



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 264**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/72** (2006.01)  
**C07K 1/107** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03708346 .6**  
86 Fecha de presentación : **13.03.2003**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1485411**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54 Título: **Redes que contienen proteínas citosólicas accesorias inmovilizadas sobre una superficie y procedimientos asociados.**

30 Prioridad: **13.03.2002 GB 0205910**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2008**

73 Titular/es: **SENSE PROTEOMIC LIMITED**  
**Unit 4, The Switchback, Gardner Road**  
**Maidenhead, Berkshire SL6 7RJ, GB**

72 Inventor/es: **Kozlowski, Roland;**  
**Blackburn, Jonathan, Michael;**  
**Davies, Andrew;**  
**Godber, Benjamin, Leslie J. y**  
**Hart, Darren, James**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 289 264 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Redes que contienen proteínas citosólicas accesorias inmovilizadas sobre una superficie y procedimientos asociados.

La presente invención se refiere a ciertas matrices de proteínas y a su uso en procedimientos de selección.

Una multitud de procesos de señalización celular y homeostáticos están mediados por proteínas transmembrana tales como canales de iones, receptores y transportadores. Todas estas clases de proteínas se conectan con proteínas de señalización, reguladoras, de andamiaje y adaptadoras a través de interacciones proteína-proteína que implican dominios citoplasmáticos.

Los canales de iones, los receptores de unión a membrana tales como receptores acoplados a proteína G y muchos transportadores de la superficie de la célula están comprendidos de complejos de subunidades de proteínas, que están constituidos por montajes homoméricos o heteroméricos de subunidades (denominados en este documento proteínas accesorias) sobre la cara citoplasmática de la membrana. La capacidad de estos grupos de proteínas para formar complejos de un modo combinatorio proporciona un mecanismo para la expresión específica de tejidos de complejos de proteína transmembrana con las propiedades biofísicas requeridas o la sensibilidad moduladora. Los determinantes de las interacciones de subunidades están localizándose cada vez más para definir dominios dentro de estas estructuras de subunidades. El entendimiento de las interacciones de estos dominios ayudará en la aclaración del montaje de proteínas de membrana en sistemas nativos e identificará proteínas moduladoras importantes para la función de la proteína dentro de una célula. Además, la sabiduría percibida dentro de estos campos de investigación reconoce que perturbar la interacción entre las subunidades citoplasmáticas accesorias y la parte unida a la membrana de una proteína transmembrana, una vez se ha identificado, podría representar un tejido sumamente selectivo y por tanto una ruta específica para regular la actividad de la molécula unida a la membrana. De ahí que los inhibidores exógenos de interacciones de proteínas accesorias y por tanto el montaje de subunidades o proteínas moduladoras puedan proporcionar dianas terapéuticas novedosas específicas para tejidos.

Los canales de potasio (Kv) dependientes del voltaje y los canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se reconocen como importantes dianas terapéuticas en muchos trastornos que incluyen aquellos del SNC, corazón, pulmones y vejiga. Ambos tipos de canales tienen una subunidad  $\alpha$  principal sensible al voltaje formadora de poros. Los canales Kv requieren el montaje de cuatro subunidades  $\alpha$  similares, conteniendo cada una seis segmentos transmembrana, mientras que los canales de calcio tienen una única subunidad  $\alpha$  con 24 segmentos transmembrana, empaquetados en cuatro "pseudosubunidades" de seis segmentos transmembrana [1]. Tanto los canales Kv como los  $\text{Ca}^{2+}$  ensamblan con subunidades  $\beta$  citoplasmáticas estructuralmente similares mediante dominios bien definidos dentro de la subunidad  $\alpha$ . Estos pueden afectar la dependencia de canales en diversas medidas y puede alterar espectacularmente la eficiencia de expresión de la superficie de subunidades  $\alpha$  mediante mecanismos que pueden parecerse a o imitar la interacción de proteínas de membrana con chaperonas moleculares auténticas [2]. Hasta la fecha se han identificado seis subunidades  $\beta$  para cada uno de los dos tipos de canales. Se ha determinado la capacidad de las subunidades  $\beta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  para ensamblarse con las seis subunidades  $\alpha$  [3], pero las interacciones de las subunidades  $\beta$  del canal Kv con las aproximadamente veinte subunidades  $\alpha$  está peor establecida y todavía no se conoce en detalle que las combinaciones de las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  son de verdad biológicamente relevantes ya que los procedimientos de análisis actualmente disponibles son relativamente primitivos (véase más adelante).

Los receptores, en particular los receptores acoplados a proteína G, se reconocen como un grupo extremadamente importante de proteínas de la superficie de la célula y realizan una amplia variedad de funciones en muchos sistemas [4]. Estas 7-12 proteínas transmembrana están agrupadas en tres familias, A, B y C, dentro de las que hay muchos subtipos. Cada GPCR interactúa con al menos una proteína G en su cara citoplasmática, aunque la naturaleza e identidad de estas interacciones se entiende escasamente y es actualmente imposible de predecir a partir de la bioinformática. Las proteínas G, además de complejarse con GPCR, también interactúan con subunidades de canales de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de un modo específico con resultados sorprendentes [5].

Las proteínas en la superficie de las células que permiten la entrada de moléculas voluminosas representan una tercera clase de proteínas de membrana, los transportadores, que se complejan con múltiples subunidades de proteínas citosólicas con el fin de funcionar, pero de nuevo aquí la naturaleza e identidad de estas interacciones está escasamente caracterizada en la actualidad debido a limitaciones en las metodologías de análisis actuales.

Las nuevas metodologías que permiten la caracterización *in vitro* sumamente paralela, que incluye la determinación de parámetros de unión de equilibrio y cinéticos, de interacciones de unión de subunidades de proteínas entre diversos componentes de subunidades supuestas será tremendamente útil en este campo, particularmente si también permiten la evaluación de la capacidad de compuestos potencialmente terapéuticos para modular tales interacciones. Los procedimientos actuales para estudiar estas interacciones se basan en engorrosas técnicas basadas en células tales como análisis electrofisiológico, o sistemas de unión *in vitro* de bajo rendimiento tales como ensayos de interacción de proteínas ("pull-down")/inmunoprecipitación. En comparación, la presente invención describe un procedimiento basado en matrices en el que la unión *in vitro* de dominios funcionales solubles de proteínas unidas a membranas, tales como canales de iones, receptores de la superficie de la célula y transportadores, a matrices de proteínas accesorias citoplasmáticas inmovilizadas puede caracterizarse en detalle. La invención permite determinar la afinidad y especificidad de unión de la interacción proteína-proteína que va a determinarse y también permite

explorar las acciones de inhibidores/competidores de la interacción que van a explorarse en un sistema sumamente paralelo.

5 Se ha usado el sistema de dos híbridos en levadura para detectar interacciones entre, por ejemplo, dominios de proteínas de canales de iones. Esta aproximación ha sido razonablemente útil para identificar dominios de unión y para determinar el efecto de sustituciones de aminoácidos en la interacción. Sin embargo, este procedimiento no puede proporcionar información cuantitativa sobre las afinidades de unión y no puede tratar el potencial de sustancias exógenas para modular las interacciones. Alternativamente se han usado los sistemas basados en células, por ejemplo electrofisiología de células completas seguida por expresión de subunidades en oocitos de *Xenopus* o líneas celulares de mamíferos, para estudiar el montaje de canales de iones. Esta aproximación es técnicamente difícil, intrínsecamente lleva mucho tiempo y proporciona información limitada sobre los acontecimientos de unión actuales debido a la medición de efectos posteriores, es decir, corrientes de células completas.

15 Se han usado procedimientos bioquímicos para aislar componentes individuales de montajes de canales de iones en sistemas nativos y recombinantes. Se han usado experimentos de co-inmunoprecipitación y purificación por afinidad de subunidades de canales para identificar componentes de complejos de canales de iones. Sin embargo, ningún procedimiento proporciona información detallada sobre afinidades de unión o es adecuado para seleccionar moduladores potenciales de interacciones de subunidades. En el caso de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los fragmentos de una subunidad  $\alpha$  particular se han inmovilizado sobre perlas de agarosa como fusiones a GST y la unión de las subunidades  $\beta$  traducidas *in vitro* se usó para definir más detenidamente la región específica de la subunidad  $\alpha$  implicada en la interacción [6]. En este estudio no se dispuso de información detallada sobre afinidades de unión y no está claro que la subunidad alfa se plegara correctamente en este estudio.

25 La unión por superposición de proteínas examina las interacciones de unión directamente entre un péptido soluble/proteína y una proteína diana inmovilizada sobre un soporte de membrana [7]. Durante este procedimiento, las proteínas se disocian inicialmente y se separan mediante SDS-PAGE y se transfieren a un filtro de nitrocelulosa como para inmunotransferencia de Western. Sin embargo, la etapa desnaturalizante implícita en este procedimiento sugiere que las proteínas ensayadas en esta técnica no pueden ser funcionales (es decir, plegarse) y por tanto biológicamente activas. Puede intentarse volver a naturalizar la proteína antes que se investigue la unión de una proteína marcada soluble; sin embargo, el porcentaje de éxito en este caso es escaso.

35 Se ha investigado la identificación de interacciones nativas entre proteínas de membrana y proteínas accesorias, y los dominios de unión implicados, usando diversos procedimientos basados en células. Por ejemplo, las combinaciones nativas de subtipos de canales Kv  $\alpha$  y  $\beta$  dentro de un complejo se han probado usando co-purificación con anticuerpos o toxinas específicas para subtipos [9, 10]. Los experimentos de dos híbridos en levadura se han usado ampliamente para identificar dominios de interacción proteína-proteína y, por ejemplo, se usaron para identificar la región del dominio T1 N-terminal de canales Kv que interactúa con las subunidades  $\beta$  citoplasmáticas [11]. Se ha investigado la capacidad de las proteínas para interactuar en una célula modelo usando técnicas de expresión recombinante. Ejemplos incluyen co-expresión de canales de iones dependientes del voltaje y caracterización funcional usando electrofisiología [3, 11, 12], y la expresión de GPCR quiméricos y mutantes [revisado en 13, 14]. La sabiduría percibida derivada de tales experimentos es que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  forman un complejo estable en la ER que no se disocia posteriormente.

45 Se han estudiado las interacciones de unión entre dominios de proteínas de membrana y los dominios de otras subunidades o sus componentes citoplasmáticos, tras la expresión separada, usando ensayos de interacción de proteínas sobre una base uno a uno. De esta forma se han examinado los dominios de tetramerización de subunidades transmembrana de canales de  $\text{K}^+$  [15]. Se han examinado los dominios intracelulares de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se unen a subunidades  $\beta$  [6] o proteínas SNARE [16], la unión de GPCR 5-HT<sub>2A</sub> a arrestinas [17] y la unión del transportador CFTR que se une a la proteína adaptadora AP-2 [18] inmovilizando el dominio de la proteína de membrana sobre perlas. Alternativamente, la proteína Homer citoplasmática se ha inmovilizado sobre perlas para mostrar la interacción con receptores de glutamato metabotrópico expresado en un lisado de células [19]. Los experimentos de reticulación se han realizado entre CFTR y AP-2 en placas de microtitulación [18], pero en este caso no se inmovilizaron las proteínas. Los experimentos de superposición de proteínas permiten que se identifiquen simultáneamente varias interacciones de unión. Esta técnica se usó para mostrar la unión de INAD de *Drosophila* marcada a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  TRP inmovilizados [20]. Esta técnica permite que varias proteínas se fraccionen en diferentes carriles de un gel de SDS-PAGE y luego se inmovilicen sobre un filtro de nitrocelulosa que va a probarse para la unión.

