



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 193**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97933988 .4**

(86) Fecha de presentación : **20.02.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0882065**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.1998**

(54) Título: **Nuevo receptor metabotrópico de glutamato humano.**

(30) Prioridad: **21.02.1996 US 604298**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(72) Inventor/es: **Stormann, Thomas, M.;
Simin, Rachel, T.;
Hammerland, Lance, G. y
Fuller, Forrest, H.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(74) Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

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

Nuevo receptor metabotrópico de glutamato humano.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican un nuevo receptor metabotrópico de glutamato humano (mGluR). El nuevo receptor humano se puede expresar en células hospedadoras que se pueden usar para detectar moléculas agonistas, antagonistas y moduladoras que actúen sobre el nuevo mGluR. Estas moléculas que actúan sobre el nuevo mGluR se pueden usar para modular la actividad del nuevo receptor humano para el tratamiento de trastornos y enfermedades neurológicas.

La invención se refiere también a ácidos nucleicos que codifican tales receptores; células y tejidos modificados genéticamente que contienen tales ácidos nucleicos; anticuerpos para tales receptores; y métodos relativos a todo lo anterior.

15 Antecedentes de la invención

La siguiente descripción proporciona un sumario de información relevante para la presente invención. Esto no es un reconocimiento de que cualquier información aquí proporcionada sea estado de la técnica previo para la invención actualmente reivindicada, ni de que cualquiera de las publicaciones a las que se hace referencia específica o implícitamente sean estado de la técnica previa para esa invención.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos. El glutamato produce sus efectos sobre las neuronas centrales uniéndose y, de este modo, activando, receptores superficiales celulares. Estos receptores se han subdividido en dos clases principales, los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos, basándose en las características estructurales de las proteínas receptoras, los medios mediante los que los receptores transducen señales hacia el interior de la célula, y perfiles farmacológicos.

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) son canales de iones dependientes de ligandos que, tras unirse a glutamato, se abren para permitir el flujo de entrada selectivo de ciertos cationes monovalentes y divalentes, despolariizando por tanto la membrana celular. Además, ciertos iGluRs con permeabilidad al calcio relativamente elevada, pueden activar diversos procesos intracelulares. Estos receptores son complejos de proteínas con múltiples subunidades, que pueden ser de naturaleza homómera o heterómera. Las diversas subunidades de iGluR comparten todas ellas motivos estructurales comunes, incluyendo un dominio extracelular amino-terminal relativamente grande (ECD), seguido por dos dominios transmembranales (TMD), un segundo dominio extracelular más pequeño, y un tercer TMD, antes de terminar con un dominio carboxi-terminal intracelular. Históricamente, los iGluRs se subdividieron primero farmacológicamente en tres clases, basadas en la activación preferencial mediante los agonistas ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA), kainato (KA), y N-metil-D-aspartato (NMDA). Más tarde, estudios de clonación molecular acoplados con estudios farmacológicos adicionales revelaron una mayor diversidad de iGluRs, ya que en el SNC de mamíferos se expresan múltiples subtipos de receptores AMPA, KA y NMDA (Hollman y Heinemann, *Ann. Rev. Neurosci.* 17:31, 1994).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) son receptores acoplados a la proteína G, capaces de activar diversos sistemas de segundo mensajero intracelulares, después de la unión del glutamato. La activación de los mGluRs en neuronas de mamífero intactas puede provocar una o más de las siguientes respuestas: activación de fosfolipasa C, incrementos en la hidrólisis de fosfoinositido (PI), liberación de calcio intracelular, activación de fosfolipasa D, activación o inhibición de adenilil-ciclasa, incrementos o reducciones en la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), activación de guanilil-ciclasa, incrementos en la formación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), activación de fosfolipasa A₂, incrementos en liberación de ácido araquídónico, e incrementos o reducciones en la actividad de los canales de iones (p.ej., canales de iones dependientes de voltaje y ligando (Schoepp y Conn. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13, 1993; Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, 1995)).

Hasta el momento, se han aislado ocho subtipos de mGluR diferentes a través de clonación molecular, y se han denominado mGluR1 a mGluR8, según el orden en el que se descubrieron (Nakanishi, *Neuron* 13:1031, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). A través de la expresión de formas escindidas alternativamente de ciertos subtipos de mGluR aparece más diversidad (Pin *et al.*, *PNAS* 89:10331, 1992; Minakami *et al.*, *BBRC* 199:1136, 1994; Joly *et al.*, *J. Neurosci.* 15:3970, 1995). Todos los mGluRs son similares estructuralmente, ya que son proteínas membranales de una sola subunidad, que poseen un gran ECD amino-terminal, seguido de siete TMDs putativos y un dominio carboxi-terminal intracelular de longitud variable.

Los ocho mGluRs se han subdividido en tres grupos basados en homologías de secuencia de aminoácidos, los sistemas de segundo mensajero que utilizan, y las características farmacológicas (Nakanishi, *Neuron* 13:1031, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, 1995; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). La homología de aminoácidos entre los mGluRs dentro de un grupo dado es aproximadamente 70%, pero cae hasta aproximadamente 40% entre mGluRs de diferentes grupos. Para mGluRs en el mismo grupo, su grado de relación es paralelo a grandes rasgos a sus similitudes en los mecanismos de transducción de señal y características farmacológicas.

ES 2 292 193 T3

- Los mGluRs del Grupo I comprenden mGluR1, mGluR5 y sus variantes escindidas alternativamente. La unión de agonistas a estos receptores produce la activación de la fosfolipasa C, y la movilización posterior del calcio intracelular. Por ejemplo, se han utilizado ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores mGluR1 recombinantes, para demostrar este efecto indirectamente mediante medios eletrofisiológicos (Masu *et al.*, *Nature* 349:760, 1991; Pin *et al.*, *PNAS* 89:10331, 1992). Se consiguieron resultados similares con ovocitos que expresaban receptores mGluR5 recombinantes (Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:13361, 1992; Minakami *et al.*, *BBRC* 199:1136, 1994; Joly *et al.*, *J. Neurosci.* 15:3970, 1995). Alternativamente, la activación por agonistas de receptores mGluR1 recombinantes expresados en células de ovario de hamster chino (CHO) estimulaban la hidrólisis de PI, la formación de AMPc, y la liberación de ácido araquidónico, según se midió mediante pruebas bioquímicas estándar (Aramori y Nakanishi, *Neuron* 8:757, 1992). En comparación, la activación de receptores mGluR5 expresados en células CHO, estimulaba la hidrólisis de PI y los régmenes transitorios de calcio intracelulares posteriores, pero no se observaba ninguna estimulación de la formación de AMPc o liberación de ácido araquidónico (Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:13361, 1992). Sin embargo, la activación de los receptores mGluR5 expresados en las células LLC-PK1, produce una formación de AMPc incrementada, así como hidrólisis de PI (Joly *et al.*, *J. Neurosci.* 15:1970, 1995). El perfil de actividad de agonistas para los mGluRs del grupo I es quisqualato> glutamato = ibotenate>(2S, 1'S, 2'S)-2- carboxi-ciclopropil)glicina (L-CCG-I)>(1S,3R)- ácido 1- amino-ciclopentano-1,3-dicarboxílico (ACPD). El quisqualato es relativamente selectivo para receptores del Grupo I, comparados con mGluRs del grupo II y Grupo III, pero también activa potencialmente los receptores AMPA ionotrópicos (Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1, Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995).
- Los mGluRs del grupo II incluyen mGluR2 y mGluR3. La activación de estos receptores, según se expresan en células CHO, inhibe la actividad de la adenilil-ciclasa, a través de la proteína G inhibidora, G_i, de un modo sensible a la toxina de Pertussis (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8:169, 1992; Tanabe *et al.*, *J. Neurosci.* 13:1372, 1993). El perfil de actividad de agonistas para los receptores del Grupo II es L-CCG-I>glutamato>ACPD>ibotenate>quisqualato. Estudios preliminares sugieren que L-CCG-I y (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxi-ciclopropil)glicina (DCG-IV), son ambos agonistas relativamente selectivos para los receptores del Grupo II, frente a otros mGluRs (Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995), pero DCG-IV presenta también actividad agonista para iGluRs (Ishida *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 109,1169, 1993).
- Los mGluRs del Grupo III incluyen mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Como los receptores del Grupo II, estos mGluRs están acoplados negativamente a adenilil-ciclasa, para inhibir la acumulación de AMPc intracelular de un modo sensible a la toxina de Pertussis, cuando se expresan en células CHO (Tanabe *et al.*, *J. Neurosci.* 13:1372, 1993; Nakajima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:11868, 1993; Okamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:1231, 1994; Duvoisin *et al.*, *J. Neurosci.* 15:3075, 1995). Como grupo, su perfil de actividad agonista es ácido (S)-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4)>glutamato>ACPD>quisqualato, pero los mGluR8 pueden diferir ligeramente, siendo el glutamato más activo que L-AP4 (Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995; Duvoisin *et al.*, *J. Neurosci.* 15:3075, 1995). Tanto el L-AP4 como la (S)-serina-O-fosfato (L-SOP), son agonistas relativamente selectivos para los receptores del grupo III.
- Finalmente, los ocho subtipos de mGluR tienen patrones de expresión únicos en el SNC de mamíferos, que en muchos casos se solapan (Masu *et al.*, *Nature* 349:760, 1991; Martin *et al.*, *Neuron* 9:259, 1992; Ohishi *et al.*, *Neurosci.* 53:1009, 1993; Tanabe *et al.*, *J. Neurosci.* 13:1372; Ohishi *et al.*, *Neuron* 13:55, 1994; Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:13361, 1992; Nakajima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:11868, 1993; Okamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:1231, 1994; Duvoisin *et al.*, *J. Neurosci.* 15:3075, 1995). Como resultado, ciertas neuronas pueden expresar sólo un subtipo de mGluR particular, mientras que otras neuronas pueden expresar múltiples subtipos que pueden localizarse en localizaciones similares y/o diferentes de la célula (p.ej. dendritas y/o cuerpos celulares posinápticos, frente a terminales de axones presinápticos). Por tanto, las consecuencias funcionales de la activación de mGluR sobre una neurona determinada dependerán de los mGluRs particulares que se estén expresando, las afinidades de los receptores por glutamato y las concentraciones de glutamato a las que se exponga la célula, las vías de transducción de señal activadas por los receptores, y las localizaciones de los receptores sobre la célula. Se puede introducir un nivel posterior de complejidad mediante interacciones múltiples entre neuronas que expresan mGluR en una región cerebral determinada. Como resultado de estas complejidades, y de la carencia de agonistas y antagonistas de mGluR específicos de subtipo, los papeles de los mGluRs particulares en procesos fisiológicos y patofisiológicos que afectan a la función neuronal no están bien definidos. No obstante, el trabajo con los agonistas y antagonistas disponibles ha producido algunas ideas generales acerca de los mGluRs del Grupo I, comparados con los mGluRs del Grupo II y del Grupo III.

Los intentos de elucidar los papeles fisiológicos de los mGluRs del Grupo I sugieren que la activación de estos receptores provoca excitación neuronal. Varios estudios han demostrado que ACPD puede producir excitación posináptica tras la aplicación a neuronas en el hipocampo, córtex cerebral, cerebelo y tálamo, así como en otras regiones cerebrales. La evidencia indica que esta excitación se debe a la activación directa de mGluRs posinápticos, pero también se ha sugerido que en ella interviene la activación de mGluRs presinápticos, que produce una liberación de neurotransmisor incrementada (Baskys, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:92, 1992; Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1). Experimentos farmacológicos implican a los mGluRs del Grupo I como mediadores de esta excitación. El efecto de ACPD se puede reproducir mediante concentraciones bajas de quisqualato, en presencia de antagonistas de iGluR (Hu y Storm, *Brain Res.* 568:339, 1991; Greene *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 226:279, 1992), y dos compuestos de fenil-glicina que se sabe que activan mGluR1, (S)-3-hidroxi-fenil-glicina ((S)-3HPG) y (S)-3,5-dihidroxi-fenil-glicina ((S)-DHPG), también producen la excitación (Watkins y Collingridge, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:333, 1994). Además, la excitación se puede bloquear por (S)-4-carboxi-fenil-glicina ((S)-4CPG),

ES 2 292 193 T3

(S)-4-carboxi-3-hidroxi-fenil-glicina ((S)-4C3HPG) y (+)-alfa-metil-4-carboxi-fenil-glicina ((+)-MCPG), compuestos que se sabe que son antagonistas de mGluR1 (Eaton *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 244:195, 1993; Watkins y Collingridge, *Trends Pharmacol. Sci* 15:333, 1994).

5 Otros estudios que examinan los papeles fisiológicos de mGluRs, indican que la activación de mGluRs presinápticos puede bloquear la transmisión sináptica, tanto excitadora como inhibidora, inhibiendo la liberación de neurotransmisor (Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1). Se ha observado bloqueo presináptico de la transmisión sináptica excitadora mediante ACPD en neuronas del córtex visual, cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado y amígdala (Pin *et al.*, *Curr. Drugs: Neurodegenerative disorders* 1: 111, 1993), mientras que se ha demostrado un bloqueo similar de la transmisión sináptica inhibidora en el cuerpo estriado y el bulbo olfatorio (Calabresi *et al.*, *Neurosci. Lett.* 139:41, 1992; Hayashi *et al.*, *Nature* 366:687, 1993). Múltiples elementos de prueba sugieren que los mGluRs del Grupo II intervienen en esta inhibición presináptica. Los mGluRs del Grupo II están fuertemente acoplados a la inhibición de la adenilil-ciclasa, como los receptores α 2-adrenérgicos y 5HT_{1A} serotonérgicos, que se sabe que intervienen en la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisor en otras neuronas. Los efectos inhibidores de ACPD se pueden mimetizar asimismo por L-CCG-I y DCG-IV, que son agonistas selectivos de los mGluRs del Grupo II (Hayashi *et al.*, *Nature* 366:687, 1993; Jane *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 112:809, 1994). Además, se ha demostrado que la activación de mGluR2 puede inhibir fuertemente la actividad de los canales de calcio de tipo N presinápticos, cuando el receptor se expresa en neuronas simpáticas (Ikeda *et al.*, *Neuron*, 14:1029, 1995), y se sabe que el bloqueo de estos canales inhibe la liberación de neurotransmisores. Finalmente, se ha observado que L-CCG-I, a concentraciones selectivas para mGluRs del Grupo II, inhibe la liberación evocada por despolarización de ¹H-aspartato procedente de láminas de cuerpo estriado de rata (Lombardi *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 110:1407, 1993). Las pruebas para efectos fisiológicos de la activación de mGluR del Grupo II a nivel posináptico, son limitadas. Sin embargo, un estudio sugiere que las acciones posinápticas de L-CCG-I pueden inhibir la activación del receptor NMDA en neuronas mesencefálicas cultivadas (Ambrosini *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 47:1057, 1995).

