60	<400> 53		
	attaagcttc accatgggca gcacctgggg gagccct	37	
65	<210> 54		

ES 2 344 413 T3

	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador de PCR para la amplificación de la secuencia de codificación completa de la subunidad 1 del complejo vitamina K-epóxido reductasa de <i>Homo sapiens</i> (VKORC1-EcoRI-R)		
10	<400> 54		
	attgaattcc gtgcctctta gccttgccct g	31	
15	<210> 55		
	<211> 18		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-Ex1-F		
25	<400> 55		
	caatcgccga gtcagagg	18	
30	<210> 56		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-Ex1-R		
40	<400> 56		
	taatcatctg gcatcctggc	20	
	<210> 57		
45	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-Ex2-F		
55	<400> 57		
	caaggcactg gggtgacag	19	
	<210> 58		
60	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-Ex2-R		

ES 2 344 413 T3

	<400> 58		
	gagtggggct gagctgac		18
5	<210> 59		
	<211> 20		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-Ex3-F		
15	<400> 59		
	gacatcatgg agtgttcggg		20
20	<210> 60		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-Ex3-R		
30	<400> 60		
	cttaggcaag gctcacatgc		20
	<210> 61		
35	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-ADNc-F		
45	<400> 61		
	ggcacgaggg ttttctcc		18
	<210> 62		
50	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1-ADNc-R		
	<400> 62		
60	ctcacatgcc aaagcaaag		19
	<210> 63		
	<211> 18		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 344 413 T3

	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1-ADNc-F		
5	<400> 63		
	ggcgggttct tccctctt		18
	<210> 64		
10	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1-ADNc-R		
20	<400> 64		
	catgtgctaa ggcaaagcaa		20
	<210> 65		
25	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1-ADNc-F-nes		
	<400> 65		
35	ttgtgtctgc gctgtactgt c		21
	<210> 66		
	<211> 18		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1-ADNc-R-nes		
	<400> 66		
50	gtcagcctgg catgaggt		18
	<210> 67		
	<211> 22		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
60	<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1-ADNc-F		
	<400> 67		
65	tcttttccat ttgattggtc ct		22
	<210> 68		

ES 2 344 413 T3

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1-ADNc-R	
10	<400> 68	
	tcagtttagt cgcacctcct g	21
	<210> 69	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1-ADNc-F-nes	
	<400> 69	
25	gtggccatct ggcagaaac	20
	<210> 70	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1-ADNc-R-nes	
	<400> 70	
40	tgctggattt cagtgggaac	20
	<210> 71	
	<211> 18	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1L1-ADNc-F	
	<400> 71	
55	tgggtcgggc cccgacgg	18
	<210> 72	
	<211> 22	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1L1-ADNc-R	

ES 2 344 413 T3

<400> 72

tttaaatacca tcggctaaaa ac

22

5 <210> 73

<211> 16

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1L1-ADNc-F-nes

15 <400> 73

ggcggctgag gtggag

16

20 <210> 74

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para Hs_VKORC1L1-ADNc-R-nes

30 <400> 74

agcaatgggtt gctcacttta c

21

<210> 75

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1L1-ADNc-F

45 <400> 75

cgagctccct gcgtatgtat

20

<210> 76

50 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1L1-ADNc-R

<400> 76

60 **gacgttggtg ttgttttatt tgattt**

26

<210> 77

65 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 344 413 T3

	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1L1-ADNc-F-nes		
5	<400> 77		
	cgatatgtatg cgtgtctcca g	21	
	<210> 78		
10	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Fr_VKORC1L1-ADNc-Rnes		
20	<400> 78		
	ttttcacccgc cgttctga	18	
	<210> 79		
25	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1L1-ADNc-F		
	<400> 79		
35	ggcggcgtct gagtggag	18	
	<210> 80		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1L1-ADNc-R		
	<400> 80		
50	acaggtttaa atccatcggc	20	
	<210> 81		
	<211> 17		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
60	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1L1-ADNc-F-nes		
	<400> 81		
65	ctgagtggag gcggagg	17	
	<210> 82		
	<211> 24		

ES 2 344 413 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1L1-ADNc-R-nas	
	<400> 82	
10	tttcatgttc atgatcacat tttg	24
	<210> 83	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de PCR para Rn_VKORC1L1-ADNc-R-corto	
	<400> 83	
25	ctggctgtca tgccaagtaa	20
	<210> 84	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador de PCR para Mm_VKORC1L1-ADNc-F	
	<400> 84	
40	ggaagatggc ggcgcccg	18
	<210> 85	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador de PCR para Mm_VKORC1L1-ADNc-R	
	<400> 85	
55	tctgctgtca acactgcacc	20
	<210> 86	
	<211> 17	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador de PCR para Mm_VKORC1L1-ADNc-F-nas	

ES 2 344 413 T3

	<400> 86	
5	ggatatgcagt gtgcgcc	17
	<210> 87	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR para Mm_VKORC1L1-ADNc-R-nes	
	<400> 87	
20	gcatttccca agatgttctg	20
	<210> 88	
25	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de PCR para rVKORC1-outerF	
	<400> 88	
35	atcctgagtt ccctggtgtc tgtcgctg	28
40	<210> 89	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de PCR para rVKORC1-outerR	
50	<400> 89	
	tcagggcttt ttgaccttgt gttctggc	28
55	<210> 90	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador de PCR para rVKORC1-innerF	

ES 2 344 413 T3

<400> 90

tgattttctgc attgttttgca tcaccacatg

30

5

<210> 91

<211> 26

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador de PCR para rVKORC1-innerR

<400> 91

20 caacatcagg cccgcattga tggaat

26

<210> 92

25 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador de PCR para VKORC1-pcdna3-F

<400> 92

35

gggcggaagc ttgagataat gggca

25

40 <210> 93

<211> 22

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para VKORC1-pcdna3-R

50 <400> 93

gcttgaattc agggctcagt gc

22

55

<210> 94

<211> 492

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> VKORC1 de *Homo sapiens* con mutación 416A>G de resistencia a warfarina de rata

ES 2 344 413 T3

<400> 94

	atgggcagca cctgggggag ccctggetgg gtgcggctcg ctctttgcct gacgggctta	60
5	gtgctctcgc tctacgcgct gcacgtgaag ggggcgcgcg cccgggaccg ggattaccgc	120
10	gcgctctcgc acgtgggcac cgccatcagc tgttcgcgcg tcttctcctc caggtggggc	180
	agggggtttcg ggctgggtgga gcatgtgctg ggacaggaca gcatcctcaa tcaatccaac	240
15	agcatattcg gttgcatctt ctacacacta cagctattgt taggttgctt gcggacacgc	300
	tgggcctctg tcctgatgct gctgagctcc ctggtgtctc tcgctgggtc tgtctacctg	360
20	gcctggatcc tgttcttcgt gctctatgat ttctgcattg tttgtatcac cacctgtgct	420
25	atcaacgtga gcctgatgtg gctcagtttc cggaaggctc aagaacccca gggcaaggct	480
	aagaggcact ga	492
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		