60 La naturaleza de las técnicas descritas anteriormente significa que el análisis de proteínas normalmente implica o la coexpresión del componente de interacción potencial, o implica la desnaturalización de uno o más de los componentes potenciales, antes del ensayo de unión. Siempre son de bajo rendimiento y no dan información detallada sobre la especificidad o afinidad de unión y generalmente no son compatibles con estudios de inhibidores de moléculas pequeñas. Para superar tales problemas, los inventores han ideado una matriz de proteínas accesorias separadas, y en gran medida, funcionales, que no se co-expresaron originalmente con los componentes de proteínas de membrana. Una matriz tal permite, por primera vez, la determinación cuantitativa de interacciones de un modo sumamente paralelo.

65 Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona una matriz que comprende una superficie que tiene unida a la misma al menos una proteína accesoria citosólica libre de sus componentes de proteínas de membrana u otras subunidades con las que está normalmente complejada. Preferentemente, las proteínas accesorias citosólicas son proteínas accesorias citosólicas de proteínas de membrana que son miembros de una familia de proteínas de membrana

## ES 2 289 264 T3

homólogas. En una realización, la familia de proteínas de membrana homólogas se selecciona del grupo constituido por canales de iones, receptores acoplados a proteína G y proteínas transportadoras transmembrana.

5 Las proteínas accesorias sobre la matriz pueden ser miembros de una familia de proteínas accesorias homólogas, por ejemplo subunidades de canales de iones (por ejemplo, subunidades  $\beta$ ), proteínas que interactúan con receptores (por ejemplo, proteínas G, arrestinas y cinasas de receptores de proteína G) o proteínas accesorias para transportadores (por ejemplo proteínas que interactúan con proteínas transportadoras). Particularmente, se prevén matrices en las que las proteínas accesorias son subunidades  $\beta$  de canales de  $K^+$ , subunidades  $\beta$  de canales de  $Ca^{2+}$ , subtipos de proteínas G, por ejemplo,  $G\alpha$ ,  $G\beta/\gamma$  o proteínas accesorias para transportadores. Ejemplos incluyen subunidades  $\beta$  de Kv de canal, por ejemplo  $\beta$  1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 4, subunidades  $\beta$  de canales de calcio, por ejemplo,  $\beta$ 1a,  $\beta$ 1b,  $\beta$ 1c,  $\beta$ 2a,  $\beta$ 2b,  $\beta$ 2c,  $\beta$ 3a,  $\beta$ 3b,  $\beta$ 4, familias de proteínas G, por ejemplo la familia  $G_s$  ( $\alpha_s$  y  $\alpha_{olf}$ ), familia  $G_i$ , familia  $G_o$ ,  $\alpha_{i1}$ - $\alpha_{i13}$ ,  $\alpha_z$ ), familia  $G_{i-0}$ , familia  $G_{q-11}$  ( $\alpha_q$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{14}$ ,  $\alpha_{15}$ ,  $\alpha_{16}$ ,  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{13}$ ) y familia sensorial de  $G_\alpha$  ( $\alpha_{t-rod}$ ,  $\alpha_{gust}$ ) y familia  $\beta\gamma$  ( $\gamma_t$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  etc.), o proteínas accesorias para proteínas transportadoras (por ejemplo proteínas transportadoras de serotonina y glicina).

15 El número de proteínas unido a las matrices de la invención se determinará, al menos hasta un cierto punto, mediante el número de proteínas que se producen naturalmente o que son de suficiente interés experimental comercial o clínico. Una matriz que lleva una o dos proteínas sería de utilidad para el investigador. Sin embargo, en la práctica y con el fin de aprovecharse de la idoneidad de tales matrices para ensayos de alto rendimiento, se prevé que de 1 a 10000, 1 a 1000, 1 a 500, 1 a 400, 1 a 300, 1 a 200, 1 a 100, 1 a 75, 1 a 50, 1 a 25, 1 a 10 o 1 a 5 de tales proteínas están presentes sobre una matriz.

20 En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar qué proteínas accesorias citosólicas interactúan con una proteína de membrana dada o viceversa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(i) proporcionar una matriz de proteínas accesorias citosólicas candidatas libres de sus componentes de proteínas de membrana u otras subunidades con las que están normalmente complejadas de una o más familias de proteínas accesorias citosólicas de interés;

30 (ii) poner en contacto la matriz con fragmentos citosólicos de dicha proteína de membrana y/o fragmentos citosólicos de otros miembros de familias de proteínas de membrana relacionados; y

35 (iii) detectar e identificar los componentes que interactúan.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para seleccionar compuestos o péptidos o proteínas para determinar la capacidad para interactuar selectivamente con una proteína accesoria citosólica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

40 (i) proporcionar una matriz de proteínas accesorias citosólicas libres de sus componentes de proteínas de membrana u otras subunidades con las que están normalmente complejadas de una o más familias de proteínas citosólicas de interés;

45 (ii) poner en contacto la matriz con compuestos o péptidos o proteínas; y

(iii) identificar los componentes que interactúan.

Este procedimiento comprende opcionalmente la etapa adicional (iv) de cuantificar la interacción de los componentes que interactúan.

50 También se proporciona un procedimiento para seleccionar compuestos o péptidos o proteínas para determinar la capacidad para modular selectivamente la interacción entre una proteína accesoria citosólica y una proteína de membrana, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

55 (i) proporcionar una matriz de proteínas accesorias citosólicas libres de sus componentes de proteínas de membrana u otras subunidades con las que están normalmente complejadas de una o más familias de proteínas de interés;

(ii) poner en contacto la matriz con compuestos o péptidos o proteínas y con una o más proteínas de membrana o fragmentos citosólicos de las mismas de interés, o simultáneamente o sucesivamente; y

60 (iii) determinar si dicha interacción está modulada por la presencia de dichos compuestos o péptidos o proteínas.

Este procedimiento comprende opcionalmente la etapa adicional (iv) de cuantificar el grado de modulación de la interacción.

65 La invención también proporciona el uso de una matriz de proteínas accesorias citosólicas de la invención para medir la actividad catalítica relativa de diferentes miembros de una familia de proteínas accesorias.

La invención también proporciona el uso de una matriz de proteínas accesorias citosólicas de la invención como una superficie de afinidad sobre la que seleccionar anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos ligados a fenotipos-genotipos (por ejemplo anticuerpos de expresión en fagos).

5 La invención también proporciona el uso de una matriz de proteínas accesorias citosólicas de la invención para determinar el efecto de modificaciones post-transcripcionales en las interacciones de proteínas accesorias con proteínas de membrana y/o las propiedades de dichas proteínas de membrana o proteínas accesorias.

10 Las matrices de subunidades según la invención pueden comprender constructos de proteínas marcadas que están cada uno marcado e inmovilizado de una manera funcional en un formato espacialmente definido. Los constructos de proteínas marcadas pueden sacarse de grupos de subunidades de proteínas accesorias tales como las subunidades  $\beta$  auxiliares citoplasmáticas de canales de iones  $K^+$  o  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje, proteínas G, o proteínas accesorias globulares que interactúan con transportadores voluminosos. La unión de una sonda marcada, que puede ser otra subunidad de canal, proteína de asociación, dominio de interacción, péptido u otros ligandos potenciales, 15 puede investigarse usando protocolos técnicamente sencillos con un alto rendimiento. También puede examinarse la unión de mezclas de complejos o proteínas marcadas o no marcadas de sistemas recombinantes o lisados celulares. Una matriz de subunidades idénticas es adecuada para seleccionar grandes números de componentes de unión potencial y obtener información de unión detallada. Alternativamente, una matriz de proteínas diferentes, que representan subunidades de diferentes subtipos y especies, es la más adecuada para examinar la especificidad de unión de 20 ligandos.

Tales matrices pueden usarse para estudiar canales de iones, que incluye la clase de receptores de canales de iones dependientes de ligandos que existen como complejos de múltiples subunidades, que están constituidos por subunidades formadoras de canales, proteínas moduladoras y proteínas implicadas en la localización subcelular del canal. Las 25 interacciones entre subunidades de canales pueden medirse mediante dominios intracelulares definidos. Los canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje se ensamblan con subunidades  $\beta$  citoplasmáticas estructuralmente similares mediante dominios bien definidos dentro de la subunidad  $\alpha$  [7, 21, 22]. Estos pueden afectar la dependencia del canal en varias medidas y pueden alterar espectacularmente la eficiencia de la expresión de superficies de subunidades  $\alpha$  mediante mecanismos que pueden parecerse a o imitar la interacción de proteínas de membrana con chaperonas 30 moleculares auténticas [2].

Otra aplicación de las matrices de la invención está en el estudio de receptores, por ejemplo receptores acoplados a proteína G (GPCR). Estos constituyen la mayor familia de moléculas de la superficie de la célula implicadas en la transmisión de señales, con más de 1000 proteínas heptahelicoidales identificadas en el genoma humano. Los GPCR 35 transducen señales extracelulares mediante la activación de un subconjunto de proteínas G triméricas. Los sitios de unión pueden determinarse para componentes de proteínas GPCR-G específicos tales como rodopsina y la transducina de la proteína G de retina [23]. Sin embargo, los determinantes de unión de los GPCR no forman dominios diferenciados y es difícil predecir el subconjunto de proteínas G al que se unirá un receptor [24]. Sería sumamente ventajoso un procedimiento basado en matrices para determinar tales interacciones con el mayor número de GPCR huérfanos 40 actualmente en investigación. Los efectos de GPCR se modulan, por ejemplo, mediante interacciones y unión con cinasas de receptores acoplados a proteína G (GRK) y arrestinas, que conducen a disminución de la sensibilidad e internalización de receptores [25]. Se ha demostrado que la interacción con arrestina es suficientemente fuerte para detectarse mediante co-inmunoprecipitación [17] y puede inhibirse mediante péptidos sintéticos [26]. Como tal, es un diana potencial para la investigación usando un procedimiento de unión *in vitro*. 45

Otra aplicación de las matrices de la invención es en el estudio de proteínas transportadoras transmembrana. Estas proteínas controlan la captación selectiva de nutrientes y exportación de productos metabólicos, regulan el equilibrio de iones y solutos entre el exterior y el interior de las células y modulan la transmisión sináptica mediante la eliminación 50 de neurotransmisores de la hendidura sináptica. Un mecanismo regulador muy importante para estas proteínas implica la translocalización a y de membranas celulares. Sin embargo, la evidencia está revelando que también se produce la regulación mediante la interacción proteína-proteína con transportadores localizados en la membrana celular. Por ejemplo, la unión *in vitro* dependiente de la fosforilación entre la enzima transportadora IICB<sup>Glc</sup> de *E. coli* unida a la membrana y el represor Mlc global ha indicado un mecanismo de control transcripcional [27]. También se ha demostrado la unión de un dominio terminal en C del transportador de glucosa GLUT-1 a una proteína reguladora 55 transmembrana, estomatina, mediante cromatografía de afinidad en columna [28].