25 Estudios fisiológicos han demostrado que L-AP4 puede inhibir también la transmisión sináptica excitadora sobre diversas neuronas del SNC. Se incluyen neuronas del córtex, hipocampo, amígdala, bulbo olfatorio y médula espinal (Koerner y Johnson, *Excitatory Amino Acid Receptors; Design of Agonists and Antagonists*, pág. 308, 1992; Pin *et al.*, *Curr. Drugs: Neurodegenerative Disorders* 1:111, 1993). Las pruebas acumuladas indican que en la inhibición interviene la activación de mGluRs presinápticos. Debido a que los efectos de L-AP4 se pueden mimetizar por L-SOP, y estos dos agonistas son selectivos para los mGluRs del Grupo III, miembros de este grupo de mGluR están implicados como mediadores de la inhibición presináptica (Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1). En las neuronas del bulbo olfatorio, se ha demostrado que la activación por L-AP4 de mGluRs inhibe las corrientes de calcio presinápticas (Trombley y Westbrook, *J. Neurosci.* 12:2043, 1992). Por tanto, es posible que el mecanismo de inhibición producido por la activación de mGluRs del grupo III, sea similar al de mGluRs del grupo II, es decir, el bloqueo de canales de calcio dependientes del voltaje e inhibición de la liberación del neurotransmisor. Se sabe también que L-APA4 actúa posinápticamente para hiperpolarizar células bipolares ON en la retina. Se ha sugerido que esta acción se puede deber a la activación de un mGluR, que está acoplado a la GMPc-fosfodiesterasa en estas células (Schoepp, *Neurochem. Int.* 24:439, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1).

40 Los receptores metabotrópicos de glutamato han estado implicados, jugando papeles, en diversos procesos normales en el SNC de mamíferos. Se ha demostrado que la activación de mGluRs es un requisito para la inducción de la potenciación del hipocampo a largo plazo y la depresión cerebelar a largo plazo (Bashir *et al.*, *Nature* 363:347, 1993; Botolotto *et al.*, *Nature* 368:740, 1994; Aiba *et al.*, *Cell* 79:365, 1994; Aiba *et al.*, *Cell* 79:377, 1994). También se ha demostrado un papel para la activación de mGluR en la nocicepción y analgesia (Meller *et al.*, *Neuroreport* 4: 879, 1993). Además, se ha sugerido que la activación de mGluR juega un papel modulador en varios procesos normales distintos, incluyendo: transmisión sináptica, desarrollo neuronal, muerte neuronal, plasticidad sináptica, aprendizaje espacial, memoria olfativa, control central de la actividad cardíaca, despertar, control motor, y control del reflejo vestibulo-ocular (para revisiones, véanse Nakanishi, *Neuron* 13:1031, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995).

Ninguna de las referencias aquí mencionadas se admite que sea estado de la técnica previo para las reivindicaciones.

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a (1) ácidos nucleicos que codifican una proteína receptora metabotrópica de glutamato, identificada recientemente y sus fragmentos; (2) la proteína receptora metabotrópica de glutamato y sus fragmentos; (3) moléculas de receptor químérico que tienen uno o más dominios derivados del nuevo receptor metabotrópico de glutamato, y uno o más dominios derivados de un receptor diferente; (4) líneas celulares que expresan la proteína receptora metabotrópica de glutamato y sus fragmentos; (5) anticuerpos y sus fragmentos, dirigidos a la proteína receptora metabotrópica de glutamato, fragmentos de la proteína y péptidos; (6) usos de tales moléculas, ácidos nucleicos, proteínas, líneas celulares y anticuerpos; (7) métodos de detección de un compuesto que se fija al receptor metabotrópico de glutamato o modula su actividad.

65 La presente invención también describe compuestos y métodos para modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato y la unión al receptor metabotrópico de glutamato. Tales compuestos actúan preferiblemente como agonistas, antagonistas o moduladores alostéricos de una o más de las actividades del receptor metabotrópico de glu-

tamato. Modulando las actividades del receptor metabotrópico de glutamato, se pueden producir diferentes efectos, como efectos anticonvulsivos, efectos neuroprotectores, efectos analgésicos y efectos promotores de la cognición.

Se ha sugerido que los receptores metabotrópicos de glutamato juegan papeles en diversos procesos patofisiológicos y estados de enfermedad que afectan al SNC. Estos incluyen ictus, traumatismo craneal, lesiones anóxicas e isquémicas, hipoglucemia, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Alzheimer (Schoepp y Conn., *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13,1993; Cunningham *et al.*, *Life Sci.* 54:135, 1994; Hollman and Heinemann, *Ann. Rev. Neurosci.* 17:31, 1994; Pin y Duvoisin, *Neuropharmacology* 34:1; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1994). La mayoría de la patología en estas enfermedades se piensa que se debe a una excitación inducida por glutamato excesiva de las neuronas del SNC. Debido a que el Grupo I de mGluRs parece incrementar la excitación neuronal en la que interviene el glutamato, a través de mecanismos posinápticos y liberación presináptica de glutamato incrementada, su activación podría contribuir a la patología. Por tanto, antagonistas selectivos de estos receptores podrían ser beneficiosos terapéuticamente, específicamente como neuroprotectores o anticonvulsivos. Como contraste, debido a que la activación de los mGluRs del Grupo II y Grupo III inhibe la liberación de glutamato presináptico y la posterior neurotransmisión excitadora, los agonistas selectivos para estos receptores podrían presentar utilidades terapéuticas similares. Por tanto, los diversos subtipos de mGluR pueden representar nuevos objetivos para el desarrollo de fármacos para el SNC.

Estudios preliminares que valoran los potenciales terapéuticos con los agonistas y antagonistas de mGluR disponibles, han producido resultados que parecen contradictorios. Por ejemplo, se ha descrito que la aplicación de ACPD sobre neuronas del hipocampo, conduce a crisis epilépticas y daño neuronal (Sacaan y Choepp, *Neurosci. Lett.* 139:77, 1992; Lippert *et al.*, *Life Sci.* 52:85, 1993). Pero otros estudios indican que ACPD puede inhibir la actividad epileptiforme (Taschenberger *et al.*, *Neuroreport* 3:629, 1992; Sheardown, *Neuroreport* 3:916, 1992) y pueden presentar también propiedades neuroprotectoras (Koh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9431, 1991; Chiampura *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 216:335, 1992; Siliprandi *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 219:173, 1992; Pizzi *et al.*, *J. Neurochem.* 61:683, 1993). Es posible que estos resultados opuestos se deban a la falta de selectividad del ACPD, y a una activación de diferentes subtipos de mGluR. Una explicación razonable para los resultados es que los mGluRs del Grupo I se activaban en los primeros estudios para incrementar la neurotransmisión excitadora, mientras que en los últimos efectos intervenía la activación de mGluRs del Grupo II y/o Grupo III para inhibir la liberación de glutamato presináptico, y disminuir la neurotransmisión excitadora. Las observaciones de que (S)-4C3HPG, un antagonista de mGluR del Grupo I y agonista de mGluR del grupo II, protege frente a crisis epilépticas audiogénicas en ratones DBA/2 (Thomsen *et al.*, *J. Neurochem.* 62:2492, 1994); mientras que los agonistas selectivos de mGluR del Grupo II, DCG-IV y L-CCG-I, protegen las neuronas de toxicidad inducida por NMDA y KA (Bruno *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 256:109, 1994; Pizzi *et al.*, *J. Neurochem.* 61:683, 1993), son consecuentes asimismo con esta interpretación.

Es evidente que los agonistas y antagonistas de mGluR disponibles actualmente pueden ser de uso limitado, como herramientas de búsqueda y como sustancias terapéuticas potenciales, como consecuencia de su falta de actividad y selectividad. Además, debido a que estos compuestos son en su mayoría aminoácidos o derivados de aminoácidos, tienen biodisponibilidades limitadas, lo cual obstaculiza los estudios *in vivo* de valoración de la fisiología, farmacología y potencial terapéutico de mGluR. La identificación de agonistas y antagonistas con un elevado grado de actividad y selectividad para subtipos de mGluR individuales es, por tanto, el requisito más importante para incrementar la comprensión de diversos papeles de los mGluRs en procesos fisiológicos y patofisiológicos en el SNC de mamíferos. El escrutinio de elevado rendimiento de bibliotecas químicas, usando células transfectadas de manera estable con mGluRs clonados individuales, puede ofrecer un enfoque prometedor para identificar nuevos compuestos principales que sean activos sobre los subtipos de receptores individuales (Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). Estos compuestos principales podrían servir como moldes para estudios de modificación química extensivos, para incrementar adicionalmente la actividad, la selectividad para subtipos de mGluR, y características terapéuticas importantes, como la biodisponibilidad.

Teniendo en cuenta esta información, es evidente que el nuevo mGluR tiene un patrón de expresión único en el SNC de mamíferos, comparado con otros subtipos de mGluR. Se espera que el nuevo mGluR presente un perfil farmacológico único para diversos agonistas, antagonistas y moléculas moduladoras, comparado con otros subtipos de mGluR. Como resultado de estos factores, compuestos que actúan potencial y específicamente sobre el nuevo mGluR objeto de la presente invención, producirán acciones sobre el SNC que serán distintas de los compuestos que actúan sobre otros subtipos de mGluR. Por tanto, es posible que compuestos selectivos para el nuevo mGluR de la presente invención, tengan usos y ventajas únicos respecto al tratamiento de diversas patofisiologías y enfermedades del SNC.

El uso preferido del receptor y métodos de la presente invención es detectar compuestos que modulen la actividad del nuevo receptor metabotrópico de glutamato, y usar tales compuestos para ayudar al tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos. Sin embargo, se consideran asimismo otros usos, incluyendo diagnóstico y de tratamiento. Tales usos se basan en el nuevo receptor metabotrópico de glutamato identificado aquí, cuya secuencia se proporciona en la Figura 1 (SEQ ID Nº 1), y la secuencia de DNA codificadora se proporciona en la Figura 5 (SEQ ID Nº 5) (representándose el marco de lectura abierto (ORF) en la Figura 2 (SEQ ID Nº 2), nucleótidos 1-2724).

Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína receptora metabotrópica de glutamato, que comprende al menos 6 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia aminoácida de residuos 894 a 908, mostrada en la Figura 1. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico purificada o aislada. Preferiblemente, la proteína receptora metabotrópica de gluta-

mato es una proteína humana. En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de DNA genómico, una secuencia de DNAc, o una secuencia de RNA. Debido a que se descubren dos nuevas proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato que sólo difieren en la presencia o ausencia de una secuencia terminal, en las realizaciones preferidas la proteína receptora de glutamato comprende la SEQ ID N°:1. Tienen especial interés las moléculas de ácido nucleico que codifican esencialmente una proteína receptora metabotrópica de glutamato completa. Por tanto, en las realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1.

Se reconoce que un gran número, aunque finito, de secuencias de ácidos nucleicos diferentes codificarán la misma secuencia de aminoácidos, debido a la redundancia del código genético. Tales secuencias codificadoras alternativas están incluidas en el alcance del aspecto anterior de la invención.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID N°:1 tiene la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N°:5. Asimismo, en realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 2678 a 2724 de SEQ ID N°:5, que codifica al menos 6 residuos aminoácidos contiguos de la secuencia aminoácida procedente de los residuos 894 a 908 de SEQ ID N°:1 y, preferiblemente, la totalidad de los residuos aminoácidos 894 a 908. Debido a que el uso de una proteína receptora metabotrópica de glutamato es ventajosa en ciertas aplicaciones, en una realización preferida la invención proporciona también una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína receptora metabotrópica de glutamato descrita anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio extracelular que es parte de la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1. En esta realización, la secuencia de aminoácidos codificada está exenta sustancialmente de porciones de dominio transmembranal y dominio intracelular contenidas en la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1. Igualmente, las moléculas de la presente invención se pueden usar para diseñar moléculas de ácidos nucleicos que codifican uno o más dominios que son parte de la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1, pero que no incluyen al menos uno de tales dominios. Por tanto, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos según se definieron anteriormente, que codifican también un dominio transmembranal de un receptor mGluR8, contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, que está exento de dominios intracelular y extracelular y dominios transmembranales de dicho receptor, que están sustancialmente exentos del dominio intracelular.

En realizaciones preferidas adicionales, la molécula de ácido nucleico codifica un dominio extracelular de SEQ ID N°:1, acoplado transcripcionalmente a una segunda molécula de ácido nucleico que codifica dominios transmembranales e intracelulares de una proteína que no es una proteína receptora metabotrópica de glutamato (es decir, un receptor no metabotrópico de glutamato); el ácido nucleico codifica una proteína de fusión, compuesta por un dominio extracelular N-terminal, contiguo a un dominio de siete proteínas transmembranales de SEQ ID N°:1, y está acoplado transcripcionalmente con un ácido nucleico que codifica un dominio intracelular C-terminal de un receptor no metabotrópico de glutamato; el ácido nucleico codifica una proteína de fusión compuesta por un dominio extracelular N-terminal contiguo a un dominio de siete proteínas transmembranales de SEQ ID N°:1, y está acoplado transcripcionalmente a ácidos nucleicos que codifican dominios intracelulares múltiples de un receptor no metabotrópico de glutamato.