El término “matriz” como se define en este documento se refiere a una disposición espacialmente definida de uno o más restos de proteínas en un modelo sobre una superficie. Preferentemente, los restos de proteínas están unidos a la superficie bien directa o indirectamente. La unión puede ser no específica (por ejemplo mediante absorción física 60 sobre la superficie o mediante formación de una interacción covalente no específica). En una realización preferida, los restos de proteínas están unidos a la superficie mediante un resto marcador común ligado a cada proteína, por ejemplo como se describe en el documento WO01/57198.

Por tanto, por ejemplo, cada posición en el modelo puede contener una o más copias de:

65 a) una muestra de un único tipo de proteína (en forma de un monómero, dímero, trímero, tetrámero o multímero superior);

## ES 2 289 264 T3

b) una muestra de un único tipo de proteína unido a una molécula que interactúa (por ejemplo ADN, anticuerpo, otra proteína);

5 c) una muestra de un único tipo de proteína unido a una molécula sintética (por ejemplo péptido, compuesto químico); o

d) una mezcla heterómera de 2 o más proteínas de una familia de proteínas accesorias dada.

10 La superficie que soporta la matriz puede recubrirse/derivatizarse, por ejemplo, mediante tratamiento químico. Ejemplos de superficies adecuadas incluyen portaobjetos de vidrio, polipropileno o poliestireno, sílice, soporte de oro o metal o membranas hechas de, por ejemplo, nitrocelulosa, PVDF, nailon o fosfoquelosulosa. El formato de la matriz puede ser el de una placa de micropocillos o una micromatriz.

15 El uso de un formato de matrices de proteínas según la invención tiene muchas ventajas. Por ejemplo, una matriz de componentes de un montaje de proteínas de membrana, tal como subunidades auxiliares, proteínas asociadas y dominios de subunidades de canales, permite interacciones con componentes de unión en la fase de disolución que va a examinarse. Los parámetros de unión pueden determinarse con exactitud y los efectos de moduladores o inhibidores de unión pueden estudiarse de un modo sumamente paralelo.

20 Varias publicaciones recientes [por ejemplo la referencia 8] han mostrado que las matrices de proteínas funcionales permiten que los miembros individuales de una matriz puedan seleccionarse simultáneamente en condiciones idénticas. Esto permite experimentos sumamente paralelos y rápidos en comparación con otras técnicas, que conducen a resultados directamente comparables a través de muchas proteínas. Estas cualidades diferencian matrices de proteínas de otros ensayos para la función de proteínas, tal como Y2H e inmunoprecipitaciones/interacciones de proteínas, en los que la compartimentación celular que es implícita en estos otros procedimientos divide eficazmente cada grupo de proteínas en proteínas individuales y, por tanto, ensayos individuales.

30 Las matrices de proteínas según la invención pueden conservar la actividad funcional de proteínas cuando están específicamente inmovilizadas, permitiendo medir directamente la actividad biológica. Además, proporcionan un procedimiento directo para determinar el efecto de potenciales entidades inhibitoras en las interacciones observadas que no es posible de un modo comparable usando inmunoprecipitaciones y ensayos de interacción de proteínas.

35 Las matrices de proteínas según la invención pueden usarse para cuantificar constantes de unión ( $K_d$ ) para interacciones observadas y también permiten la concentración de un compuesto requerido para inhibir una interacción dada que va a medirse a través de la determinación de valores de  $CI_{50}$ .

40 Los resultados obtenidos a partir de la interrogación de matrices de la invención pueden ser cuantitativos (por ejemplo midiendo las constantes de unión o catalíticas  $K_D$  y  $K_M$ ), semicuantitativos (por ejemplo normalizando la cantidad unida frente a la cantidad de proteína) o cualitativos (por ejemplo funcional frente a no funcional). Mediante la cuantificación de las señales para duplicar matrices en las que el ligando se añade a varias concentraciones (por ejemplo, dos o más), pueden determinarse tanto las afinidades de unión como las concentraciones activas de proteína en el punto. Por ejemplo, los resultados cuantitativos  $K_D$  y  $B_{máx}$ , que describen la afinidad de la interacción entre el ligando y la proteína y el número de sitios de unión para ese ligando, respectivamente, pueden derivarse de los datos de la matriz de proteínas. Brevemente, las cantidades o cuantificadas o relativas de ligando unido a cada punto de proteína individual pueden medirse a diferentes concentraciones de ligando en la disolución de ensayo. Suponiendo una relación lineal entre la cantidad de proteína y ligando unido, la cantidad (relativa) de ligando unida a cada punto respecto a un intervalo de concentraciones de ligandos usadas en el ensayo puede ajustarse a la ecuación 1, reorganizaciones o derivaciones.

50 
$$\text{Ligando unido} = B_{máx} / ((K_D/[L]) + 1) \quad (\text{Ecuación 1})$$

[L] = concentración de ligando usada en el ensayo

55 Los inventores han producido una matriz funcional de proteínas accesorias de proteínas de membrana para proporcionar una herramienta para la rápida investigación de parámetros de unión y especificidad de ligandos. Los ligandos pueden ser otras proteínas, tales como dominios de unión de otras subunidades de proteínas de membrana, péptidos o potenciales compuestos terapéuticos para modular el montaje de complejos. La metodología proporciona la determinación de constantes de unión precisas en un formato sumamente paralelo.

60 La invención se describirá además mediante el siguiente ejemplo que se refiere a las siguientes figuras en las que:

65 La fig. 1 muestra inmunoensayos de lisados brutos de subunidades  $\beta$ . 10  $\mu$ l de lisado bruto y lisado purificado de cada uno de los clones que expresan subunidades  $\beta$  se realizaron usando SDS-PAGE. Los geles se transfirieron y las membranas se sondearon con estreptavidina (A) y anticuerpo anti-His (B). Se cargaron los carriles: 1 y 2  $\beta$ 1 humana, 3 y 4  $\beta$ 2 humana, 5 y 6  $\beta$ 3 humana, 7 y 8  $\beta$ 1 de rata, 9 y 10  $\beta$ 2 de rata, 11 y 12  $\beta$ 3 de rata. Carriles impares -lisado bruto, carriles pares - lisado purificado;

## ES 2 289 264 T3

la fig. 2 muestra SDS-PAGE de subunidades  $\beta$  de Kv purificadas. Los carriles 1 y 8 marcadores Mr, 2  $\beta 1$  humana, 3  $\beta 2$  humana, 4  $\beta 3$  humana, 5  $\beta 1$  de rata, 6  $\beta 2$  de rata, 7  $\beta 3$  de rata;

la fig. 3 muestra espectros de absorbancia UV-visible de subunidades  $\beta$  de Kv humanas y de rata purificadas. Leyenda: azul;  $\beta 1$  humana, rosa;  $\beta 2$  humana, amarillo;  $\beta 3$  humana, cian;  $\beta 1$  de rata, púrpura;  $\beta 2$  de rata, marrón;  $\beta 3$  de rata. La inserción muestra en más detalle el pico a 360 nm;

la fig. 4 muestra un ensayo de co-precipitación de la subunidad  $\beta$  de Kv. A; se añadieron lisados de la subunidad  $\beta$  de Kv a perlas anti-FLAG recubiertas de la subunidad  $\beta$  de Kv (carriles 7-12) y a perlas anti-FLAG sin recubrir (carriles 1-6). Después de la incubación durante 1 h, las perlas se lavaron y se llevaron a ebullición en tampón de muestra de SDS antes de realizarse SDS-PAGE. El gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa y las subunidades  $\beta$  de Kv biotiniladas se visualizaron usando un conjugado de estreptavidina-HRP. B; las bandas del inmunoensayo se cuantificaron y se representaron;

la fig. 5 muestra la inmovilización de subunidades  $\beta$  de Kv en placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Los lisados de subunidades  $\beta$  de Kv (concentración original de aproximadamente 3,5 mg/ml) se diluyeron en series y se añadieron a pocillos de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Después del lavado para eliminar la proteína sin unir, las subunidades  $\beta$  de Kv se cuantificaron usando un anticuerpo anti-His marcado con Cy3. El anticuerpo unido se cuantificó mediante fluorometría en un lector de placa de microtitulación de fusión Packard equipado con filtros de excitación y emisión a 550 y 570 nm, respectivamente;

la fig. 6 muestra de unión de dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv a la matriz de placas de microtitulación de subunidades  $\beta$  de Kv. El lisado dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  bruto diluido se añadió a cada pocillo de una matriz de placas de microtitulación de subunidades  $\beta$  de Kv. Después de la incubación, los pocillos se lavaron para eliminar el dominio T1 no unido de las subunidades  $\alpha$  de Kv. El dominio T1 restante de las subunidades  $\alpha$  de Kv unido se midió usando la marca FLAG y anticuerpos anti-FLAG y se visualizó usando un anticuerpo secundario conjugado a HRP y sustrato colorimétrico;

la fig. 7 muestra las curvas de unión para el péptido SPL2 a la matriz de subunidades  $\beta$  de Kv. El péptido SPL2 se unió a la matriz de subunidades  $\beta$  de Kv. Después de lavar la cantidad restante unida a la matriz se cuantificó mediante fluorometría. Los datos se han ajustado a curvas de unión. Triángulos azules;  $\beta 1$  de Kv de rata, cuadrados negros;  $\beta 2$  de Kv de rata, cuadrados rosas abiertos;  $\beta 3$  de Kv de rata, estrellas rojas;  $\beta 1$  de Kv humana, círculos verdes;  $\beta 2$  de Kv humana, círculos cian abiertos;  $\beta 3$  de Kv humana;

la fig. 8 muestra la inhibición de la unión del péptido a la matriz de subunidades  $\beta$  de Kv mediante el dominio T1 de las subunidades  $\beta$  de Kv. El péptido SPL2 se añadió a aproximadamente  $K_d$  a pocillos de matriz de subunidades  $\beta$  de Kv en presencia y ausencia del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv purificado. Después de lavar, el péptido SPL2 unido se cuantificó mediante fluorometría;

la fig. 9 muestra la detección de anticuerpos de subunidades  $\beta$  de Kv en micromatrices. Todas las subunidades  $\beta$  de Kv podrían detectarse usando anticuerpo anti-His marcado con Cy3.

la fig. 10 muestra el dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv unido a subunidades  $\beta$  de Kv en micromatrices. Una micromatriz de subunidades  $\beta$  de Kv se incubó con lisado del dominio T1 de las subunidades  $\beta$  de Kv. Después de lavar el dominio T1 de las subunidades  $\beta$  de Kv unido a la subunidad  $\beta$  podría detectarse usando un anticuerpo anti-FLAG e IgG anti-ratón marcada con Cy3.

### Ejemplo 1

Los canales de potasio (Kv) dependientes del voltaje se reconocen como dianas terapéuticas en muchos trastornos que incluyen aquellos del SNC, corazón, pulmones y vejiga. Por tanto, son importantes dianas terapéuticas y comerciales. Están constituidos por un conjunto tetrámero de subunidades  $\alpha$  que tienen seis dominios que atraviesan la membrana y se acoplan a un montaje de subunidades  $\beta$  reguladoras citoplasmáticas.

Hasta la fecha, la clonación molecular ha identificado al menos 23 productos génicos diferentes que codifican subunidades  $\alpha$  de canales Kv. Además, la diversificación que resulta del corte y empalme alternativo se ha demostrado para varias subunidades  $\alpha$ . Cuatro familias de subunidades Kv formadoras de canales, Kv1 a Kv4, se derivan de los canales de potasio de *Drosophila*, Shaker, Shab, Shaw y Shal, respectivamente. Cada uno de estos tipos de canales tiene múltiples miembros de subfamilias. Se han identificado otras cuatro familias de canales Kv, Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales solos. Sin embargo, pueden combinarse con las subunidades formadoras de canales para formar canales funcionales con propiedades biofísicas alteradas. Al menos dos de estas familias de subunidades  $\alpha$  auxiliares (Kv6 y Kv9) tienen múltiples miembros de subfamilias.

Además de la diversidad molecular proporcionada por la tetramerización homomérica y heteromérica de las subunidades  $\alpha$  de canales Kv, las subunidades  $\beta$  citoplasmáticas pueden unirse al complejo de canales y modular la cinética de los canales o la expresión de la superficie de la célula. Hasta la fecha se han identificado tres familias,  $\beta 1$  de Kv a  $\beta 3$  de Kv, con 3 variantes de corte y empalme observadas del gen Kv $\beta 1$ . El complejo de subunidades  $\beta$  se une a

## ES 2 289 264 T3

una región del extremo N de la subunidad  $\alpha$  conocida como el dominio T1 y la presencia de la subunidad aumenta la expresión de la superficie de la célula del canal de iones. También se ha establecido otro papel adicional para las subunidades  $\beta 1$  de Kv en la modulación de la cinética dependiente de canales.

### 5 *Matriz de subunidades $\beta$ de Kv*

*Materiales y Procedimientos para la construcción de matriz de subunidades  $\beta$  de Kv*

#### *Clonación de ADNc de subunidades $\beta$ de Ky marcadas con His y biotina*

10 Los ADNc de dominios centrales de subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  de Kv de rata y humanas se ligaron en un vector de expresión de *E. coli* aguas debajo de la secuencia que codifica una marca de polihistidina y el dominio BCCP del gen AccB de *E. coli*. La mezcla de ligadura se transformó en células químicamente competentes XL10-Gold (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de ADNc de la subunidad  $\beta$  de Ky se comprobó mediante secuenciación y se encontró que se correspondía con la secuencia de proteína esperada - véase el apéndice.

#### *Expresión de subunidades $\beta$ de Ky en *E. coli**

20 Las colonias de células XL10-Gold que contienen plásmidos de las subunidades  $\beta$  de Ky se inocularon en 5 ml de medio LB que contenía ampicilina en tubos de 20 ml y se hicieron crecer durante toda la noche a 37°C en un incubador con agitación. Se usaron 2 ml de cultivo durante toda la noche para inocular otros 200 ml de LB/ampicilina en matraces de 500 ml y se hicieron crecer a 37°C hasta que se alcanzó una DO600 de ~1,0. Entonces se añadió IPTG y biotina a concentraciones finales de 1 mM y 50  $\mu$ M respectivamente y la inducción continuó a 23°C durante 4 horas.

25 A continuación se recogieron las células mediante centrifugación, los pellets de células se lavaron en PBS x 3 y se almacenaron en alícuotas a -80°C.

#### *Lisis de *E. coli* que contiene subunidades $\beta$ de Ky*

30 Los pellets de células se descongelaron en hielo y se añadieron 400  $\mu$ l de tampón de lisis (PBS que contiene 0,1% de Tween 20, 1 mg/ml de lisozima y 1  $\mu$ g/ml de ADNsa I) y las células se volvieron a suspender mediante pipeteo. La lisis se ayudó mediante la incubación en un agitador de balanceo a temperatura ambiente durante 30 min antes de recogerse los residuos celulares mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante purificado de proteína soluble se extrajo y se usó inmediatamente.

#### *Purificación de subunidades $\beta$ de Ky*

35 Las subunidades  $\beta$  de Ky se purificaron usando la marca de hexahistidina. Se añadieron los lisados purificados diluidos en PBS que contenían imidazol 50 mM a una columna que contenía resina de afinidad Talon Cobalt (Clontech). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón y la proteína se eluyó en 2 volúmenes de columna de PBS que contenían imidazol 300 mM.

#### *SDS-PAGE*

45 Las muestras de proteína se llevaron a ebullición en tampón que contenía SDS durante 5 min antes de cargarlas en geles tris-glicina al 4-20% (NOVEX) y realizarse a 200 V durante 45 min. A continuación, los geles se usaron para inmunotransferencia de Western o la proteína se tiñó directamente con colorante azul brillante de Coomassie.

#### 50 *Inmunotransferencia de Western*

La proteína se transfirió sobre membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham) y se exploró para determinar la presencia de diversos epítomos usando técnicas habituales. Para la detección de la marca de histidina, las membranas se bloquearon en Marvel al 5%/PBST y se usó anticuerpo anti-RGSHis (QIAGEN) como anticuerpo primario a una dilución 1/1000. Para la detección de la marca de biotina, las membranas se bloquearon en Superblock/TBS (Pierce) y se probaron con conjugado estreptavidina/HRP (Amersham) a una dilución 1/2000 en Superblock/TBS/Tween20 al 0,1%. El anticuerpo secundario para el anticuerpo RGSHis fue conjugado de HRP (Sigma) de IgG anti-ratón (Fc específico) usado a una dilución 1/2000 en Marvel/PBST. Después de lavado exhaustivo, los conjugados de HRP unidos se detectaron usando o ECLPlus (Amersham) y Hyperfilm ECL (Amersham) o mediante tinción con DAB (Pierce).

#### *Espectros*

65 Los espectros de UV-vis (250-500 nm) de subunidades  $\beta$  de Ky se registraron usando un espectrofotómetro de barrido Termo Spectronic. Las proteínas se diluyeron en tampón de elución y el tampón de elución solo se usó para tomar el nivel inicial que se resta de todas las muestras.

## ES 2 289 264 T3

### *Ensayo de interacción del dominio T1 de las subunidades $\alpha$*

El ADNc para el dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  (aminoácidos 33 - 135) se clonó aguas abajo a partir de secuencias que codifican para una marca de His y una marca FLAG en un vector de expresión de *E. coli*. Los plásmidos se comprobaron mediante secuenciación para la secuencia correcta y la inducción de los cultivos de *E. coli* mostró la expresión de una proteína soluble marcada con His y FLAG del tamaño deseado. Para explorar la interacción entre el dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  y las subunidades  $\beta$  de Ky, las reacciones de unión se montaron conteniendo 10  $\mu$ l de lisados purificados de subunidades  $\beta$  de Ky, 10  $\mu$ l de agarosa anti-FLAG en presencia y ausencia de 10  $\mu$ l de lisado purificado del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$ , en 500  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato que contenía NaCl 300 mM, Tween 20 al 0,1% y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino. Las reacciones se incubaron en un agitador de balanceo a temperatura ambiente durante 1 hora y los complejos unidos a FLAG se recogieron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 2 min. Después de lavado exhaustivo en PBST, los complejos unidos a FLAG se desnaturalizaron en tampón de muestra de SDS y se sometieron a inmunoensayo. La presencia de subunidades  $\beta$  de Ky biotiniladas se detectaron mediante el conjugado estreptavidina/HRP.

### *Fabricación de matrices de placas de microtitulación de subunidades $\beta$ de Ky*

Se añadieron 100  $\mu$ l de concentraciones optimizadas de lisados purificados de subunidades  $\beta$  de Ky (normalmente 1 en 16 diluciones en PBS-Tween) en cada pocillo a placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina. Las placas se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 45 min antes de lavar cada pocillo 3 veces con 300  $\mu$ l de PBS-Tween. Después, las placas se usaron en ensayos o se almacenaron a -20°C en presencia de glicerina al 50% (v/v) en PBS-Tween.

### *Ensayo de unión de péptidos de matrices de subunidades $\beta$ de Ky*

El péptido que interactúa con la subunidad  $\beta$  de Ky(SPL2) basado en una parte del dominio de las subunidades  $\alpha$  se diseñó, se sintetizó y se marcó con fluoresceína. El péptido SPL2 apropiadamente diluido en PBS-Tween que contenía 0,1% p/v de BSA se añadió a 100  $\mu$ l/pocillo a la placa de microtitulación recubierta con subunidades  $\beta$  de Ky. El péptido se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación antes de eliminar el péptido sin unir lavando 3 veces en 300  $\mu$ l de PBS-Tween. Se añadieron 100  $\mu$ l de guanidina HCl 6 M a cada pocillo antes de la evaluación de la concentración de péptido SPL2 marcado con fluoresceína en cada pocillo. La fluorescencia de cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos se leyó en un lector de placas de microtitulación de fusión Packard equipado con filtros de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente.

### *Ensayo de interacción del dominio T1 de las subunidades $\alpha$ de Kv de matrices de subunidades $\beta$ de Ky*

El lisado purificado del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv diluido 1 en 10 en PBS-Tween que contenía 0,1% p/v de BSA se añadió a 100  $\mu$ l/pocillos a la placa de microtitulación recubierta con subunidades  $\beta$  de Ky. El péptido se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación antes de eliminarse el dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  no unido lavando 3 veces en 300  $\mu$ l de PBS-Tween. El dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  unido se estimó usando conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón apropiadamente diluido y HRP de anticuerpo secundario de IgG anti-ratón usando procedimientos de ELISA habituales. La HRP se detectó mediante la adición del sustrato de HRP colorimétrico ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y las placas de microtitulación se leyeron en un lector de placas de microtitulación de fusión Packard equipado con un filtro de absorbancia de 405 nm.

### *Fabricación de micromatrices de subunidades $\beta$ de Ky*

Los lisados purificados de subunidades  $\beta$  de Ky se cargaron en una placa de 384 pocillos y se imprimieron sobre portaobjetos de microscopio de vidrio con una neutravidina inmovilizada sobre recubrimiento de dextrano (Xantec) usando un robot para micromatrices Qarray (Genetix, RU) con un cabezal para micromatrices de 4 contactos. Cada lisado se depositó 16 veces sobre cada matriz. Después de la impresión, las matrices se incubaron en una cámara húmeda a 4°C durante 1 h antes de lavarse en PBS-Tween. Después del lavado, las matrices estaban listas para ensayarse.

### *Detección de anticuerpos de subunidades $\beta$ de Ky en micromatrices*

El anticuerpo anti-His marcado con Cy3 se diluyó a 1  $\mu$ g/ml en PBS-Tween + 0,1% (p/v) de BSA y se pipetearon aproximadamente 500  $\mu$ l sobre el portaobjetos. El portaobjetos se incubó a temperatura ambiente con una agitación muy ligera durante 1 h, después se lavó 2 x 2 min en un gran volumen de PBS-Tween. Los portaobjetos se centrifugaron brevemente a 2000 g para eliminar el líquido antes de escanearlos en un escáner de micromatrices (Affymetrix, escáner de 428 matrices) equipado con filtros láser de excitación y emisión apropiados para la detección del fluoróforo Cy3.