Debido a que es ventajoso en algunas aplicaciones utilizar la hebra de DNA complementaria o anticodificadora, la invención proporciona también una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia sustancialmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico del aspecto anterior. Las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención son, preferiblemente, moléculas de ácidos nucleicos purificadas o aisladas.

En el contexto de esta invención, el término “purificado” significa que la molécula de ácido nucleico o polipéptido especificado se ha separado de otras moléculas de ácido nucleico o polipéptido con las que se encuentra, respectivamente, de tal manera que forma una fracción sustancial de los ácidos nucleicos o polipéptidos totales presentes en una preparación. Preferiblemente, la molécula especificada constituye al menos 1, 5, 10, 50, 75, 85 o 95 por ciento o más de las moléculas de ese tipo (ácido nucleico o polipéptido), presentes en una preparación.

“Aislado” en referencia a ácidos nucleicos, polipéptidos, u otras biomoléculas de esta invención, significa que la molécula está presente en una forma (es decir, su asociación con otras moléculas) distinta de la que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico receptor aislado, se separa de uno o más ácidos nucleicos que están presentes en el mismo cromosoma, y un polipéptido aislado se separa de una fracción sustancial de los otros polipéptidos con los que se encuentra normalmente en la naturaleza. Preferiblemente, el ácido nucleico o polipéptido aislado se separa de al menos 90% de los otros ácidos nucleicos presentes en el mismo cromosoma o polipéptidos que se encuentran normalmente en la misma célula. Un ejemplo del ácido nucleico aislado es un ácido nucleico recombinante. En esta solicitud, el término “ácido nucleico aislado” es distinto de clones existentes en una biblioteca de clones. Se refiere a un clon particular que tiene el material designado codificado en su interior, aislado de otros de tales clones. Se puede crear mediante métodos recombinantes estándar, para existir en un tubo de ensayo o en una célula u organismo deseados. Es preferiblemente el único ácido nucleico clonado en un vector estándar, y puede contener o no las secuencias testigo existentes en la naturaleza asociadas al mismo. Por tanto, contiene ácido nucleico aislado de su medio natural y que se sabe que tiene presente la secuencia reivindicada. Es, preferiblemente, una preparación homogénea de ácido nucleico, separado de otros componentes celulares y de otros ácidos nucleicos.

En referencia a los ácidos nucleicos y polipéptidos de la presente invención, el término “único” se refiere a una diferencia de secuencia entre una molécula de ácido nucleico de la presente invención y la secuencia correspondiente.

ES 2 292 193 T3

te de otras proteínas receptoras, incluyendo otras proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato. Por tanto, las secuencias difieren en, al menos uno, pero preferiblemente una pluralidad de nucleótidos o residuos aminoácidos.

- “Sustancialmente complementario” significa que el ácido nucleico purificado puede hibridar con la región de secuencia complementaria en un ácido nucleico específico, bajo condiciones de hibridación restrictivas. Tales secuencias de ácidos nucleicos son particularmente útiles como sondas de detección de hibridación para detectar la presencia de ácido nucleico que codifica un receptor determinado. Bajo condiciones de hibridación restrictivas, sólo hibridan secuencias de ácido nucleico altamente complementarias. Preferiblemente, tales condiciones evitan la hibridación de ácidos nucleicos que tengan 4 o más desapareamientos de cada 20 nucleótidos contiguos, más preferiblemente 2 o más desapareamientos de cada 20 nucleótidos contiguos, con la máxima preferencia, uno o más desapareamientos de cada 20 nucleótidos contiguos. Preferiblemente, el ácido nucleico es sustancialmente complementario a, al menos, 15, 20, 27 o 45 nucleótidos contiguos de la secuencia específica (p.ej., en SEQ ID Nº:2).

- En el contexto del nuevo receptor y fragmentos, el término “equivalente funcional” se refiere a un polipéptido que tiene una actividad que puede sustituir a una o más actividades de un receptor o fragmento de receptor particular. Esto se explica con más detalle en la descripción detallada, más adelante.

- En referencia a los diferentes dominios del receptor metabotrópico de glutamato, el término “sustancialmente exento”, se refiere a la ausencia de al menos la mayoría del dominio particular, preferiblemente de forma que no quede ninguna actividad de interés específica de ese dominio. Por tanto, puede quedar una porción o porciones cortas de la secuencia del dominio particular, pero no proporciona una actividad particular sustancial, normalmente proporcionada por el dominio intacto.

- “Que comprende” significa que incluye, pero no limitado a, sea lo que sea lo que sigue a la palabra “comprende”. Por tanto, el uso de este término indica que los elementos enumerados se requieren, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no. “Consistente esencialmente en” significa que los elementos enumerados se requieren, pero otros elementos pueden estar presentes o no, dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

- La presente invención proporciona asimismo polipéptidos correspondientes a las moléculas de ácidos nucleicos de los aspectos anteriores. Por tanto, en otro aspecto, la invención describe un polipéptido que tiene al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos aminoácidos 894 a 908 de SEQ ID Nº:1. En realizaciones preferidas, el polipéptido purificado tiene además al menos 12, 18 o 54 aminoácidos contiguos de SEQ ID Nº:1. En realizaciones adicionales preferidas, el polipéptido purificado comprende al menos un aminoácido contiguo a los otros aminoácidos contiguos, de la secuencia proporcionada en los residuos 894 a 908 de SEQ ID Nº:1. En otras realizaciones preferidas, el polipéptido purificado comprende al menos 12 o 15 aminoácidos contiguos de la secuencia proporcionada en los residuos 894 a 908 de SEQ ID Nº:1. En otro aspecto, el polipéptido purificado comprende además la secuencia de aminoácidos proporcionada en los residuos 1 a 893 de SEQ ID Nº:1. En una realización preferida, el polipéptido comprende además una secuencia de quince aminoácidos que es homóloga a la secuencia de quince aminoácidos de la cola de carboxilo de mGluR8 de ratón. Otros fragmentos de receptor preferidos incluyen aquellos que tienen sólo una porción extracelular, una porción transmembranal, una porción intracelular y/o una porción transmembranal múltiple (p.ej. porción transmembranal de siete proteínas), según se describió en relación con las moléculas de ácido nucleico de la invención. En una realización particularmente preferida, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº:1.

- La expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica un receptor o fragmento de receptor metabotrópico de glutamato, es un método útil para producir polipéptidos como los descritos anteriormente. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica un receptor o fragmento de receptor metabotrópico de glutamato, según se describió, clonado en un vector de expresión. Un vector de expresión contiene los elementos necesarios para expresar una secuencia de ácido nucleico clonada para producir un polipéptido. Un “vector de expresión” contiene una región promotora (que dirige la iniciación de la transcripción del RNA), así como las secuencias de DNA que, cuando se transcriben en RNA, señalizarán la iniciación de la síntesis. “Vector de expresión” incluye vectores que son capaces de expresar secuencias de DNA contenidas en los mismos, es decir, las secuencias codificadoras están ligadas operativamente a otras secuencias capaces de efectuar su expresión. Está implícito, aunque no siempre se indique explícitamente, que estos vectores de expresión tienen que poderse replicar en los organismos hospedadores, bien como episomas o como parte integrante del DNA cromosómico. Claramente, una carencia de replicabilidad los haría efectivamente inutilizables. Un elemento útil, pero no necesario, de un vector de expresión efectivo es una secuencia que codifique un marcador, es decir, una secuencia que codifique una proteína que produzca una propiedad fenotípica (p.ej., resistencia a tetraciclina) de las células que contienen la proteína, que permite que dichas células se identifiquen fácilmente. En resumen, a “vector de expresión” se le da una definición funcional, y cualquier secuencia de DNA que sea capaz de efectuar la expresión de un código de DNA contenido específicamente, se incluye en este término, ya que se aplica a la secuencia especificada. Como tales vectores, en el presente, están frecuentemente en forma de plásmidos, los términos “plásmido” y “vector de expresión” se usan a menudo de forma intercambiable. Sin embargo, la invención está destinada a incluir otras formas de vectores de expresión, incluyendo vectores víricos, que sirven para funciones equivalentes y que pueden, de vez en cuando, hacerse conocidos en la técnica.

En referencia a las proteínas receptoras, “biológicamente funcional” y “receptor funcional” indican que la molécula receptora o una porción de la misma tiene una característica de actividad biológica normal del receptor normal en su

ES 2 292 193 T3

5 medio celular usual, que es relevante en el proceso de interés. Tal proceso puede ser, por ejemplo, una prueba de unión o una respuesta celular compleja. Preferiblemente, un receptor funcional es capaz de participar en las reacciones de respuesta celular normales. En referencia a un vector de expresión, “biológicamente funcional” significa que el vector de expresión se puede transcribir y el producto de transcripción traducirse en la célula o sistema de expresión de interés.

10 Los términos “transformado” y “transfectado” se refieren a la inserción de un material genético extraño en una célula procariótica o eucariótica. Tal inserción se realiza normalmente usando vectores, como vectores plasmídicos o víricos, pero puede incluir también otras técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

15 El ácido nucleico recombinante puede contener el ácido nucleico descrito anteriormente, que codifica para un receptor metabotrópico de glutamato, un fragmento de receptor o un derivado de receptor metabotrópico de glutamato, bajo el control de sus elementos reguladores genómicos, o bajo el control de elementos reguladores exógenos, incluyendo un promotor exógeno. “Exógeno” significa un promotor que no está normalmente acoplado transcripcionalmente *in vivo* a la secuencia codificadora para el receptor metabotrópico de glutamato.

20 El vector de expresión se puede usar en otro aspecto de la invención para transformar o transfectar una célula hospedadora procariótica o eucariótica. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se caracteriza por una célula o tejido recombinante. La célula o tejido recombinante están constituidos por una secuencia de ácido recombinante del primer aspecto anterior, y una célula capaz de expresar el ácido nucleico. Las células recombinantes tienen diversos usos, incluyendo su actuación como fábricas biológicas para producir polipéptidos codificados por el ácido nucleico recombinante, y para producir células que contengan un receptor metabotrópico de glutamato. Las células que contienen un receptor metabotrópico de glutamato se pueden usar, por ejemplo, para detectar agonistas, antagonistas o moduladores alostéricos de mGluR. En realizaciones preferidas, la célula o tejido que contienen el ácido nucleico recombinante que codifica el receptor metabotrópico de glutamato que funciona, se selecciona del grupo que consiste en: célula del sistema nervioso central, célula del sistema nervioso periférico, célula pituitaria, y célula hipotalámica; y el ácido nucleico recombinante codifica al menos 12, 18 o 54 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°:1. En una realización particular de la invención, la célula hospedadora es un ovocito, por ejemplo un ovocito de *Xenopus*. En otras realizaciones preferidas, la célula es una de NIH-3T3, HeLa, NG115, CHO, HIK 293 y COS7.

30 35 Otro aspecto de la invención describe un proceso para la producción de un producto polipeptídico que implica cultivar células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, transformadas con un vector de expresión según la invención, bajo condiciones de nutrientes adecuados. Las células hospedadoras se cultivan de modo que permitan la expresión del producto polipeptídico. En un aspecto preferido de la invención, el proceso implica además el aislamiento del producto polipeptídico. “Condiciones de nutrientes adecuados” son aquéllas que permiten a una célula realizar funciones metabólicas normales y/o crecer. Las condiciones adecuadas para una línea o estirpe celular particular diferirán, en general, pero se sabe que las condiciones apropiadas para cada uno de tales tipos celulares se determinan o se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

40 Otro aspecto de la presente invención describe un método para crear un mamífero no humano transgénico, introduciendo un ácido nucleico que consiste esencialmente en la SEQ ID N°:2 o una de sus porciones biológicamente funcionales, que comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de residuos 894 a 908, mostrada en la Figura 1, en la célula o células de un mamífero no humano.

45 50 Por tanto, las moléculas de ácido nucleico se pueden usar para proporcionar mamíferos no humanos transgénicos que contengan un transgen que codifique para el nuevo receptor metabotrópico de glutamato o un gen que afecte a la expresión de ese receptor, y métodos para crear un mamífero no humano transgénico que contenga un transgen que codifique el nuevo receptor metabotrópico de glutamato. Preferiblemente, se usa un receptor metabotrópico de glutamato humano. En realizaciones preferidas del método de la presente invención, el transgen codifica un receptor metabotrópico de glutamato; altera la expresión del receptor metabotrópico de glutamato; inactiva la expresión del receptor metabotrópico de glutamato; e incrementa o reduce la expresión del receptor metabotrópico de glutamato.

55 El término “transgénico” se refiere a un animal (también aplicable a plantas) que tiene un gen extraño incorporado en los cromosomas de las células del animal. En muchos casos, el gen extraño deriva de una especie diferente, pero el gen puede ser también un derivado de un gen que se encuentra normalmente en ese animal, insertado en el cromosoma. Debido a que el transgen se incorpora en el cromosoma, se replicará junto con el resto del cromosoma.