### *Unión del dominio T1 de las subunidades $\alpha$ de Kv a subunidades $\beta$ de Kv en micromatrices*

El lisado purificado del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv se diluyó 1 en 50 en PBS-Tween que contenía 1% p/v de BSA y se pipetearon aproximadamente 500  $\mu$ l sobre el portaobjetos. El portaobjetos se incubó a temperatura

ambiente con una agitación muy ligera durante 1 h, después se lavó 2 x 2 min en un gran volumen de PBS-Tween. A continuación, el anticuerpo anti-FLAG apropiadamente diluido se pipeteó sobre la matriz y se incubó y lavó como anteriormente antes de la adición de IgG de ratón marcada con Cy3. Los portaobjetos se incubaron y se lavaron como anteriormente antes de centrifugar brevemente a 2000 g para eliminar el líquido antes de escanearlos en un escáner de micromatrices (Affymetrix, escáner de 428 matrices) equipado con filtros láser de excitación y emisión apropiados para la detección del fluoróforo Cy3.

### Resultados

#### 10 *Expresión de subunidades de $\beta$ de Ky en *E. coli**

Los dominios centrales de las subunidades  $\beta$  de Ky se clonaron aguas abajo del promotor tac en el vector pQE80 dentro del que ya se había clonado el dominio BCCP del ACCB de *E. coli*. A continuación, la proteína resultante se marcaría con His y biotina en su extremo N-terminal. La figura 1 muestra el análisis de inmunoensayo de la proteína total y soluble de cultivos de *E. coli* inducidos. Para todas las subunidades  $\beta$  hay bandas claras para proteína marcada con His y biotinilada con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Las bandas del mismo tamaño se detectan mediante un anticuerpo policlonal llevado a  $\beta$ 2 de Kv humana (Biosource) que reacciona de manera cruzada con todas las subunidades  $\beta$  usadas (no se muestran los datos).

20 Aunque las marcas de His y biotina se han usado en esta matriz, podrían usarse otras marcas de afinidad (por ejemplo FLAG, myc, VSV) para posibilitar la purificación, detección e inmovilización de las proteínas clonadas. Por tanto, si se requiere, puede usarse un huésped de expresión distinto de *E. coli* (por ejemplo levadura, células de insectos, células de mamíferos).

#### 25 *Purificación de subunidades $\beta$ de Ky*

Las proteínas pueden purificarse antes de formar matrices usando una marca de afinidad. En este documento se ha hecho uso de esta marca de his purificando la proteína en resina Talon. La figura 2 muestra que las subunidades  $\beta$  de Kv purificadas de este modo sólo muestran bandas en SDS-PAGE que se corresponden con la subunidad  $\beta$  de Kv, o productos de proteólisis.

#### *Espectros de absorbancia de UV-Vis*

35 Los espectros de UV-Vis se obtuvieron para todas las subunidades  $\beta$  de Kv humanas y de rata. La figura 3 muestra que ambas subunidades  $\beta$ 2 de Kv humanas y de rata contienen un cofactor NAD(P)H como se demuestra por sus picos de absorbancia a 360 nm.

#### *Ensayo de interacción del dominio T1 de las subunidades $\alpha$*

40 Para confirmar que las subunidades  $\beta$  de Kv expresadas han conservado la función nativa se ideó un ensayo en el que las subunidades  $\beta$  de Kv se precipitarían mediante la unión a perlas recubiertas del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$ . A las perlas anti-FLAG se añadieron lisados del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv marcadas con FLAG. A continuación se mezclaron con lisados que contenían las subunidades  $\beta$  de Kv. La figura 4 muestra que, aunque la unión no específica de subunidades  $\beta$  de Kv a perlas anti-FLAG fue alta, aumentó la unión en presencia del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv. Por tanto, puede observarse que la subunidad  $\beta$ 3 de Kv se ha unido a las perlas recubiertas con el dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv en mayores cantidades que cualquier otra subunidad  $\beta$  de Kv.

#### *Fabricación de matrices de placas de microtitulación de las subunidades $\beta$ de Kv*

50 Para confirmar que las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina pueden recubrirse con subunidades  $\beta$  de Kv, los lisados se diluyeron en serie y se añadieron a pocillos de placas. La figura 5 muestra que pueden alcanzarse niveles similares de proteína específicamente inmovilizada por pocillo.

#### 55 *Ensayo de interacción del dominio T1 de las subunidades $\alpha$ de Kv de matrices de subunidades $\beta$ de Ky*

La figura 6 demuestra la unión específica del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv a todas las subunidades  $\beta$  de Ky. También puede observarse que la subunidad  $\beta$ 3 de Kv ha unido mucho más dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv, reflejando los resultados del ensayo de co-precipitación.

#### 60 *Ensayo de unión de péptidos de matriz de subunidades $\beta$ de Ky*

Se añadió péptido SPL2 a una matriz de placas de microtitulación de subunidades  $\beta$  de Ky en un intervalo de concentraciones de 100 a 1600  $\mu$ M. Después de la incubación durante 1 h, los pocillos se lavaron para eliminar el péptido sin unir. El péptido restante se cuantificó mediante fluorometría. Los resultados (mostrados en la fig. 7) proporcionan ajustes a los datos, permitiendo estimaciones de  $K_d$  y  $B_{m\acute{a}x}$  para cada una de las subunidades  $\beta$  de Ky (tabla 1).

## ES 2 289 264 T3

TABLA 1

*Cálculos aproximados de  $K_d$  y  $B_{m\acute{a}x}$  para cada una de las subunidades  $\beta$  de Ky. Los datos en la figura 7 se ajustaron a las curvas de unión usando un software de ajuste de curvas*

Subunidad beta	$K_d$ ( $\mu$ M)
R1	189,6
R2	196,6
R3	54,6
H1	225,8
H2	184,1
H3	116,4

*Inhibición de unión del péptido a matriz de subunidades  $\beta$  de Ky mediante dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv*

La unión del péptido SPL2 a la matriz de subunidades  $\beta$  de Ky se inhibió en presencia del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv. En la figura 8 puede verse que para las subunidades  $\beta$ 1 y 2 de Ky de rata se reduce la unión de péptidos.

*Detección de anticuerpos de subunidades  $\beta$  de Ky en micromatrices*

Se muestra que las subunidades  $\beta$  de Ky en micromatrices están específicamente inmovilizadas sobre portaobjetos de microscopio de vidrio recubiertos con estreptavidina. En la figura 9 puede observarse que la inclusión de biotina libre en la disolución de deposición inhibe completamente la inmovilización de  $\beta$ 3 de Kv. Todas las subunidades  $\beta$  de Kv están presentes sobre la matriz, por tanto la inmovilización de la marca de BCCP está presente sobre la matriz.

*Unión del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv a subunidades  $\beta$  de Kv en micromatrices*

Las subunidades  $\beta$  de Kv inmovilizadas sobre una matriz todavía pueden unirse al dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv. La figura 10 muestra que el dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv puede detectarse después de la unión a subunidades  $\beta$  de Kv inmovilizadas. De la figura 10 también puede verse que la marca de afinidad inmovilizada tiene una pequeña unión del dominio T1 de las subunidades  $\alpha$  de Kv.

### Bibliografía

1. **Jan L Y y Jan Y N** (1997) Receptor-regulated ion channels. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 155-60
2. **Trimmer, J. S.** (1998) Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 370-374.
3. **Perez-García, M T y col.,** (1995) Functional properties of cardiac L-type calcium channels transiently expressed in HEK293 cells. Roles of alpha 1 and beta subunits. *J. Gen. Physiol.* 105, 289-305.
4. **Brady A E, Limbird L E.** (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal* 14(4):297-309.
5. **Ruiz-Velasco V, Ikeda S R, Puhl H L.** (2002) Cloning, tissue distribution, and functional expression of the human G protein {beta}4-subunit. *Physiol Genomics* 8(1):41-50.
6. **Walker, D y col.** (1998) A b4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1A subunit. *J. Biol. Chem.,* 273, 2361-2367.
7. **Xu y Li,** (1998) Auxiliary Subunits of Shaker-type potassium channels. *Trends. Cardiovasc. Med.,* 8, 229-234.
8. **Zhu H, Klemic J F, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic K G, Smith D, Gerstein M, Reed M A, Snyder M.** Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* (2000) 26(3):283-9.
9. **Dolly, J O y Parcej, D N** (1996) Molecular properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Bioenerg. Biomembr.,* 28, 231-253.

## ES 2 289 264 T3

10. **Scott**, V E y col., (1990) Alpha-dendrotoxin acceptor from bovine brain is a K<sup>+</sup> channel protein. Evidence from the N-terminal sequence of its larger subunit. *J. Biol. Chem.*, 265, 20094-20097.
- 5 11. **Wang**, Z y col., (1996) Comparison of Binding and Block Produced by Alternatively Spliced Kv $\beta$ 1 Subunits. *J. Biol. Chem.*, 271, 28311-28317.
12. **Restituto**, S y col., (2001) Ca<sup>2+</sup> Channel Inactivation Heterogeneity Reveals Physiological Unbinding of Auxiliary Subunits. *Biophys. J.* 81, 89-96.
- 10 13. **Strader**, C D y col. (1994) Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 101-132.
14. **Strader**, C D y col. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.*, 9, 745-754.
- 15 15. **Tucker**, S. J. y **Ashcroft**, F. M. (1999) Mapping of the physical interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2. *J. Biol. Chem.*, 274, 33393-33397.
16. **Yokoyama**, C T y col. (1997) Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J. Neurosci.*, 17, 6929-6938.
- 20 17. **Gelber**, E y col., (1999) Structure and function of the third intracellular loop of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor: The third intracellular loop is  $\alpha$ -helical and binds purified arrestins.
18. **Weixel**, K M y **Bradbury**, N A (2001)  $\mu$ 2 Binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, 46251-46259.
- 25 19. **Tu**, J C y col. (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP<sub>3</sub> receptors. *Neuron*, 21, 717-726.
- 30 20. **Shieh**, B-H y **Zhu**, M-Y (1996) Regulation of the TRP Ca<sup>+</sup> channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 16, 991-998.
21. **Pongs**, O., **Leicher**, T., **Berger**, M. y col. (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunits.
- 35 22. **Walker**, D. y **Waard**, M: (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function.
23. **Onrust**, R, **Herzmark**, P y col. (1997) Receptor and  $\beta\gamma$  binding sites in the  $\alpha$  subunit of the retinal G-protein transducin. *Science*, 275, 381-384.
- 40 24. **Bourne**, H R (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9, 134-142.
25. **Ferguson**, S S G (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.*, 53, 1-24.
- 45 26. **Krupnick**, J G y col., (1994) Arrestin-rhodopsin interaction. Multi-site binding delineated by peptide inhibition. *J. Biol Chem.* 269, 3226-3232.
- 50 27. **Nam**, T-W y col., (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICBGlc recruits the global repressor Mlc. *EMBO J.*, 20, 491-498.
28. **Zhang**, J-Z y col., (2001) Overexpression of stomatin depresses GLUT-1 glucose transporter activity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 280, C1277-C1283.
- 55
- 60
- 65

## Apéndice 1

*Dominio central de la subunidad  $\beta 1$  de Kv humana de la secuencia de proteínas (residuos 87- 419):*

5 GTGMKYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTFGGQISDEVAERLMTIAYESG  
 VNLFDTAEVYAAGKAEVILGSIKKKKGWRRSSLVITTKLYWGGKAETE  
 RGLSRKHIEGLKGS LQRLQLEYVDVVFANRPDSNTPMEEIVRAMTHVI  
 10 NQGMAMYWGTSRWSAMEIMEAYSVARQFNMIPPVCEQAEYHLFQRE  
 KVEVQLPELYHKIGVGAMTWSPLACGIISGKYGNGVPSSRASLKYQ  
 WLKERIVSEGRKQQNKLDLSPIAERLGCTLPQLAVAWCLRNEGVSS  
 15 VLLGSSTPEQLIENLGAIQVLPKMTSHVVNEIDNILRNKPYSKKDYRS

*Dominio central de la subunidad  $\beta 2$  de Kv humana de la secuencia de proteínas (residuos 36- 364):*

20 GLQFYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTFGGQITDEMAEQMLMTLAYDNIGI  
 NLFDTAEVYAAGKAEVVLGNIKKKKGWRRSSLVITTKIFWGGKAETER  
 GLSRKHIEGLKASLERLQLEYVDVVFANRPDPNTPMEETVRAMTHVIN  
 QGMAMYWGTSRWSSMEIMEAYSVARQFNLTTPICEQAEYHMFQREK  
 25 VEVQLPELFHKIGVGAMTWSPLACGIVSGKYDSGIPPYSRASLKYQW  
 LKDKILSEGRRQQAKLKEQLQAIAERLGCTLPQLAIAWCLRNEGVSSVL  
 LGASNADQLMENIGAIQVLPKLSSSIHEIDSILGNKPYSKKDYRS

*Dominio central de la subunidad  $\beta 3$  de Kv humana de la secuencia de proteínas (residuos 75- 404):*

30 GLQFYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTFGGQITDEMAEQMLMTLAYDNIGI  
 NLFDTAEVYAAGKAEVVLGNIKKKKGWRRSSLVITTKIFWGGKAETER  
 35 GLSRKHIEGLKASLERLQLEYVDVVFANRPDPNTPMEETVRAMTHVIN  
 QGMAMYWGTSRWSSMEIMEAYSVARQFNLTTPICEQAEYHMFQREK  
 VEVQLPELFHKIGVGAMTWSPLACGIVSGKYDSGIPPYSRASLKYQW  
 40 LKDKILSEGRRQQAKLKEQLQAIAERLGCTLPQLAIAWCLRNEGVSSVL  
 LGASNADQLMENIGAIQVLPKLSSSIHEIDSILGNKPYSKKDYRS

*Dominio central de la subunidad  $\beta 1$  de Kv de rata de la secuencia de proteínas:*

45 GTGMKYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTFGGQISDEVAERLMTIAYESG  
 VNLFDTAEVYAAGKAEVILGSIKKKKGWRRSSLVITTKLYWGGKAETE  
 RGLSRKHIEGLKGS LQRLQLEYVDVVFANRPDSNTPMEEIVRAMTHVI  
 50 NQGMAMYWGTSRWSAMEIMEAYSVARQFNMIPPVCEQAEYHLFQRE  
 KVEVQLPELYHKIGVGAMTWSPLACGIISGKYGNGVPSSRASLKYQ  
 WLKERIVSEGRKQQNKLDLSPIAERLGCTLPQLAVAWCLRNEGVSS  
 55 VLLGSSTPEQLIENLGAIQVLPKMTSHVVNEIDNILRNKPYSKKDYRS

*Dominio central de la subunidad  $\beta 2$  de Kv de rata de la secuencia de proteínas:*

60 GLQFYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTFGGQITDEMAEHLMTLAYDNIGI  
 NLFDTAEVYAAGKAEVVLGNIKKKKGWRRSSLVITTKIFWGGKAETER  
 GLSRKHIEGLKASLERLQLEYVDVVFANRPDPNTPMEETVRAMTHVIN  
 OGMAMYWGTSRWSSMEIMEAYSVARQFNLTTPICEQAEYHMFQREK  
 65 EVQLPELFHKIGVGAMTWSPLACGIVSGKYDSGIPPYSRASLKYQWL  
 KDKILSEGRRQQAKLKEQLQAIAERLGCTLPQLAIAWCLRNEGVSSVLL  
 GASNAEQLMENIGAIQVLPKLSSSIIVHEIDSILGNKPYSKKDYRS

ES 2 289 264 T3

*Dominio central de la subunidad  $\beta 3$  de Kv de rata de la secuencia de proteínas (residuos 75- 404):*

**GTGMKYRNLGKSGLRVSCGLGTWVTFGSQISDETAEDLLTVAYEHG  
VNLFDTAEVYAAGKAERTLGNILKSKGWRRSSYVITTKIFWGGQAETE  
RGLSRKHIEGLQGSLDRLQLEYVDIVFANRSDPSSPMEEIVRAMTYVIN  
QGLALYWGTSRWSAAEIMEAYSMARQFNLIPPVCEQAENHFFQREKV  
EMQLPELYHKIGVGSVTWSPLACSLITSKYDGQVPDACKATVKGYQW  
LKEKVQSEDGKKQARVTDLLPIAHQLGCTVAQLAIAWCLRSEGVSSV  
LLGVSSAEQLMEHLGSLQVLGQLTPQTVMEIDALLGNKSHSKK**

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Una matriz que comprende una superficie que tiene unida a la misma al menos una proteína accesoria citosólica de una proteína de membrana seleccionada de canales de iones, receptores acoplados a proteína G y proteínas transportadoras transmembrana, en la que dicha proteína accesoria citosólica está libre de componentes de proteínas de membrana u otras subunidades de dicho canal de iones, receptor acoplado a proteína G o complejo de proteínas transportadoras transmembrana.
2. Una matriz según la reivindicación 1, que comprende una pluralidad de proteínas accesorias citosólicas seleccionadas de subunidades de canales de iones, proteínas accesorias citosólicas de receptores acoplados a proteína G, proteínas accesorias citosólicas de transportadores transmembrana, subunidades  $\beta$  de canales de  $K^+$ , subunidades  $\beta$  de canales  $Ca^{2+}$ , subtipos de proteína G, subunidades  $\beta$  de canales Kv, subunidades  $\beta$  de canales de calcio, familia Gs, familia Gt, familia Gi, familia Gi-0, familia Gq-11, familia sensorial de  $G\alpha$  y proteínas de la familia  $\beta\gamma$ .
3. Una matriz según la reivindicación 1, que comprende una pluralidad de proteínas accesorias citosólicas que son idénticas y se seleccionan de subunidades de canales de iones, proteínas accesorias citosólicas de receptores acoplados a proteína G, proteínas accesorias citosólicas de transportadores transmembrana, subunidades  $\beta$  de canales de  $K^+$ , subunidades  $\beta$  de canales de  $Ca^{2+}$ , subtipos de proteína G, subunidades  $\beta$  de canales Kv, subunidades  $\beta$  de canales de calcio, familia Gs, familia Gt, familia Gi, familia Gi-0, familia Gq-11, familia sensorial de  $G\alpha$  y proteínas de la familia  $\beta\gamma$ .
4. Una matriz según la reivindicación 2 ó 3, en la que la matriz comprende al menos una subunidad  $\beta$  de canales de  $K^+$  seleccionada de:  $\beta 1.1$ ,  $\beta 1.2$ ,  $\beta 1.3$ ,  $\beta 2.1$ ,  $\beta 2.2$ ,  $\beta 3.1$ ,  $\beta 3.2$  y  $\beta 4$ .
5. Una matriz según la reivindicación 2 ó 3, en la que la matriz comprende al menos una subunidad  $\beta$  de canales de calcio seleccionada de:  $\beta 1a$ ,  $\beta 1b$ ,  $\beta 1c$ ,  $\beta 2a$ ,  $\beta 2b$ ,  $\beta 2c$ ,  $\beta 3a$ ,  $\beta 3b$  y  $\beta 4$ .
6. Una matriz según cualquier reivindicación precedente, en la que la proteína accesoria citosólica es un dominio de subunidades de canales de iones.
7. Una matriz según cualquier reivindicación precedente, en la que las subunidades de las proteínas accesorias citosólicas se proporcionan como constructos de proteínas marcadas.
8. Una matriz según la reivindicación 7, en la que el constructo de proteína marcada comprende una marca de afinidad.
9. Una matriz según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que la marca es una marca de His, biotina, FLAG, myc o VSV.
10. Una matriz según cualquier reivindicación precedente, en la que los restos de proteínas están unidos a la superficie mediante un resto marcador común.
11. Una matriz según cualquier reivindicación precedente, en la que cada posición en la matriz contiene una o más copias de un único tipo de proteína en forma de un monómero, dímero, trímero, tetrámero o multímero superior.
12. Un procedimiento para determinar qué proteínas citosólicas interactúan con una proteína de membrana dada, o viceversa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (i) proporcionar una matriz de proteínas accesorias citosólicas según cualquier reivindicación precedente;
  - (ii) poner en contacto la matriz con fragmentos citosólicos de dicha proteína de membrana y/o fragmentos citosólicos de otros miembros de familias de proteínas de membrana relacionados; y
  - (iii) detectar e identificar los componentes que interactúan.
13. Un procedimiento para seleccionar compuestos o péptidos o proteínas respecto a la capacidad para interactuar selectivamente con una proteína citosólica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (i) proporcionar una matriz según cualquiera de las reivindicaciones 1-11;
  - (ii) poner en contacto la matriz con compuestos o péptidos o proteínas candidatos; y
  - (iii) identificar los componentes que interactúan.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, que comprende además la etapa de cuantificar la interacción de los componentes que interactúan midiendo las constantes de unión o catalíticas  $K_D$  o  $K_M$ , o normalizando la cantidad unida frente a la cantidad de proteína.

## ES 2 289 264 T3

15. Un procedimiento para seleccionar compuestos o péptidos o proteínas respecto a la capacidad para modular selectivamente la interacción entre una proteína citosólica y una proteína de membrana, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5 (i) proporcionar una matriz según cualquiera de las reivindicaciones 1-11;
- (ii) poner en contacto la matriz con compuestos o péptidos o proteínas candidatas y con una o más proteínas de membrana o fragmentos citosólicos de las mismas, o simultáneamente o sucesivamente; y
- 10 (iii) determinar si dicha interacción está modulada por la presencia de dichos compuestos o péptidos o proteínas.

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, en el que el fragmento citosólico de una proteína de membrana es un dominio funcional soluble.

15 17. Un procedimiento según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, que comprende además la etapa de cuantificar el grado de modulación de la interacción midiendo las constantes de unión o catalíticas  $K_D$  o  $K_M$ , o normalizando la cantidad unida frente a la cantidad de proteína.

20 18. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en el que la concentración de un compuesto requerido para inhibir una interacción dada se mide determinando el valor de  $CI_{50}$ .

19. El uso de una matriz de proteínas accesorias citosólicas según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para medir la actividad catalítica relativa de diferentes miembros de una familia de dichas proteínas accesorias citosólicas.

25 20. El uso de una matriz de proteínas accesorias citosólicas según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 como una superficie de afinidad sobre la que seleccionar anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos ligados a fenotipos-genotipos (por ejemplo anticuerpos expresados en fagos).

30 21. El uso de una matriz de proteínas accesorias citosólicas según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para determinar el efecto de modificaciones post-translacionales en las interacciones de proteínas accesorias con proteínas de membrana.