60 Otro aspecto de la invención describe un método de selección de un compuesto que se fija al receptor metabotrópico de glutamato de SEQ ID N°:1 o modula su actividad. El método implica la introducción del receptor metabotrópico de glutamato y un compuesto de prueba en un medio aceptable y la supervisor de la unión o modulación mediante medios detectables físicamente, identificándose así los compuestos que interaccionan con el receptor metabotrópico de glutamato o modulan su actividad. Tal compuesto es útil como molécula terapéutica para modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato o como sustancia de diagnóstico para diagnosticar pacientes que padecen una enfermedad caracterizada por una actividad metabotrópica de glutamato anormal. En una realización preferida, el mGluR es un receptor químico que tiene un dominio extracelular contenido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 y un dominio intracelular de un receptor diferente. Tal receptor químico permite la activación de una vía celular no activada normalmente mediante el nuevo mGluR aquí descrito. Asimismo, en una realización preferida el receptor metabotrópico de glutamato se expresa por una célula, y el compuesto se detecta supervisando el efecto

ES 2 292 193 T3

del compuesto sobre la célula, más preferiblemente la célula es una célula eucariótica. Por ejemplo, el método puede implicar poner en contacto una célula que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica un receptor metabotrópico de glutamato con la sustancia, y detectar un cambio en la actividad del receptor metabotrópico de glutamato. En otra realización preferida, el método implica una prueba de unión competitiva con un aglutinante conocido, marcado. 5 Preferiblemente el método se usa para identificar una sustancia moduladora del receptor metabotrópico de glutamato.

El término “medios físicamente detectables” se refiere aquí a los medios para detectar la interacción entre un modulador o compuesto aglutinante y la nueva molécula receptora metabotrópica de glutamato. Tales medios pueden incluir, por ejemplo, métodos espectroscópicos (p.ej., medición fluorométrica de Ca^{2+}), pruebas electrofisiológicas y 10 pruebas bioquímicas (p.ej., actividad enzimática específica). Además de una diversidad de otras pruebas, tal prueba bioquímica puede incluir la detección de la activación de una vía celular no activada normalmente por el nuevo mGluR, por un receptor químérico. Cada técnica detecta una propiedad o parámetro físico.

Un “receptor químérico” es el que tiene una secuencia de aminoácidos que es una fusión o asociación de secuencias 15 de dos o más proteínas diferentes, al menos una de las cuales es una proteína receptora. Típicamente, en esta invención un receptor químérico tiene secuencias de aminoácidos que constituyen dominios (como extracelular, intermembranal e intercelular), de dos o más proteínas receptoras diferentes, una de los cuales es el nuevo mGluR8 de esta invención.

La identificación de sustancias moduladoras del receptor metabotrópico de glutamato se facilita usando un sistema 20 de selección de rendimiento elevado. La selección de rendimiento elevado permite analizar un gran número de moléculas. Por ejemplo, se puede analizar individualmente un gran número de moléculas, usando técnicas automatizadas rápidas o en combinación con el uso de una biblioteca combinatoria de moléculas. Los compuestos individuales capaces de modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, presentes en una biblioteca combinatoria, se pueden obtener purificando y volviendo a analizar fracciones de la biblioteca combinatoria. Por tanto, se pueden 25 seleccionar de miles a millones de moléculas en un período corto de tiempo. Las moléculas activas se pueden usar como modelos para diseñar moléculas adicionales que tienen una actividad equivalente o incrementada. Tales moléculas tendrán, generalmente, un peso molecular de 10.000, preferiblemente menos de 1.000. Se pueden elegir de tres, activas frente a receptores de calcio, según se describió por Nemeth *et al.*, PCT/US94/12117 (WO75/11221), incorporada aquí mediante referencia.

30 La presente invención describe también que compuestos identificados en los métodos de selección descritos anteriormente, se pueden usar en un método para modular la actividad de un receptor metabotrópico de glutamato que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1, o una porción o equivalente funcional, que incluye la etapa de poner en contacto el receptor con un compuesto que modula una o más actividades del receptor metabotrópico de glutamato, 35 en general activando o inhibiendo la activación del receptor.

El receptor metabotrópico de glutamato se pone en contacto con una cantidad suficiente de un compuesto para modular la actividad de un receptor metabotrópico de glutamato. La modulación del receptor metabotrópico de glutamato produce un incremento o reducción en una respuesta celular que se produce tras la activación del receptor 40 metabotrópico de glutamato, según se describe en la descripción detallada, más adelante. Típicamente, el compuesto mimetiza uno o más efectos del glutamato sobre el receptor metabotrópico de glutamato, o bloquea uno o más efectos del glutamato sobre el receptor metabotrópico de glutamato (o, potencialmente, ambos). El método se puede realizar *in vitro* o *in vivo*.

45 El término “mimetiza”, significa que el compuesto produce un efecto similar al presentado como respuesta a la puesta en contacto del receptor con glutamato. “Bloquea” significa que la presencia del compuesto evita uno o más de los efectos normales de la puesta en contacto del receptor con glutamato.

En el contexto de esta invención, “*in vitro*” significa que un proceso no se realiza en una célula o células vivas o 50 mediante las mismas. Sin embargo, el proceso puede usar membranas celulares y otras partes celulares, o incluso células completas, pero no vivas. “*In vivo*” significa que el proceso se realiza en una célula o células vivas o mediante las mismas y, por tanto, incluye procesos realizados en organismos complejos, como mamíferos, o mediante los mismos.

Asimismo, la presente invención describe métodos de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad o 55 trastorno que está relacionado con el nuevo mGluR de esta invención o que puede estar afectado por el mismo, y/o por la modulación de la actividad de este mGluR. En general, estos métodos implican alterar o modular una o más actividades del mGluR, administrando un compuesto o composición al paciente. Los métodos implican administrar al paciente que padece la enfermedad, estado o trastorno, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que 60 modula la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, inhibe la expresión del receptor, o proporciona receptores funcionales. Tales compuestos pueden incluir, por ejemplo, pequeñas moléculas, así como polímeros, p.ej., ácidos nucleicos. Se pueden tratar diversas enfermedades o estados, incluyendo una enfermedad o trastorno neurológico, como uno seleccionado preferiblemente del grupo consistente en enfermedades neurodegenerativas, excitotoxicidad de glutamato, ictus isquémico y hemorrágico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño celular nervioso inducido por hipoxia, y epilepsia. En realizaciones preferidas, la enfermedad neurodegenerativa es 65 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

La presente invención también describe la posibilidad de usar compuestos que modulan la actividad de un receptor metabotrópico de glutamato que tiene la secuencia SEQ ID N°:1, en un método de tratamiento que implica la ad-

ES 2 292 193 T3

ministración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que modula la actividad de un receptor metabotrópico de glutamato (es decir, un modulador del receptor metabotrópico de glutamato), que tiene la secuencia SEQ ID N°:1. (Por tanto, el modulador puede modular también la actividad de equivalentes funcionales). Según se indica, en una realización preferida, el paciente tiene una enfermedad o trastorno neurológico. Asimismo, en 5 una realización preferida, el compuesto produce efecto sobre una actividad fisiológica o patofisiológica. A modo de ilustración y no de limitación, ésta puede incluir convulsiones, neuroprotección, muerte neuronal, desarrollo neuronal, control central de la actividad cardíaca, despertar, control de movimientos y control del reflejo vestíbulo-ocular.

10 La presente invención se refiere también al uso de una molécula de ácido nucleico según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado del grupo consistente en excitotoxicidad de glutamato, ictus isquémico o hemorrágico global o focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño de células nerviosas inducido por hipoxia, epilepsia, o enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

15 El ácido nucleico se puede administrar usando técnicas estándar, como mediante el uso de vectores retrovíricos y liposomas.

20 En otro aspecto relacionado, el método de tratamiento implica administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico que inhibe la expresión de un receptor metabotrópico de glutamato, preferiblemente un receptor que consiste esencialmente en la SEQ ID N°:1.

25 Por tanto, la presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que inhibe específicamente la expresión de un receptor metabotrópico de glutamato, en la que dicho receptor metabotrópico de glutamato comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos aminoácidos 894 a 908 mostrados en la Figura 1, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como al uso de una molécula de ácido nucleico que inhibe específicamente la expresión de un receptor metabotrópico de glutamato, en la que dicho receptor metabotrópico de glutamato comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos aminoácidos 894 a 908 mostrados en la Figura 1, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico, 30 seleccionado del grupo consistente en excitotoxicidad de glutamato, ictus isquémico o hemorrágico global o focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño de células nerviosas inducido por hipoxia, epilepsia, o enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

35 Los ácidos nucleicos capaces de inhibir la expresión de un receptor metabotrópico de glutamato incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas y ácido nucleico susceptible de combinarse a través de recombinación homóloga con un gen endógeno que codifica el receptor. Sitios elegidos como objetivo del ácido nucleico inhibidor incluyen promotores, otros reguladores que actúan sobre los promotores, RNAm, RNAm tratado previamente, y DNA genómico. La administración se puede realizar proporcionando un transgen que codifica la sustancia o mediante cualquier otro 40 método adecuado, dependiendo del uso al que se destine al método en particular. Preferiblemente, la enfermedad o trastorno a tratar mediante la administración de un ácido nucleico de los aspectos precedentes, se caracteriza por una o más de las siguientes características: (1) un nivel anormal de un mensajero, cuya producción o secreción está afectada por la actividad del receptor metabotrópico de glutamato; y (2) un nivel o actividad anormales de un mensajero cuya función está afectada por la actividad del receptor metabotrópico de glutamato.

45 Un “paciente” se refiere a un mamífero en el que la modulación de un receptor metabotrópico de glutamato tendrá un efecto beneficioso. Se pueden identificar pacientes que precisan tratamiento que implique la modulación de receptores metabotrópicos de glutamato, usando técnicas estándar conocidas por los profesionales médicos. Preferiblemente, un paciente es un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno caracterizado por una o más de las siguientes 50 características: (1) actividad anormal del receptor metabotrópico de glutamato (2) un nivel anormal de un mensajero, cuya producción está afectada por la actividad del receptor metabotrópico de glutamato; y (3) un nivel o actividad anormales de un mensajero cuya función está afectada por la actividad del receptor metabotrópico de glutamato.

55 “Cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad de una sustancia que alivia en alguna medida uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno en el paciente; o devuelve a la normalidad, bien parcial o completamente, uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con la enfermedad o productores de la misma.

Con respecto a un receptor metabotrópico de glutamato, “que funciona” o “funcional”, indica que el receptor tiene 60 al menos alguna de las actividades biológicas relevantes que tiene tal receptor bajo condiciones biológicas normales (receptor normal bajo condiciones celulares normales) y, preferiblemente, sustancialmente la totalidad de tales actividades. Estas pueden incluir, por ejemplo, características de unión específicas y actividad enzimática específica (entre otras).

65 La presente invención también describe sustancias (p.ej., compuestos y composiciones farmacéuticas), capaces de unirse al receptor metabotrópico de glutamato que tiene la secuencia SEQ ID N°:1, o a una de sus porciones o equivalentes funcionales. Preferiblemente, la sustancia puede modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato.

ES 2 292 193 T3

La presente invención también describe una composición farmacéutica constituida por un modulador del receptor metabotrópico de glutamato y un vehículo fisiológicamente aceptable. Tales sustancias se pueden usar para tratar pacientes modulando la actividad del receptor metabotrópico de glutamato.

5 Una sustancia o composición farmacéutica se refiere a una sustancia o composición en una forma adecuada para administración a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Las consideraciones que conciernen a formas adecuadas de administración se conocen en la técnica e incluyen los efectos tóxicos, solubilidad, vía de administración, y actividad de mantenimiento. Por ejemplo, las sustancias o composiciones farmacológicas inyectadas en la corriente sanguínea deberían ser solubles. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular también como sales aceptables
10 (p.ej., sales de adición) y sus complejos. La preparación de tales sales puede facilitar el uso farmacológico de una sustancia, alterando sus características sin evitar que ejerza un efecto fisiológico.

Otro aspecto de la invención proporciona un aglutinante que se fija a un receptor metabotrópico de glutamato, que es un anticuerpo purificado que se fija selectivamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de
15 los residuos 894 a 908, mostrada en SEQ ID N°:1. El aglutinante se fija preferiblemente al polipéptido especificado. Esto significa que, en condiciones de sustancia limitada y números iguales de polipéptidos accesibles, se fijará mayor número (fracción) del polipéptido especificado al aglutinante que de otros polipéptidos.

En una realización preferida adicional, el aglutinante es un anticuerpo que está acoplado a una toxina. Los aglutinantes acoplados a una toxina se pueden usar para suministrar la toxina a una célula que contiene un receptor particular. Por ejemplo, un anticuerpo acoplado a una toxina dirigida a una célula cancerosa caracterizada por un receptor anormal, puede destruir selectivamente la célula cancerosa.
20

Los anticuerpos susceptibles de unirse a los receptores metabotrópicos de glutamato tienen varios usos, p.ej., el uso
25 como sustancias terapéuticas para modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato; como herramientas diagnósticas para determinar el número y/o localización y/o integridad funcional del receptor metabotrópico de glutamato para diagnosticar una enfermedad relacionada con el glutamato; y como herramientas de investigación para estudiar la síntesis, estructura y función del receptor. Por ejemplo, los anticuerpos direccionalmente al receptor metabotrópico de glutamato son útiles para elucidar a qué porción del receptor se fija una molécula particular, p.ej. el ligando natural.
30

En otro aspecto, la invención describe un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un paciente, caracterizada por un número anormal de los nuevos receptores metabotrópicos de glutamato, o una alteración del nuevo receptor metabotrópico de glutamato. Tales alteraciones pueden, por ejemplo, incluir alteraciones de secuencia, actividad alterada y localización alterada. El método implica identificar el número y/o localización y/o integridad funcional de uno o más receptores metabotrópicos de glutamato, que comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos 894 a 908, mostrada en SEQ ID N°:1. El número y/o localización y/o integridad funcional se compara con la observada en pacientes caracterizados como normales o enfermos, como una indicación de la presencia de la enfermedad o trastorno.
40

Se pueden realizar diagnósticos usando aglutinantes que se fijan al receptor metabotrópico de glutamato. Por ejemplo, se pueden usar para los diagnósticos moduladores del receptor metabotrópico de glutamato y anticuerpos que se fijan a receptores metabotrópicos de glutamato. Preferiblemente, las sustancias que se fijan están marcadas con un resto detectable, como un radioisótopo, una enzima (p.ej., fosfatasa alcalina), un marcador fluorescente, un átomo pesado, u otro marcador conocido en la técnica, o con un marcador que se fija a otra molécula con un resto detectable (p.ej., biotina/avidina).
45

Un receptor alterado tiene una estructura diferente de la que tiene el receptor en individuos normales, y está asociado con una enfermedad o trastorno que implica un receptor metabotrópico de glutamato. Tales alteraciones
50 pueden afectar a la función del receptor, y se pueden detectar analizando una diferencia estructural entre el receptor alterado y normal. Los aglutinantes que se fijan a un receptor alterado, pero no a uno normal, se pueden usar para determinar la presencia de un receptor alterado. Adicionalmente, se puede usar un aglutinante que puede unirse a un receptor normal, pero no a un receptor particular alterado, para determinar la presencia de un receptor alterado particular.
55

De forma similar, se puede determinar el número de receptores usando aglutinantes que se fijan al receptor analizado para las mismas. Tales pruebas implican generalmente el uso de un aglutinante marcado, y se pueden realizar usando formatos estándar, como pruebas competitivas, no competitivas, homogéneas y heterogéneas.