35

40

45

50

55

60

65

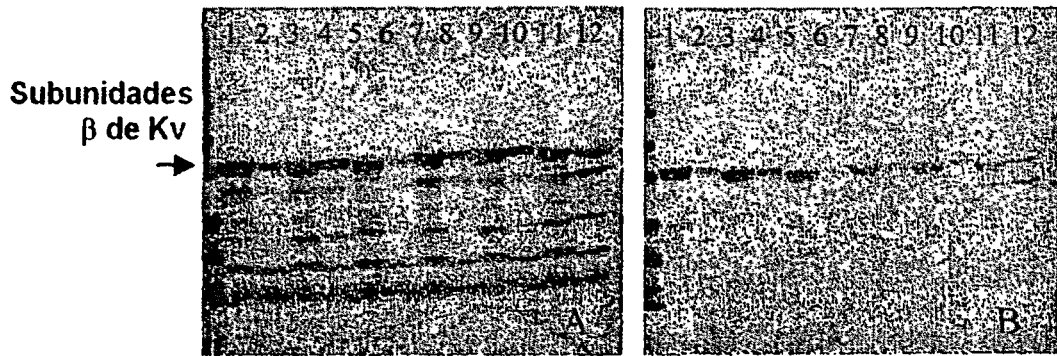


Figura 1

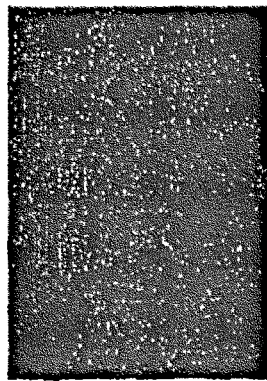


Figura 2

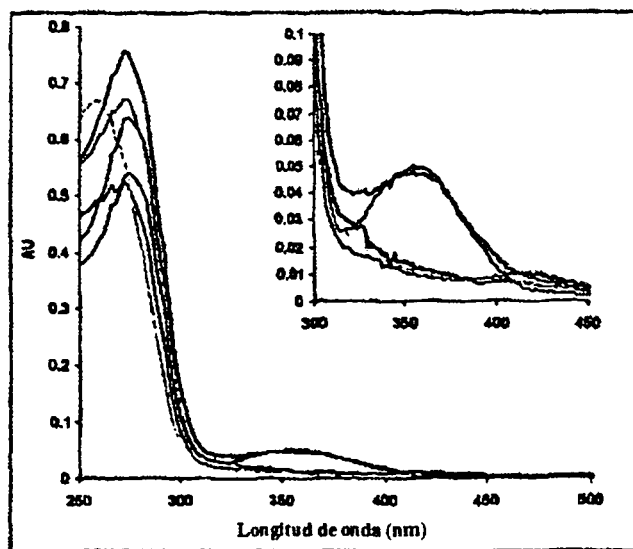


Figura 3

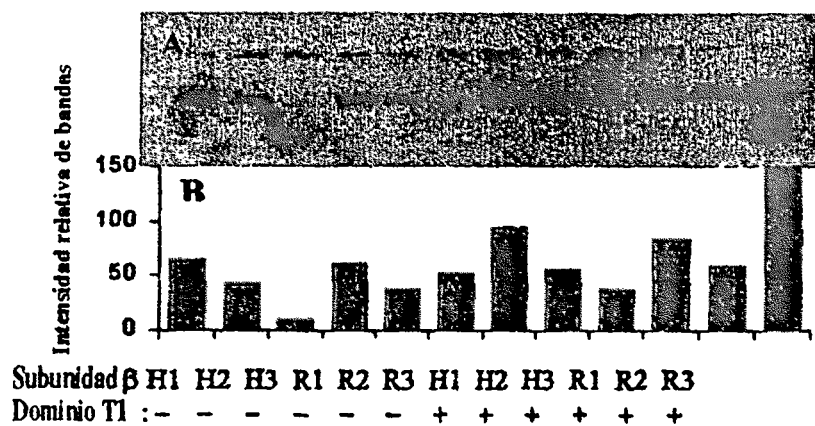


Figura 4

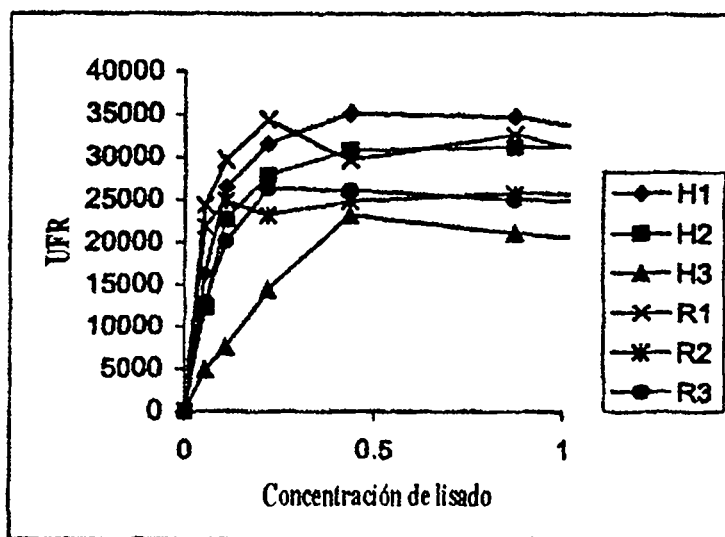


Figura 5

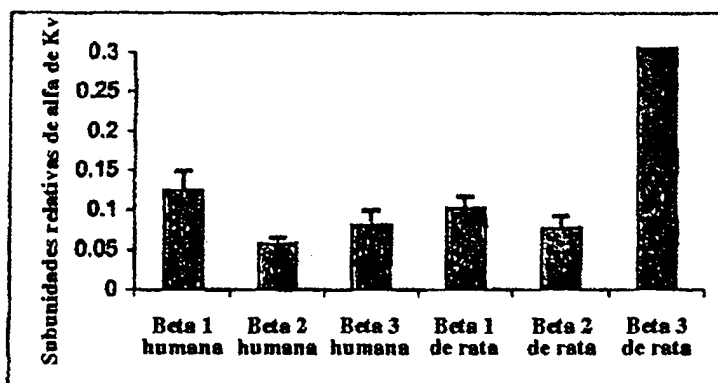


Figura 6

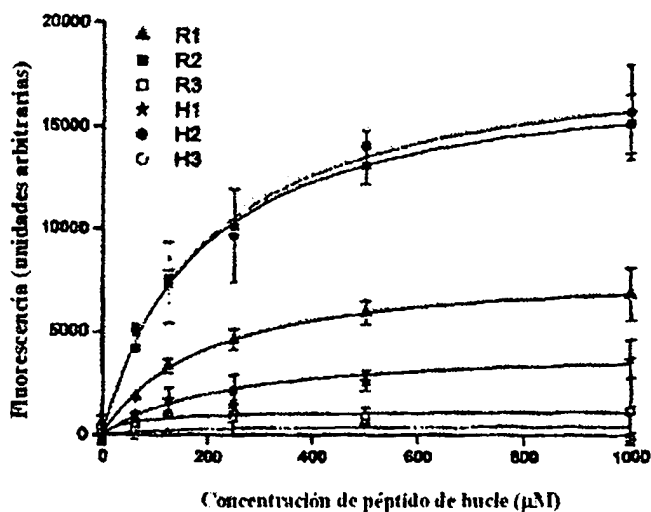


Figura 7

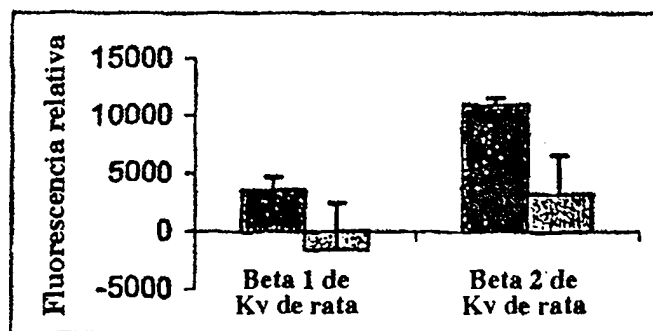
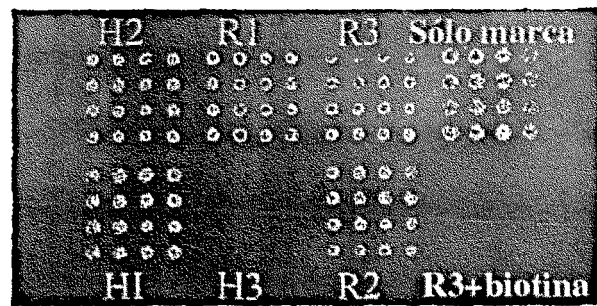
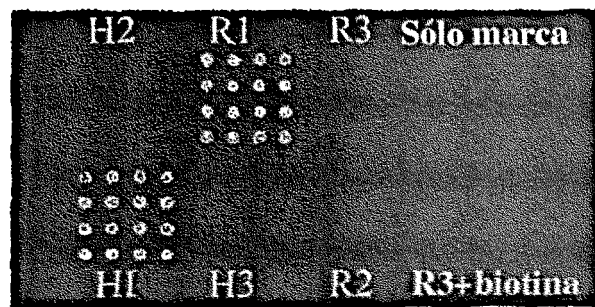


Figura 8



**Figura 9**



**Figura 10**

# ES 2 289 264 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Sense Proteomic Limited  
 Blackburn, Jonathan M  
 Kozlowski, Roland Z  
 Davies, Andrew  
 Godber, Ben  
 Hart, Darren

10 <120> Matrices y Métodos

<130> P33676WO

15 <140> PCT/GB2003/001049

<141> 2003-03-13

<150> GB 0205910.3

20 <151> 2002-03-13

<160> 6

25 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 334

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

35

**Gly Thr Gly Met Lys Tyr Arg Asn Leu Gly Lys Ser Gly Leu Arg Val**  
**1 5 10 15**

40

**Ser Cys Leu Gly Leu Gly Thr Trp Val Thr Phe Gly Gly Gln Ile Ser**  
**20 25 30**

**Asp Glu Val Ala Glu Arg Leu Met Thr Ile Ala Tyr Glu Ser Gly Val**  
**35 40 45**

45

**Asn Leu Phe Asp Thr Ala Glu Val Tyr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Val**  
**50 55 60**

50

**Ile Leu Gly Ser Ile Ile Lys Lys Lys Gly Trp Arg Arg Ser Ser Leu**  
**65 70 75 80**

**Val Ile Thr Thr Lys Leu Tyr Trp Gly Gly Lys Ala Glu Thr Glu Arg**  
**85 90 95**

55

**Gly Leu Ser Arg Lys His Ile Ile Glu Gly Leu Lys Gly Ser Leu Gln**  
**100 105 110**

60

**Arg Leu Gln Leu Glu Tyr Val Asp Val Val Phe Ala Asn Arg Pro Asp**  
**115 120 125**

**Ser Asn Thr Pro Met Glu Glu Ile Val Arg Ala Met Thr His Val Ile**  
**130 135 140**

65

**Asn Gln Gly Met Ala Met Tyr Trp Gly Thr Ser Arg Trp Ser Ala Met**  
**145 150 155 160**

ES 2 289 264 T3

5           Glu Ile Met Glu Ala Tyr Ser Val Ala Arg Gln Phe Asn Met Ile Pro  
                                   165                                  170                                  175  
 10       Pro Val Cys Glu Gln Ala Glu Tyr His Leu Phe Gln Arg Glu Lys Val  
                                   180                                  185                                  190  
 15       Glu Val Gln Leu Pro Glu Leu Tyr His Lys Ile Gly Val Gly Ala Met  
                                   195                                  200                                  205  
 20       Thr Trp Ser Pro Leu Ala Cys Gly Ile Ile Ser Gly Lys Tyr Gly Asn  
                   210                                  215                                  220  
 25       Gly Val Pro Glu Ser Ser Arg Ala Ser Leu Lys Cys Tyr Gln Trp Leu  
                   225                                  230                                  235                                  240  
 30       Lys Glu Arg Ile Val Ser Glu Glu Gly Arg Lys Gln Gln Asn Lys Leu  
                                   245                                  250                                  255  
 35       Lys Asp Leu Ser Pro Ile Ala Glu Arg Leu Gly Cys Thr Leu Pro Gln  
                                   260                                  265                                  270  
 40       Leu Ala Val Ala Trp Cys Leu Arg Asn Glu Gly Val Ser Ser Val Leu  
                                   275                                  280                                  285  
 45       Leu Gly Ser Ser Thr Pro Glu Gln Leu Ile Glu Asn Leu Gly Ala Ile  
                   290                                  295                                  300  
 50       Gln Val Leu Pro Lys Met Thr Ser His Val Val Asn Glu Ile Asp Asn  
                   305                                  310                                  315                                  320  
 55       Ile Leu Arg Asn Lys Pro Tyr Ser Lys Lys Asp Tyr Arg Ser  
                                   325                                  330

45 <210> 2  
 <211> 333  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 2

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

ES 2 289 264 T3

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

Leu Gly Asn Ile Ile Lys Lys Lys Gly Trp Arg Arg Ser Ser Leu Val  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Thr Lys Ile Phe Trp Gly Gly Lys Ala Glu Thr Glu Arg Gly  
 85 90 95  
 Leu Ser Arg Lys His Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Ser Leu Glu Arg  
 100 105 110  
 Leu Gln Leu Glu Tyr Val Asp Val Val Phe Ala Asn Arg Pro Asp Pro  
 115 120 125  
 Asn Thr Pro Met Glu Glu Thr Val Arg Ala Met Thr His Val Ile Asn  
 130 135 140  
 Gln Gly Met Ala Met Tyr Trp Gly Thr Ser Arg Trp Ser Ser Met Glu  
 145 150 155  
 Ile Met Glu Ala Tyr Ser Val Ala Arg Gln Phe Asn Leu Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Ile Cys Glu Gln Ala Glu Tyr His Met Phe Gln Arg Glu Lys Val Glu  
 180 185 190  
 Val Gln Leu Pro Glu Leu Phe His Lys Ile Gly Val Gly Ala Met Thr  
 195 200 205  
 Trp Ser Pro Leu Ala Cys Gly Ile Val Ser Gly Lys Tyr Asp Ser Gly  
 210 215 220  
 Ile Pro Pro Tyr Ser Arg Ala Ser Leu Lys Gly Tyr Gln Trp Leu Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Lys Ile Leu Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln Gln Ala Lys Leu Lys  
 245 250 255  
 Glu Leu Gln Ala Ile Ala Glu Arg Leu Gly Cys Thr Leu Pro Gln Leu  
 260 265 270  
 Ala Ile Ala Trp Cys Leu Arg Asn Glu Gly Val Ser Ser Val Leu Leu  
 275 280 285  
 Gly Ala Ser Asn Ala Asp Gln Leu Met Glu Asn Ile Gly Ala Ile Gln  
 290 295 300  
 Val Leu Pro Lys Leu Ser Ser Ser Ile Ile His Glu Ile Asp Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Asn Lys Pro Tyr Ser Lys Lys Asp Tyr Arg Ser  
 325 330

ES 2 289 264 T3

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

10 Gly Thr Gly Met Lys Tyr Arg Asn Leu Gly Lys Ser Gly Leu Arg Val  
1 5 10 15

15 Ser Cys Leu Gly Leu Gly Thr Trp Val Thr Phe Gly Ser Gln Ile Ser  
20 25 30

20 Asp Glu Thr Ala Glu Asp Val Leu Thr Val Ala Tyr Glu His Gly Val  
35 40 45

25 Asn Leu Phe Asp Thr Ala Glu Val Tyr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Arg  
50 55 60

30 Thr Leu Gly Asn Ile Leu Lys Ser Lys Gly Trp Arg Arg Ser Ser Tyr  
65 70 75 80

35 Val Ile Thr Thr Lys Ile Phe Trp Gly Gly Gln Ala Glu Thr Glu Arg  
85 90 95

40 Gly Leu Ser Arg Lys His Ile Ile Glu Gly Leu Arg Gly Ser Leu Glu  
100 105 110

45 Arg Leu Gln Leu Gly Tyr Val Asp Ile Val Phe Ala Asn Arg Ser Asp  
115 120 125

50 Pro Asn Cys Pro Met Glu Glu Ile Val Arg Ala Met Thr Tyr Val Ile  
130 135 140

55 Asn Gln Gly Leu Ala Leu Tyr Trp Gly Thr Ser Arg Trp Gly Ala Ala  
145 150 155 160

60 Glu Ile Met Glu Ala Tyr Ser Met Ala Arg Gln Phe Asn Leu Ile Pro  
165 170 175

65 Pro Val Cys Glu Gln Ala Glu His His Leu Phe Gln Arg Glu Lys Val  
180 185 190

70 Glu Met Gln Leu Pro Glu Leu Tyr His Lys Ile Gly Val Gly Ser Val  
195 200 205

75 Thr Trp Tyr Pro Leu Ala Cys Gly Leu Ile Thr Ser Lys Tyr Asp Gly  
210 215 220

80 Arg Val Pro Asp Thr Cys Arg Ala Ser Ile Lys Gly Tyr Gln Trp Leu  
225 230 235 240

ES 2 289 264 T3

Lys Asp Lys Val Gln Ser Glu Asp Gly Lys Lys Gln Gln Ala Lys Val  
 245 250 255  
 5 Met Asp Leu Leu Pro Val Ala His Gln Leu Gly Cys Thr Val Ala Gln  
 260 265 270  
 10 Leu Ala Ile Ala Trp Cys Leu Arg Ser Glu Gly Val Ser Ser Val Leu  
 275 280 285  
 15 Leu Gly Val Ser Ser Ala Glu Gln Leu Ile Glu His Leu Gly Ala Leu  
 290 295 300  
 20 Gln Val Leu Ser Gln Leu Thr Pro Gln Thr Val Met Glu Ile Asp Gly  
 305 310 315 320  
 25 Leu Leu Gly Asn Lys Pro His Ser Lys Lys  
 325 330  
 <210> 4  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus sp.*  
 30 <400> 4  
 35 Gly Thr Gly Met Lys Tyr Arg Asn Leu Gly Lys Ser Gly Leu Arg Val  
 1 5 10 15  
 40 Ser Cys Leu Gly Leu Gly Thr Trp Val Thr Phe Gly Gly Gln Ile Ser  
 20 25 30  
 45 Asp Glu Val Ala Glu Arg Leu Met Thr Ile Ala Tyr Glu Ser Gly Val  
 35 40 45  
 50 Asn Leu Phe Asp Thr Ala Glu Val Tyr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Val  
 50 55 60  
 55 Ile Leu Gly Ser Ile Ile Lys Lys Lys Gly Trp Arg Arg Ser Ser Leu  
 65 70 75 80  
 60 Val Ile Thr Thr Lys Leu Tyr Trp Gly Gly Lys Ala Glu Thr Glu Arg  
 85 90 95  
 65 Gly Leu Ser Arg Lys His Ile Ile Glu Gly Leu Lys Gly Ser Leu Gln  
 100 105 110  
 Arg Leu Gln Leu Glu Tyr Val Asp Val Val Phe Ala Asn Arg Pro Asp  
 115 120 125  
 Ser Asn Thr Pro Met Glu Glu Ile Val Arg Ala Met Thr His Val Ile  
 130 135 140  
 65 Asn Gln Gly Met Ala Met Tyr Trp Gly Thr Ser Arg Trp Ser Ala Met



ES 2 289 264 T3

5 Leu Gly Asn Ile Ile Lys Lys Lys Gly Trp Arg Arg Ser Ser Leu Val  
 65 70 75 80  
 10 Ile Thr Thr Lys Ile Phe Trp Gly Gly Lys Ala Glu Thr Glu Arg Gly  
 85 90 95  
 15 Leu Ser Arg Lys His Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Ser Leu Glu Arg  
 100 105 110  
 20 Leu Gln Leu Glu Tyr Val Asp Val Val Phe Ala Asn Arg Pro Asp Pro  
 115 120 125  
 25 Asn Thr Pro Met Glu Glu Thr Val Arg Ala Met Thr His Val Ile Asn  
 130 135 140  
 30 Gln Gly Met Ala Met Tyr Trp Gly Thr Ser Arg Trp Ser Ser Met Glu  
 145 150 155 160  
 35 Ile Met Glu Ala Tyr Ser Val Ala Arg Gln Phe Asn Leu Ile Pro Pro  
 165 170 175  
 40 Ile Cys Glu Gln Ala Glu Tyr His Met Phe Gln Arg Glu Lys Val Glu  
 180 185 190  
 45 Val Gln Leu Pro Glu Leu Phe His Lys Ile Gly Val Gly Ala Met Thr  
 195 200 205  
 50 Trp Ser Pro Leu Ala Cys Gly Ile Val Ser Gly Lys Tyr Asp Ser Gly  
 210 215 220  
 55 Ile Pro Pro Tyr Ser Arg Ala Ser Leu Lys Gly Tyr Gln Trp Leu Lys  
 225 230 235 240  
 60 Asp Lys Ile Leu Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln Gln Ala Lys Leu Lys  
 245 250 255  
 65 Glu Leu Gln Ala Ile Ala Glu Arg Leu Gly Cys Thr Leu Pro Gln Leu  
 260 265 270  
 70 Ala Ile Ala Trp Cys Leu Arg Asn Glu Gly Val Ser Ser Val Leu Leu  
 275 280 285  
 75 Gly Ala Ser Asn Ala Glu Gln Leu Met Glu Asn Ile Gly Ala Ile Gln  
 290 295 300  
 80 Val Leu Pro Lys Leu Ser Ser Ser Ile Val His Glu Ile Asp Ser Ile  
 305 310 315 320  
 85 Leu Gly Asn Lys Pro Tyr Ser Lys Lys Asp Tyr Arg Ser  
 325 330

<210> 6  
 <211> 330

ES 2 289 264 T3

<212> PRT

<213> *Rattus sp.*

5 <400> 6

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

65

ES 2 289 264 T3

Lys Glu Lys Val Gln Ser Glu Asp Gly Lys Lys Gln Gln Ala Arg Val  
245 250 255

5

Thr Asp Leu Leu Pro Ile Ala His Gln Leu Gly Cys Thr Val Ala Gln  
260 265 270

10

Leu Ala Ile Ala Trp Cys Leu Arg Ser Glu Gly Val Ser Ser Val Leu  
275 280 285

15

Leu Gly Val Ser Ser Ala Glu Gln Leu Met Glu His Leu Gly Ser Leu  
290 295 300

20

Gln Val Leu Gly Gln Leu Thr Pro Gln Thr Val Met Glu Ile Asp Ala  
305 310 315 320

25

Leu Leu Gly Asn Lys Ser His Ser Lys Lys  
325 330

30

35

40

45

50

55

60

65