60 En otras realizaciones preferidas, el método es un inmunoanálisis en el que se usa un anticuerpo frente a un receptor metabotrópico de glutamato para identificar el número y/o localización y/o integridad funcional de los receptores metabotrópicos de glutamato; la presencia de un cáncer, p.ej., un tumor ectópico del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico, se analiza midiendo el número o alteración de receptores metabotrópicos de glutamato.

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 (SEQ ID N°:1) muestra la secuencia de aminoácidos completa de la nueva proteína mGluR8 humana, usando las abreviaturas de una letra estándar para aminoácidos.

5 La Figura 2 (SEQ ID N°:2) muestra la secuencia 5' a 3' de la hebra codificadora del DNAc de CCX-1, que contiene un marco de lectura abierto que codifica la nueva proteína mGluR8 humana (nucleótidos 1 a 2724. Se usan las abreviaturas de una letra estándar G, A, T y C para los desoxinucleótidos-trifosfato).

10 La Figura 3 (SEQ ID N°:3) muestra la secuencia nucleotídica 5' a 3' parcial de la hebra codificadora del fragmento de PCR FF6.175. Esta secuencia nucleotídica corresponde a los nucleótidos 2154 a 2319 en la secuencia nucleotídica CCX-1.

15 La Figura 4 (SEQ ID N°:4) muestra la secuencia nucleotídica 5' a 3' de la hebra codificadora del fragmento de PCR X120.15. Esta secuencia nucleotídica corresponde a los nucleótidos 2163 a 2283 en la secuencia nucleotídica CCX-1; y a los nucleótidos 10 a 130 en la secuencia nucleotídica FF6.175.

20 La Figura 5 (SEQ ID N°:5) muestra la secuencia nucleotídica 5' a 3' del marco de lectura abierto en el DNAc de CCX-1 (SEQ ID N°:2), nucleótidos 1 a 2724. Esta secuencia codifica la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°:1).

25 La Figura 6A representa la estrategia de diseño del cebador de PCR para el experimento de variantes de escisión descrito en el Ejemplo 2. Las representaciones gráficas de las secuencias mGluR8 de ratón y mGluR humana se comparan para el diseño de cebadores que flanquean la región variante de escisión putativa.

30 La Figura 6B muestra los resultados del experimento de variante de escisión, descrito en el Ejemplo 2.

La Figura 7 muestra los resultados del experimento de activación funcional descrito en el Ejemplo 4.

Descripción detallada

35 Se ha descrito en la literatura científica la clonación de ocho subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato procedentes de rata o ratón. Estos incluyen: mGluR1 de rata (Masu *et al.* *Nature* 349:760, 1991; Houamed *et al.*, *Science* 252:1318, 1991, Pin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10331, 1992), mGluR2 de rata (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8:169, 1992), mGluR3 de rata (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8:169, 1992), mGluR4 de rata (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8:169, 1992), mGluR5 de rata (Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:13361, 1992), mGluR6 de rata (Nakajima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:11868, 1993), mGluR7 de rata (Okamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:1231, 1994; Saugstad *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 45:367, 1994) y mGluR8 de ratón (Duovoisin *et al.*, *J. Neuroscience* 15:3075, 1995). También se ha descrito la clonación de los subtipos de receptor metabotrópico de glutamato humano mGluR1 (Lin *et al.*, *Soc. Neurosci. Abstr.* 20:468, 1994), mGluR2 (Flor *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, en impresión, Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995), mGluR4 (Flor *et al.*, *Neuropharmacol.* 34:149, 1994), mGluR5 (Minakami *et al.*, *Biochem., Biophys. Res. Commun.* 199:1136, 1994) y mGluR7 (Flor *et al.*, *Soc. Neurosci. Abstr.* 20:468, 1994).

40 La solicitud de patente internacional N° PCT/US91/09422, presentada el 12 de diciembre de 1991, proporciona receptores de glutamato acoplados a proteína G, aislados y clonados de ratas. La solicitud de patente europea N° 93303520.6, presentada el 6 de mayo de 1993, proporciona un receptor metabotrópico de glutamato y compuestos de DNA relacionados, descritos por los solicitantes como un mGluR1 humano. El objeto de la presente invención es un nuevo receptor metabotrópico de glutamato. El nuevo receptor de la presente invención es un receptor metabotrópico de glutamato humano que está relacionado con los receptores metabotrópicos de glutamato del Grupo III, que incluyen mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8.

45 50 El solicitante es el primero en presentar el nuevo receptor metabotrópico de glutamato humano de la presente invención, así como el primero en determinar la secuencia del ácido nucleico.

55 Lo siguiente es una lista de algunos de los términos usados en la presente descripción. Estos términos se tienen que entender a la luz de la descripción completa proporcionada aquí.

“Analgésico” significa un compuesto capaz de aliviar el dolor, alterando la percepción de estímulos nociceptivos, sin producir anestesia que origine la pérdida de conciencia.

60 “Actividad analgésica” significa la capacidad de reducir el dolor como respuesta a un estímulo que sería, normalmente, doloroso.

65 “Actividad anticonvulsiva” significa eficacia para reducir las convulsiones, como aquellas producidas por ataques epilépticos parciales simples, ataques epilépticos parciales complejos, estado epiléptico y ataques epilépticos inducidos por traumatismos, como los que suceden tras una lesión craneal, incluyendo cirugía craneal.

“Aglutinante” significa una molécula, como una pequeña molécula, ligando, anticuerpo o toxina, que se fija a un receptor y puede modular o no la actividad de dicho receptor.

ES 2 292 193 T3

“Actividad promotora de la cognición” significa la capacidad de promover la adquisición de memoria o la realización de una tarea aprendida. Asimismo, “actividad promotora de la cognición” significa la capacidad de promover los procesos del pensamiento racional normal y razonamiento.

- 5 “Potenciador de cognición” significa un compuesto capaz de potenciar el aprendizaje y la memoria.
- “Eficacia” significa que un nivel significativo de la actividad deseada es detectable con un compuesto elegido; “significativa” significa una significancia estadística de nivel $p<0,05$.
- 10 “Hiperalgesia” significa una respuesta incrementada a un estímulo que es, normalmente, doloroso.
- “Efecto secundario mínimo” significa que cualquier efecto secundario del fármaco se tolera por un individuo promedio, y, por tanto, el fármaco se puede usar para terapia de la enfermedad o trastorno elegidos como objetivo. Tales efectos secundarios se conocen bien en la técnica. Preferiblemente, efectos secundarios mínimos son aquellos 15 que se considerarían tolerables para la aprobación del fármaco por la FDA para una enfermedad o trastorno elegidos como objetivo.
- “Modular” significa producir un incremento o reducción en la actividad de un receptor celular.
- 20 “Relajante muscular” significa un compuesto que reduce la tensión muscular.
- “Neuralgia” significa dolor en la distribución de un nervio o nervios.
- “Trastorno o enfermedad neurológica” significa un trastorno o enfermedad del sistema nervioso. Ejemplos de trastornos y enfermedades neurológicas incluyen ictus isquémico y hemorrágico focal y global, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño de las células nerviosas inducido por hipoxia, como en el paro cardíaco o el sufrimiento neonatal, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas.
- 25 “Enfermedad neurodegenerativa” significa una enfermedad neurológica que afecta a las células del sistema nervioso central, produciendo la reducción progresiva de la capacidad de las células del sistema nervioso para funcionar apropiadamente. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, y enfermedad de Parkinson.
- 30 “Actividad neuroprotectora” significa eficacia en la prevención de la muerte de células neuronales, como la producida por trastornos o enfermedades neurológicas.
- “Activo” significa que el compuesto tiene un valor EC_{50} (concentración que produce una activación igual a la mitad de la máxima), o IC_{50} (concentración que produce una inhibición igual a la mitad de la máxima), o K_d (concentración que produce una unión igual a la mitad de la máxima) sobre un receptor metabotrópico de glutamato, con respecto a una 35 o más actividades del receptor, inferior a $10 \mu M$, más preferiblemente inferior a $100 nM$, e incluso más preferiblemente inferior a $1 nM$.
- “Selectivo” significa que el compuesto activa, inhibe la activación y/o se fija a un subtipo de receptor metabotrópico de glutamato determinado, a una concentración inferior a la que el compuesto activa un receptor ionotrópico de glutamato, inhibe su activación y/o se fija al mismo, o más preferiblemente a otro subtipo de receptor metabotrópico de glutamato de un grupo de clasificación diferente, o incluso más preferiblemente a otro subtipo de receptor metabotrópico de glutamato del mismo grupo de clasificación. Preferiblemente, la diferencia de concentración es de 10 veces, más preferiblemente de 50 veces, e incluso más preferiblemente de 100 veces.
- 40 “Cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad de un compuesto que produce el efecto terapéutico deseado en un paciente. Por ejemplo, en referencia a una enfermedad o trastorno, es la cantidad que reduce en alguna medida uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y transforma en normales, bien parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados o causantes de la enfermedad o trastorno. Cuando se usa para tratar terapéuticamente a un paciente, es una cantidad que se espera que esté entre $0,1 mg/kg$ y $100 mg/kg$, preferiblemente menos de $50 mg/kg$, más preferiblemente menos de $10 mg/kg$, más preferiblemente menos de $1 mg/kg$. Preferiblemente, la cantidad proporciona una concentración efectiva en el receptor metabotrópico de glutamato de aproximadamente $1 nM$ a $1 \mu M$ del compuesto. La cantidad de compuesto depende de su EC_{10} (IC_{50} en el caso de un antagonista) y de la edad, tamaño y enfermedad asociada con el paciente.
- 45 60 I. Técnicas
- A. Secuencia de ácido nucleico del nuevo *mGluR*
- La invención describe secuencias de ácido nucleico que codifican receptores y fragmentos de receptores metabotrópicos de glutamato, según se definieron aquí anteriormente.
- Las secuencias de ácido nucleico se pueden obtener mediante ingeniería genética de forma que permitan la expresión de las secuencias del receptor en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, la secuencia codificadora

ES 2 292 193 T3

completa o uno de sus fragmentos, se puede combinar con uno o más de los siguientes en un vector de expresión apropiado, para permitir tal expresión: (1) una secuencia promotora exógena; (2) un sitio de unión a ribosoma; (3) una señal de poliadenilación; (4) una señal de secreción. La modificación se puede realizar en las secuencias no traducidas en el extremo 5', para incrementar la expresión en una célula procariótica o eucariótica; o se pueden modificar los 5 codones, de forma que aunque codifiquen idéntico aminoácido, ese codón pueda ser un codón preferido en el sistema de expresión elegido. El uso de tales codones preferidos se describe, por ejemplo, en Grantham *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 9:43-74 (1981), y Lathe, *J. Mol. Biol.*, 183:1-12 (1985), incorporados aquí en su totalidad mediante referencia. En una 10 realización preferida de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico es la de SEQ ID Nº:2, que codifica un receptor metabotrópico de glutamato nuevo. En una realización preferida adicional, la secuencia de ácido nucleico es la de SEQ ID Nº:5.

Además, una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor particular, proporciona herramientas adicionales para obtener otros receptores relacionados, por ejemplo, proporcionando sondas de análisis de hibridación de ácidos nucleicos. Adicionalmente, las secuencias de ácido nucleico que codifican dos o más receptores diferentes pero 15 relacionados, se pueden analizar para determinar regiones localizadas de conservación de secuencia. Estas regiones de ácido nucleico conservadas son útiles como sondas de hibridación; o, alternativamente, permiten el diseño y síntesis de sondas de hibridación, que se pueden usar para obtener ácidos nucleicos clonados que codifican otros miembros de una superfamilia de receptores. Las secuencias conservadas se pueden deducir de un análisis de la secuencia de ácido 20 nucleico completa SEQ ID Nº:2, y de la comparación de esa secuencia con las secuencias nucleotídicas que codifican otros mGluRs.

“Regiones de ácido nucleico conservadas” se refiere a regiones incluidas en dos o más ácidos nucleicos que codifican receptores metabotrópicos de glutamato, con las cuales puede hibridar un ácido nucleico complementario particular bajo condiciones menos restrictivas. Ejemplos de condiciones menos restrictivas, adecuadas para detectar 25 ácidos nucleicos que codifican receptores metabotrópicos de glutamato se proporcionan en los ejemplos más adelante y en Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 19:13361 (1992) (incorporado aquí mediante referencia). Preferiblemente, las regiones de ácido nucleico conservadas difieren en no más de 7 de cada 20 nucleótidos.

Los usos de ácidos nucleicos que codifican receptores o fragmentos de receptores clonados, incluyen uno o más 30 de los siguientes: (1) producir proteínas receptoras que se pueden usar, por ejemplo, para determinación estructural, para analizar una actividad de la molécula sobre un receptor, y para obtener anticuerpos que se fijen al receptor; (2) secuenciarlos para determinar la secuencia de nucleótidos de un receptor, que se puede usar, por ejemplo, como base para la comparación con otros receptores para determinar las regiones conservadas, determinar secuencias nucleotídicas únicas para receptores normales y alterados, y determinar secuencias nucleotídicas para usarlas como sitios elegidos como objetivo para ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, sondas de detección de hibridación, o sondas 35 de amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (3) como sondas de detección de hibridación para detectar la presencia de un receptor nativo y/o un receptor relacionado en una muestra; y (4) como cebadores de PCR para producir regiones de secuencia de un ácido nucleico particular, por ejemplo para producir regiones destinadas a 40 sondarse mediante sondas de detección de hibridación.

En general, las moléculas de ácido nucleico de esta invención tienen secuencias de ácido nucleico que codifican 45 receptores metabotrópicos de glutamato completos, fragmentos de receptores metabotrópicos de glutamato, derivados de los receptores metabotrópicos de glutamato completos y derivados de fragmentos de receptores metabotrópicos de glutamato, útiles en la presente invención. Éstas incluyen secuencias de ácido nucleico que comprenden las secuencias proporcionadas en SEQ ID Nº:2, SEQ ID Nº:5, o secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de proteína 50 proporcionada en SEQ ID Nº:1, o sus hebras complementarias. Las moléculas de ácido nucleico según la invención se pueden usar también para aislar secuencias de ácido nucleico que hibridan en condiciones restrictivas con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID Nº:2 o SEQ ID Nº:5, o con sus fragmentos; y secuencias de ácido nucleico que, excepto por la degeneración del código genético, hibridarían con las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID Nº:2 o SEQ ID Nº:5. Las ventajas de un ácido nucleico de mayor longitud incluyen producir fragmentos de proteína de mayor longitud que tienen la secuencia de un receptor metabotrópico de glutamato, que se pueden usar, por ejemplo, para producir anticuerpos; especificidad de la sonda de ácido nucleico incrementada, bajo condiciones de análisis de hibridación más restrictivas; y más especificidad para el ácido nucleico relacionado con el receptor metabotrópico de 55 glutamato, bajo condiciones de análisis de hibridación menos restrictivas.

Para los fines mencionados anteriormente, se puede usar una molécula de ácido nucleico, p.ej., una región de secuencia de ácido nucleico de al menos 15, 25, 35 o, preferiblemente, 55 nucleótidos contiguos, complementarios sustancialmente a la región de secuencia de SEQ ID Nº:5. Ventajosamente, están incluidos en la región de la secuencia de ácido nucleico al menos tres, nueve, 15 o, más preferiblemente, al menos 25 nucleótidos contiguos de las secuencias 60 de ácido nucleico proporcionadas en los nucleótidos 2678 a 2724 de SEQ ID Nº:5.

De forma similar, la presente invención describe un ácido nucleico que codifica un receptor metabotrópico de glutamato o uno de sus fragmentos, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos seis, preferiblemente al menos 12, 18, 30 o 54 aminoácidos contiguos o, en ciertas realizaciones, más preferiblemente al 65 menos 9 o 15 aminoácidos contiguos proporcionados en los residuos 894 a 908 de SEQ ID Nº:1. En otras realizaciones, el ácido nucleico codifica además una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1 a 893 de la SEQ ID Nº:1, o el ácido nucleico codifica adicionalmente una secuencia de aminoácidos homóloga a la secuencia de 15 aminoácidos en la cola carboxi del mGluR8 de ratón.

ES 2 292 193 T3

Además, el ácido nucleico puede ser complementario con la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión extracelular o el dominio transmembranal.

- El ácido nucleico que codifica tales dominio, puede estar acoplado transcripcionalmente con una segunda secuencia de ácido nucleico de una proteína receptora no metabotrópica de glutamato. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico derivada del nuevo receptor aquí descrito, que codifica el dominio extracelular, se puede acoplar transcripcionalmente a un segundo ácido nucleico que codifica el dominio codificador transmembranal e intracelular de un receptor no metabotrópico de glutamato, o un dominio de unión extracelular se puede acoplar transcripcionalmente a un segundo ácido nucleico que codifica el dominio de unión transmembranal e intracelular de un receptor metabotrópico de glutamato que es un miembro de una clase o subclase diferente de mGluR que el receptor de secuencia SEQ ID N°:1. Tales ácidos nucleicos que codifican fragmentos de receptores y receptores químicos, se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente en tramitación DE EE.UU. N°. 60/001.526, incorporada aquí en su totalidad mediante referencia. Debido a la degeneración del código genético, diferentes combinaciones de nucleótidos pueden codificar el mismo polipéptido. Por tanto, numerosos receptores metabotrópicos de glutamato y fragmentos de receptores que tienen la misma secuencia de aminoácidos, pueden ser codificados por diferentes secuencias de ácido nucleico.

1. Clonación usando sondas y cebadores de hibridación

El método preferido actualmente para aislar el ácido nucleico de mGluR se basa en la detección por hibridación. Se pueden usar cebadores o sondas específicos de región, derivados de un ácido nucleico que codifica un receptor metabotrópico de glutamato como la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N°:2, o un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1, para iniciar la síntesis de DNA y la amplificación PCR, así como para identificar colonias bacterianas o placas de fagos que contienen DNA clonado que codifica un miembro de la familia de mGluR, usando métodos conocidos (p.ej., Innis *et al.*, *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego, CA (1990); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

a. Clonación PCR

La especificidad de la hibridación de cebadores para direccionarse al ácido nucleico que codifica un mGluR, se puede ajustar variando las condiciones de hibridación. Cuando se realiza la hibridación en condiciones muy restrictivas de 50-60°C, las secuencias que presentan una homología respecto al cebador superior a aproximadamente 76% se amplificarán. Cuando se emplean condiciones poco restrictivas, realizando la hibridación a 35-37°C, las secuencias que tienen una homología respecto al cebador superior a aproximadamente 40-50% se amplificarán.

El análisis de los receptores metabotrópicos de glutamato indica que son receptores acoplados a la proteína G, que tienen siete dominios transmembranales putativos conservados. Un enfoque particularmente útil es emplear cebadores degenerados, homólogos a los dominios transmembranales putativos conservados y amplificar regiones de DNA que codifican esas secuencias, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por tanto, tales cebadores oligonucleotídicos se mezclan con DNA genómico o DNAc preparado de RNA aislado del tejido elegido y se realiza la PCR. Se puede requerir cierta experimentación para amplificar específicamente nuevas secuencias receptoras acopladas a la proteína G del tejido elegido, ya que éstas no son necesariamente idénticas a los receptores acoplados a la proteína G ya conocidos, pero esto es bien conocido por los técnicos medios en la materia (véase, por ejemplo, Buck, L. y Axel, R. (1991) *Cell*, 65:175-187).

b. Sondas de análisis de hibridación

Se pueden diseñar sondas de análisis de hibridación basándose en información de secuencia obtenida de mGluRs clonados y secuencias de aminoácidos que codifican tales receptores, como el nuevo mGluR que es el objeto de esta invención. Se pueden diseñar sondas de análisis de hibridación para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico particular elegida como objetivo, perfectamente complementaria a la sonda, y secuencias elegidas como objetivo de menor complementariedad, variando las condiciones de hibridación y el diseño de la sonda.

Se pueden diseñar y usar sondas de DNA direccionaladas a receptores metabotrópicos de glutamato bajo diferentes condiciones de hibridación, para controlar el grado de especificidad requerido para la hibridación a una secuencia elegida como objetivo. Los factores que afectan al diseño de la sonda, como longitud, contenido de G y C, posible auto-complementariedad, y condiciones de lavado, se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), incorporado aquí mediante referencia. Sambrook *et al.*, *Molecular cloning*, también analiza el diseño y uso de sondas degeneradas basándose en la información de la secuencia polipeptídica.

Como directriz general, se pueden usar condiciones muy restrictivas (hibridación a 50-65°C, 5X SSPC, formamida al 50%, lavado a 50-65°C, 0,5X SSPC) para obtener hibridación entre secuencias de ácido nucleico que tienen regiones que tienen más de aproximadamente 90% de complementariedad. Se pueden usar condiciones poco restrictivas (hibridación a 35-37°C, 5X SSPC, formamida al 40-45%, lavado a 42°C 2X SSPC), de forma que las secuencias que tienen regiones que tienen más del 35-45% de complementariedad hibridarán con la sonda.

Se pueden usar muchos tejidos o células como fuente de DNA genómico incluyendo, por ejemplo, placenta o leucocitos sanguíneos periféricos. Sin embargo, con respecto al RNA, la fuente más preferida es un tejido o tipo celular que expresa niveles elevados del miembro deseado de la familia de receptores metabotrópicos de glutamato.

ES 2 292 193 T3

B. Nuevos derivados de ácidos nucleicos de receptores metabotrópicos de glutamato

Las secuencias de ácido nucleico aisladas de la invención se pueden usar también para la creación de ácidos nucleicos modificados con utilidad práctica. La secuencia de ácido nucleico puede mutar *in vitro* o *in vivo*, para, por ejemplo (1) crear variaciones en regiones codificadoras, generando así variantes o derivados de receptores metabotrópicos de glutamato; (2) formar nuevos sitios de endonucleasas de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar la modificación *in vitro* posterior o (3) formar nuevos sitios de escisión para crear variantes de escisión de mGluR. Para crear tales mutaciones se pueden usar técnicas recombinantes estándar para mutagénesis, como mutagénesis dirigida (Hutchinson *et al.*; *J. Biol. Chem.* 253:6551, (1978), Sambrook *et al.*, Capítulo 15, más arriba), uso de conectores TAB® (Pharmacia) y mutagénesis dirigida por PCR. Adicionalmente, las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden obtener mediante ingeniería genética y recombinarse con ácidos nucleicos que codifican otros receptores, para formar ácidos nucleicos que codifican receptores químéricos. Tales ácidos nucleicos que codifican receptores químéricos se describen, por ejemplo, en la solicitud DE EE.UU. Nº. 60/001.526, en tramitación, incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

Fragmentos de receptor preferidos incluyen aquellos que tienen actividad de receptor funcional, un sitio de unión, un epítopo para reconocimiento de anticuerpos (típicamente al menos seis aminoácidos), y/o un sitio que se fija a un agonista o antagonista de un receptor metabotrópico de glutamato. Otros fragmentos de receptor preferidos incluyen aquellos que tienen sólo una porción extracelular, una porción transmembranal, una porción intracelular y/o una porción transmembranal múltiple (p.ej. porción de siete dominios transmembranales). Tales fragmentos de receptores presentan varios usos, como su uso para obtener anticuerpos frente a una región particular y su uso para formar receptores químéricos con fragmentos de otros receptores para crear un nuevo receptor que tiene propiedades únicas. Tales fragmentos de receptor purificados y receptores químéricos se describen, por ejemplo, en la solicitud de EE.UU Nº 60/001.526 en tramitación, incorporada aquí mediante referencia en su totalidad. Por tanto, la invención describen asimismo la posibilidad de preparar derivados de receptores metabotrópicos de glutamato completos y sus fragmentos que tengan la misma, o sustancialmente la misma actividad que el receptor metabotrópico de glutamato completo original o fragmento. Tales derivados incluyen una o varias adiciones, una o varias sustituciones, y una o varias delecciones respecto al receptor, que no evitan que el derivado del receptor realice una o más de las actividades del receptor original. Los equivalentes funcionales de una proteína receptora metabotrópica de glutamato incluyen, pero no están limitados a tales derivados.

C. Oligonucleótidos antisentido y ribozimas

Los oligonucleótidos antisentido y ribozimas se pueden direccionar a un ácido nucleico que codifique un receptor metabotrópico de glutamato, e inhibir la expresión de proteínas desde el ácido nucleico elegido como objetivo. Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar los efectos de ácidos nucleicos antisentido. Por ejemplo, véanse Helene, C. y Toulme, J. *Biochem. et Biophysica Acta* 1049:99 (1990), y Uhlmann, E. y Peyman, A., *Chemical Reviews* 90:543 (1990). Los mecanismos propuestos incluyen hibridación de un oligonucleótido antisentido con el RNAm naciente, produciendo una terminación prematura de la transcripción, e interfiriendo con el tratamiento del RNAm, mediante hibridación con una unión intrón/exón del RNAm precursor. Estos y otros mecanismos diversos propuestos para inhibir la actividad de los ácidos nucleicos mediante un oligonucleótido antisentido se basan en la capacidad de un ácido nucleico antisentido para hibridar con una secuencia de ácido nucleico elegida como objetivo. Preferiblemente, los ácidos nucleicos antisentido son de 15 a 30 bases de longitud.

Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas, capaces de catalizar la escisión específica de RNA. La acción de las ribozimas implica una interacción específica de secuencia de la ribozima con RNA complementario elegido como objetivo, seguido de una escisión endonucleolítica. Se pueden obtener mediante ingeniería genética diversos motivos de corte, como cabeza de martillo, para catalizar específicamente y eficientemente la escisión endonucleolítica de secuencias de RNA específicas que codifican receptores metabotrópicos de glutamato.

Los sitios de escisión específicos de ribozimas incluyen GUA, GUU y GUC. Una vez identificados los sitios de escisión, se pueden evaluar secuencias de RNA cortas, de entre 15 y 20 ribonucleótidos, direccionadas a la región del RNA elegido como objetivo que contiene el sitio de escisión, para características estructurales predichas para determinar la adecuación de la ribozima. La adecuación de objetivos candidato se puede evaluar también analizando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando pruebas de protección de ribonucleasa. Véase Draper PCT WO 93/23569, incorporada aquí mediante referencia.

Los oligonucleótidos antisentido y ribozimas se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica para la síntesis de moléculas de RNA y DNA. Técnicas estándar para sintetizar químicamente ácidos nucleicos incluyen la síntesis química de fosforamidita en fase sólida. También se pueden producir ácidos nucleicos específicos enzimáticamente, usando un hospedador transformado con un plásmido que codifica el ácido nucleico deseado.

Se pueden introducir varias modificaciones en el ácido nucleico para incrementar la estabilidad intracelular y la semivida. Modificaciones posibles incluyen modificaciones en la cadena principal fosfodiéster, como el uso de uniones fósforo-tioato o metil-fosfonato.

En una realización preferida de la presente invención, los oligonucleótidos antisentido y ribozimas se direccionan a un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoácida SEQ ID Nº:1. Se prefieren mejor oligonucleótidos antisentido y ribozimas direccionalos a un fragmento de ácido nucleico de SEQ ID Nº:2.

ES 2 292 193 T3

D. Terapia génica y oligonucleotídica

La terapia génica y oligonucleotídica incluye el uso de un ácido nucleico que codifica un receptor metabotrópico de glutamato funcional, y el uso de oligonucleótidos inhibidores. Los oligonucleótidos inhibidores incluyen ácidos nucleicos antisentido y ribozimas. La terapia génica y oligonucleotídica se puede realizar *ex vivo* sobre células que luego se transplantan a un paciente, o se puede realizar mediante administración directa del ácido nucleico o complejo de ácido nucleico-proteína al paciente.

Los oligonucleótidos antisentido y ribozimas se pueden administrar a un paciente usando diferentes técnicas, como ácido nucleico desnudo, composiciones de ácidos nucleicos (por ejemplo, encapsuladas mediante un liposoma) y mediante vectores retrovíricos. Miller, *Nature* 357, 455-460, incorporada aquí mediante referencia. Los oligonucleótidos antisentido y ribozimas se pueden introducir asimismo en una célula, usando un ácido nucleico que codifica el ácido nucleico antisentido o ribozima.

La terapia génica se puede lograr transfiriendo un gen que codifica un receptor, preferiblemente un receptor metabotrópico de glutamato, a un paciente, de forma que permita la expresión de la proteína receptora. Se pueden introducir en una célula moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifiquen secuencias de proteínas receptoras, *in vivo* o *ex vivo*. Las técnicas de transfección *in vivo* incluyen el uso de liposomas y vectores retrovíricos. Miller, *Nature* 357:455-460, incorporada aquí mediante referencia. La transfección *ex vivo* incrementa el número de técnicas de transfección disponibles, pero también añade complicaciones adicionales, debido a la eliminación y posterior inserción de células en un paciente.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el ácido nucleico utilizado para la terapia génica es uno que codifica SEQ ID N°:1, más preferiblemente SEQ ID N°:2, o una de sus porciones según se definió aquí anteriormente y/o los oligonucleótidos utilizados para terapia oligonucleotídica se dirigen a un ácido nucleico que codifica SEQ ID N°:1, más preferiblemente, SEQ ID N°:2.

E. Líneas celulares transfectadas

El ácido nucleico que expresa un receptor metabotrópico de glutamato se puede usar para crear líneas celulares transfectadas, que expresan funcionalmente un receptor metabotrópico de glutamato. Tales líneas celulares presentan diversos usos, como su uso para la detección de elevado rendimiento para moléculas capaces de modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato; y su uso para analizar la fijación a un receptor metabotrópico de glutamato y para la producción de péptidos del receptor metabotrópico de glutamato.

Diversas líneas celulares son capaces de acoplar receptores expresados exógenamente a respuestas funcionales endógenas. Varias de estas líneas celulares (p.ej., HIH-3T3, HeLa, NG115, CHO, HEK 293 y COS7) se pueden analizar para confirmar que carecen de un receptor metabotrópico de glutamato endógeno. Estas líneas que carecen de una respuesta al glutamato externo, se pueden usar para establecer líneas celulares transfectadas establemente, que expresen el receptor metabotrópico de glutamato clonado.

La producción de estos transfectantes estables se logra mediante transfección de una línea celular apropiada con un vector de expresión eucariótico, como pCEP4, en el que la secuencia codificadora del DNA del receptor metabotrópico de glutamato se ha clonado en el sitio de clonación múltiple. Estos vectores de expresión contienen una región promotora, como el promotor del citomegalovirus humano (CMV), que dirige la transcripción a nivel elevado de DNA en diversas células de mamíferos. Además, estos vectores contienen genes para la selección de células que expresan de forma estable el DNA de interés. El marcador seleccionable en el vector pCEP4 codifica una enzima que confiere resistencia a higromicina, un inhibidor metabólico que se añade al cultivo para destruir las células no transfectadas. Diversos vectores de expresión y esquemas de selección se valoran usualmente para determinar las condiciones óptimas para la producción de líneas celulares que expresan el receptor metabotrópico de glutamato, para uso en pruebas de detección de elevado rendimiento.

El método más efectivo para la transfección de líneas celulares eucarióticas con DNA plasmídico, varía con el tipo celular determinado. La construcción de expresión del receptor metabotrópico de glutamato se introducirá en células cultivadas mediante la técnica apropiada, bien precipitación de fosfato cálcico, transfección de DEAE-dextrano, lipofección o electroporación.

Las células que tienen incorporado de forma estable el DNA transfectado se identificarán por su resistencia a medios de selección, según se describió anteriormente, y las líneas celulares clónicas se producirán por expansión de las colonias resistentes. La expresión del DNA del receptor metabotrópico de glutamato por estas líneas celulares, se valorará mediante hibridación en solución y análisis de transferencia de Northern. La expresión funcional de la proteína receptora se determinará midiendo la inhibición de la actividad de adenilato-ciclasa, y la posterior reducción de la acumulación de AMPc, como respuesta a agonistas del receptor metabotrópico de glutamato, aplicados externamente; o midiendo la movilización del calcio intracelular como respuesta a agonistas del receptor metabotrópico de glutamato, aplicados externamente.

En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico usado para crear una línea celular eucariótica transfectada establemente codifica SEQ ID N°:1, más preferiblemente, el ácido nucleico que está representado por

ES 2 292 193 T3

SEQ ID N°:2, o una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción biológicamente funcional de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, comprendiendo dicha porción al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos 894 a 908, mostrada en la Figura 1.

5 F. Animales transgénicos

Los animales transgénicos y las células transformadas se pueden usar para estudiar los efectos del exceso o empobrecimiento en receptor sobre la función celular. Se pueden usar sistemas modelo experimentales para estudiar los efectos en cultivos celulares o tisulares, en animales completos, o en células o tejidos particulares comprendidos en animales completos o sistemas de cultivo de tejidos. Los efectos se pueden estudiar durante intervalos temporales específicos (incluyendo durante la embriogénesis). Los mamíferos transgénicos no humanos son particularmente útiles como sistemas de análisis *in vivo*, para estudiar los efectos de la introducción de un receptor metabotrópico de glutamato; la regulación de la expresión de un receptor metabotrópico de glutamato, es decir, a través de la introducción de genes adicionales, ácidos nucleicos antisentido o ribozimas; y para estudiar el efecto de moléculas que mimetizan o bloquean el efecto del glutamato sobre un receptor metabotrópico de glutamato.

La presente invención proporciona sistemas modelo experimentales para estudiar el papel fisiológico de un receptor metabotrópico de glutamato. Se pueden crear sistemas modelo que tienen grados variables de expresión del receptor. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un receptor se puede insertar en células que expresan los receptores en la naturaleza, de forma que el gen se expresa a niveles mucho mayores. Alternativamente, se puede usar un gen recombinante para inactivar el gen endógeno mediante recombinación homóloga y, por tanto, crear una célula, tejido o animal deficiente en receptor metabotrópico de glutamato.

La inactivación de un gen se puede producir, por ejemplo, usando un gen recombinante transformado mediante ingeniería genética para contener una mutación de inserción (p.ej., el gen *neo*). El gen recombinante se inserta en el genoma de una célula, tejido o animal receptor, e inactiva la transcripción del receptor. Tal construcción se puede introducir en una célula, como una célula madre embrionaria, mediante técnicas como la transfección, transducción e inyección. Las células madre que carecen de una secuencia receptora intacta pueden generar animales transgénicos deficientes en el receptor.

30 Los modelos de ensayo preferidos son animales transgénicos. Un animal transgénico tiene células que contienen DNA que se ha insertado artificialmente en una célula y se ha insertado en el genoma del animal que se desarrolla a partir de esa célula. Los animales transgénicos preferidos son primates, ratones, ratas, vacas, cerdos, caballos, cabras, ovejas, perros y gatos.

35 Están disponibles diversos métodos para producir animales transgénicos. Por ejemplo, se puede inyectar DNA en el pronúCLEO de un huevo fertilizado, antes de la fusión de los pronúCLEOS masculino y femenino, o inyectarlo en el nÚCLEO de una célula embrionaria (p.ej., el nÚCLEO de un embrión de dos células), después de la iniciación de la división celular (Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442 (1985)). A modo de otro ejemplo, los embriones pueden infectarse con virus, especialmente retrovirus, modificados para portar secuencias nucleotídicas de receptor metabotrópico de glutamato.

40 Las células madre pluripotentes, derivadas de la masa celular interna del embrión y estabilizadas en cultivo, se pueden manipular en cultivo para incorporar las secuencias nucleotídicas de la invención. Se puede producir un animal transgénico a partir de tales células madre, a través de la implantación en un blastocisto que se implanta en una madre de acogida y se deja crecer a término. Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener de fuentes comerciales estándar, como Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), y Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN).

50 Los métodos para el cultivo de células madre embrionarias (ES) y la producción posterior de animales transgénicos mediante la introducción de DNA en células ES, usando métodos como la electroporación, precipitación de fosfato cÁCICO/DNA y la inyección directa, tambiÉn son bien conocidos por los tÉCNICOS medios en la materia. Véase, por ejemplo, *Teratocarcinomas and embryonic stem cells, a practical approach*, E. J. Robertson, ed., IRL Press (1987).

55 Los procedimientos para manipulaciones de embriones son bien conocidos en la tÉcnica. Los procedimientos para la manipulación del embrión de roedor y para la microinyección de DNA en el pronúCLEO del zigoto son bien conocidos por los tÉCNICOS medios en la materia (Hogan *et al.*, citado mÁS arriba). Los procedimientos de microinyección para peces, huevos de anfibios y pÁjaros se detallan en Houdebine y Chourrout, *Experientia* 47:897-905 (1991). Otros procedimientos para la introducción de DNA en tejidos de animales, se describen en la patente de EE.UU. N° 4.945.050 (Sandford *et al.*, 30 de julio de 1990).

60 La transfección y aislamiento de los clones deseados se puede realizar usando tÉCNICAS ESTÁNDAR (p.ej., E.J. Robertson, citado mÁS arriba). Por ejemplo, se puede realizar integraciÓn aleatoria cotransfectando el ácido nucleico con un gen que codifica resistencia a antibIóticos. Alternativamente, por ejemplo, el gen que codifica resistencia a antibIóticos estÁ conectado fÍSICAMENTE a una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor metabotrópico de glutamato.

65 Las moléculas de DNA que se introducen en células ES, se pueden integrar tambiÉn en el cromosoma, a travÉs del proceso de recombinaciÓn homóloga. Capecchi, *Science* 244: 1288-1292 (1989). Se han descrito mÉTODOS para la

ES 2 292 193 T3

selección positiva del suceso de recombinación (p.ej., resistencia a neomicina) y selección dual positiva-negativa (p.ej., resistencia a neomicina y resistencia a gangciclovir) y la identificación posterior de los clones deseados mediante PCR, por Capecchi, citado más arriba, y Joyner *et al.*, *Nature* 338:153-156 (1989), cuyas enseñanzas se incorporan aquí.

5 La fase final del procedimiento es inyectar las células ES elegidas como objetivo en blastocistos, y transferir los blastocistos a hembras pseudopregnadas. Los animales químéricos resultantes se crían y la descendencia se analiza mediante transferencia Southern para identificar individuos que llevan el transgen.

10 Un ejemplo que describe la preparación de un ratón transgénico es como sigue. Se induce a ratones hembra a superovular y se colocan con machos. Las hembras apareadas se sacrifican mediante asfixia con CO₂ y una dislocación cervical, y los embriones se recuperan de los oviductos escindidos. Las células del disco prolífero que los rodean se eliminan. A continuación, los embriones pronucleares se lavan y almacenan hasta el momento de la inyección.

15 Ratones hembra adultos que se someten a ciclos aleatoriamente, se aparean con machos vasectomizados y sirven como receptores para embriones implantados. Las hembras receptoras se aparean al mismo tiempo que las hembras donadoras y los embriones se transfieren quirúrgicamente a hembras receptoras.

20 El procedimiento para producir ratas transgénicas es similar al de los ratones. Véase Hammer *et al.*, *Cell* 63:1099-1112 (1990). Los procedimientos para la producción de mamíferos no roedores y otros animales se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, Houdebine y Chourrout, citado más arriba; Pursel *et al.*, *Science* 244:1281-1288 (1989); y Simms *et al.*, *Biotechnology* 6:179-183 (1988).

25 En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico utilizado para la producción de células transformadas o animales transgénicos no humanos es el de SEQ ID N°:2, o porciones del mismo que comprenden al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia aminoácida de residuos 894 a 908, mostrada en la Figura 1.

G. Nueva proteína receptora metabotrópica de glutamato, derivados y fragmentos

1. Proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato

30 Las proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato se pueden expresar en diversos tejidos y tipos celulares, incluyendo tejidos y tipos celulares humanos. Estas proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato recombinantes se pueden utilizar para diversos propósitos por los expertos en la materia. Las proteínas receptoras recombinantes se pueden usar como fuente de antígeno para la producción de anticuerpos dirigidos contra receptores metabotrópicos de glutamato, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales. Además, las proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato se pueden utilizar para propósitos de descubrimiento de fármacos, utilizando métodos conocidos para los expertos en la técnica. Las proteínas receptoras recombinantes se pueden utilizar para detectar (incluyendo selección de elevado rendimiento) moléculas que pueden modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, actuando como agonistas, antagonistas o moduladores alostéricos. Finalmente, las proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato se pueden usar para estudios estructurales de interacciones de fármacos de molécula pequeña con receptores metabotrópicos de glutamato; interacciones de anticuerpos con receptores metabotrópicos de glutamato; o las interacciones de otros péptidos y proteínas con receptores metabotrópicos de glutamato. Estos usos de las proteínas receptoras metabotrópicas de glutamato no están destinados a ser limitativos.

45 En una realización preferida de la presente invención, la proteína receptora metabotrópica de glutamato es una proteína receptora metabotrópica de glutamato y, más específicamente, es una proteína receptora metabotrópica de glutamato que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID N°:1, o una porción biológicamente activa de esa secuencia, que comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia aminoácida de residuos 894 a 908, mostrada en la Figura 1.

2. Derivados de receptores metabotrópicos de glutamato

50 Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, se pueden usar para preparar derivados del receptor descrito.

55 Los derivados de un receptor particular son equivalentes funcionales de ese receptor, que tienen una secuencia de aminoácidos similar y conservan, en alguna medida, una o más actividades del receptor relacionado. "Equivalente funcional" significa una proteína que tiene una actividad que puede sustituir a una o más actividades de un receptor o fragmento de receptor particular. Los equivalentes funcionales preferidos conservan todas las actividades de un receptor o fragmento de receptor particular, sin embargo, el equivalente funcional puede tener una actividad que, cuando se mide cuantitativamente, es más fuerte o débil que la del receptor relacionado, según se mide en pruebas de receptor estándar, por ejemplo, como las descritas aquí. Los equivalentes funcionales preferidos tienen actividades que van de 1% a 10.000% de la actividad del receptor relacionado, más preferiblemente entre 10% y 1000%, y más preferiblemente entre 50% y 500%. Los equivalentes funcionales pueden incluir, por ejemplo, derivados que contienen modificaciones o alteraciones de aminoácidos, por ejemplo, en la región de un receptor que contiene actividad de fijación a ligando. Tales alteraciones de aminoácidos pueden incrementar o reducir la actividad de fijación del receptor con una sustancia de fijación particular. Los equivalentes funcionales pueden incluir también, por ejemplo, derivados que contienen modificaciones o alteraciones de aminoácidos en la porción del dominio intracelular del receptor que pueden, por

ES 2 292 193 T3

ejemplo, incrementar o reducir la actividad del receptor, por ejemplo, incrementando o reduciendo la respuesta celular a la activación del receptor. Los derivados tienen al menos 15% de similitud de secuencia, preferiblemente 70%, más preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de similitud de secuencia con el receptor relacionado. "Similitud de secuencia" se refiere a la "homología" observada entre las secuencias de aminoácidos en dos polipéptidos diferentes, independientemente de su origen polipeptídico.

La capacidad del derivado para mantener alguna actividad se puede medir usando las técnicas aquí descritas. Los derivados incluyen modificaciones que se producen durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante fosforilación, glucosilación, reticulación, acilación, escisión proteolítica, conexión con una molécula de anticuerpo, 10 molécula de la membrana u otro ligando (véase Ferguson *et al.*, 1988, *Annu. Rev. Biochem.* 57:285-320).

Tipos específicos de derivados incluyen también alteraciones de aminoácidos, como delecciones, sustituciones, adiciones y modificaciones de aminoácidos. Una "delección" se refiere a la ausencia de uno o más residuos de aminoácido en el polipéptido relacionado. Una "adición" se refiere a la presencia de uno o más residuos de aminoácido en el polipéptido relacionado. Las adiciones y delecciones a un polipéptido pueden estar en el extremo amino, el extremo carboxilo y/o ser internas. "Modificación" de un aminoácido se refiere a la alteración de un aminoácido existente en la naturaleza para producir un aminoácido que no existe en la naturaleza. Una "sustitución" se refiere al reemplazo de uno o más residuos de aminoácido por otros residuos de aminoácido en el polipéptido. Los derivados pueden contener 15 diferentes combinaciones de alteraciones, incluyendo más de una alteración y diferentes tipos de alteraciones.

Mientras que el efecto de un cambio de aminoácido varía, dependiendo de factores como la fosforilación, glicosilación, conexiones intracatenarias, estructura terciaria y el papel del aminoácido en el sitio activo o un sitio alostérico posible, se prefiere generalmente que el aminoácido sustituido sea del mismo grupo que el aminoácido que se está 20 reemplazando. En alguna medida, los siguientes grupos contienen aminoácidos que son intercambiables: los aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina; los aminoácidos ácidos, ácido aspártico y glutámico; los aminoácidos polares neutros serina, treonina, cisteína, glutamina, asparagina y, en menor medida, metionina; los aminoácidos alifáticos 25 apolares, glicina, alanina, valina, isoleucina y leucina (sin embargo, debido al tamaño, glicina y alanina están relacionados más próximamente y valina, isoleucina y leucina están relacionados más próximamente); y los aminoácidos aromáticos fenil-alanina, triptófano y tirosina. Además, aunque están clasificados en diferentes categorías, alanina, 30 glicina y serina parecen ser intercambiables en alguna medida, y la cisteína también encaja en este grupo, o se puede clasificar con los aminoácidos neutros polares.

Aunque la prolina es un aminoácido neutro apolar, su reemplazo representa dificultades, debido a sus efectos sobre la conformación. Por tanto, las sustituciones por o de prolina no se prefieren, excepto cuando se puedan obtener los 35 mismos resultados conformacionales o similares. Se pueden obtener las propiedades que confieren la conformación de los residuos de prolina si uno o más de estos residuos se sustituye por hidroxi-prolina (Hyp).

Ejemplos de aminoácidos modificados incluyen los siguientes: aminoácidos apolares neutros alterados de fórmula $H_2N(CH_2)_nCOOH$, en la que n es 2-6, sarcosina (Sar), t-butil-alanina (t-BuAla), t-butil-glicina (t-BuGly), N-metil-isoleucina (N-MeIle), y norleucina (Nleu); aminoácidos aromáticos neutros alterados, como fenil-glicina; aminoácidos polares alterados, pero neutros, como citrulina (Cit) y sulfóxido de metionina (MSO); aminoácidos neutros alterados y apolares, como ciclohexil-alanina (Cha); aminoácidos ácidos alterados, como ácido cistélico (Cya); y aminoácidos básicos alterados, como ornitina (Orn).

Los derivados preferidos tienen una o más alteraciones de aminoácidos, que no afectan significativamente a la actividad receptora de la proteína receptora relacionada. En regiones de la proteína receptora metabotrópica de glutamato no necesarios para la actividad del receptor, se pueden eliminar, añadir o sustituir aminoácidos con menor riesgo de afectar a la actividad. En regiones requeridas para la actividad del receptor, se prefieren menos las alteraciones de aminoácidos, ya que existe un riesgo mayor de afectar a la actividad del receptor. Tales alteraciones deberían ser 45 alteraciones conservativas. Por ejemplo, uno o más residuos aminoácidos en la secuencia se pueden sustituir por otro aminoácido de polaridad similar, que actúa como equivalente funcional.

Las regiones conservadas tienden a ser más importantes para la actividad de la proteína que las regiones no conservadas. Se pueden usar procedimientos estándar para determinar las regiones conservadas y no conservadas importantes 50 para la actividad del receptor, usando técnicas de mutagénesis *in vitro* o análisis de delección, y midiendo la actividad del receptor, según se describe mediante la presente memoria descriptiva.

Se pueden producir derivados usando técnicas químicas y técnicas de ácidos nucleicos recombinantes estándar. Las modificaciones de un polipéptido específico pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida y sustitución 55 de aminoácidos durante la síntesis en fase sólida, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones en los hospedadores que producen el polipéptido. Se pueden obtener polipéptidos que incluyen derivados, usando técnicas estándar, como las descritas en la sección I.G.2., más arriba, y por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Por ejemplo, el capítulo 15 de Sambrook describe procedimientos para la mutagénesis dirigida de DNA clonado.

Un ejemplo del polipéptido objeto de modificación es el del receptor metabotrópico de glutamato humano y, más 65 específicamente, es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID N°:1.

ES 2 292 193 T3

3. Fragmentos de receptor metabotrópico de glutamato

Las moléculas de ácido nucleico y proteínas de la presente invención se pueden usar para preparar fragmentos del receptor descrito.

5 Los fragmentos de receptor son porciones de receptores metabotrópicos de glutamato. Los fragmentos de receptor se fijan preferiblemente a una o más sustancias de fijación, que se fijan a un receptor completo. Las sustancias de fijación incluyen ligandos, como glutamato, quiscualato, agonistas, antagonistas, moduladores alostéricos, y anticuerpos que se fijan al receptor. Los fragmentos tienen diferentes usos, como seleccionar otras moléculas capaces de fijarse al receptor.

10 Se pueden generar fragmentos usando técnicas estándar, como expresión de secuencias parciales clonadas de DNA receptor, y escisión proteolítica de una proteína receptora. Las proteínas se escinden específicamente mediante enzimas proteolíticas, como tripsina, quimiotripsina o pepsina. Cada una de estas enzimas es específica para el tipo de 15 unión peptídica que ataca. La tripsina cataliza la hidrólisis de uniones peptídicas cuyo grupo carbonilo procede de un aminoácido básico, normalmente arginina o lisina. La pepsina y quimiotripsina catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas procedentes de aminoácidos aromáticos, particularmente triptófano, tirosina y fenil-alanina.

20 Se producen conjuntos alternados de fragmentos de proteínas evitando la escisión en un sitio que sea susceptible frente a una enzima proteolítica. Por ejemplo, la reacción del grupo E-amino de lisina con etil-trifluoro-tioacetato en una solución ligeramente básica, produce un residuo aminoácido bloqueado, cuya unión peptídica adyacente ya no es susceptible de hidrólisis por tripsina. Goldberger *et al.*, *Biochemistry* 1:401 (1962). El tratamiento de tal polipéptido con tripsina, sólo escinde, por tanto, los residuos arginilo.

25 Los polipéptidos también se pueden modificar para crear uniones peptídicas que sean susceptibles de hidrólisis proteolítica catalizada enzimáticamente. Por ejemplo, la alquilación de residuos de cisteína con β -halo-etil-aminas, produce uniones peptídicas que se hidrolizan por tripsina. Lindley, *Nature*, 178:647 (1956).

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

35 Por tanto, tratando un receptor metabotrópico de glutamato, o sus fragmentos, con diversas combinaciones de modificadores, enzimas proteolíticas y/o reactivos químicos, se producen numerosos péptidos solapantes discretos de tamaños variables. Estos fragmentos peptídicos se pueden aislar y purificar de tales digeridos mediante métodos cromatográficos. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos, usando un procedimiento sintético apropiado en estado sólido.

40 Los fragmentos se pueden seleccionar para que tengan actividades biológicas deseadas. Por ejemplo, un fragmento puede incluir sólo un sitio de fijación a ligando. Tales fragmentos se identifican fácilmente por los técnicos medios en la materia usando métodos de rutina para detectar la fijación específica al fragmento. Por ejemplo, en el caso de un receptor metabotrópico de glutamato, se puede expresar un ácido nucleico que codifica un fragmento receptor, para producir el fragmento polipeptídico, que se pone luego en contacto con un ligando del receptor bajo condiciones de 45 asociación apropiadas para determinar si el ligando se fija al fragmento. Tales fragmentos son útiles en pruebas de detección para agonistas y antagonistas de glutamato.

45 Otros fragmentos útiles incluyen aquellos que tienen sólo la porción externa, porción intramembranal o porción intracelular del receptor. Estas porciones se identifican fácilmente mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del receptor con las de receptores conocidos, o mediante otra metodología estándar. Estos fragmentos son útiles para formar receptores quiméricos con fragmentos de otros receptores, para crear un receptor con una porción intracelular que realiza una función deseada en esa célula, y una porción extracelular que hace que esa célula responda a la presencia de glutamato, o de los agonistas o antagonistas aquí descritos. Por ejemplo, se pueden construir receptores quiméricos tales que el dominio intracelular esté acoplado a un proceso enzimático deseado que se pueda detectar fácilmente mediante pruebas colorimétricas, radiométricas, luminométricas, espectrofotométricas o fluorimétricas, y se active mediante interacción de la porción extracelular con su ligando nativo (p.ej., glutamato) o agonistas y/o antagonistas de la invención. Las células que expresan tales receptores quiméricos se pueden usar para facilitar la detección de agonistas y antagonistas del receptor metabotrópico de glutamato.

H. Anticuerpos contra receptores metabotrópicos de glutamato

60 Se pueden usar receptores metabotrópicos de glutamato y sus fragmentos que conserven determinantes antigenicos, para generar anticuerpos que reconozcan un receptor metabotrópico de glutamato. Se pueden obtener anticuerpos policlonales que reconocen un receptor metabotrópico de glutamato, inmunizando conejos u otros animales con polipéptidos de receptor metabotrópico de glutamato aislado. Los polipéptidos usados para la inmunización pueden comprender el polipéptido receptor completo o sus fragmentos.

65 Alternativamente, se pueden obtener anticuerpos monoclonales que reconozcan un receptor metabotrópico de glutamato, inmunizando cepas de ratones apropiadas con polipéptidos receptores metabotrópicos de glutamato aislados.

ES 2 292 193 T3

Nuevamente, los polipéptidos usados para la inmunización pueden comprender el polipéptido receptor completo o sus fragmentos, pero se pueden usar también células completas que expresen un polipéptido receptor metabotrópico de glutamato.

5 Los polipéptidos receptores metabotrópicos de glutamato usados para producción de anticuerpos se pueden aislar de tejidos o células que expresan normalmente el receptor metabotrópico de glutamato elegido, o de células construidas para el propósito de la expresión recombinante de tales polipéptidos, o se pueden sintetizar mediante métodos químicos convencionales en fase sólida. Se pueden producir anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra estos polipéptidos, usando técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica, como las descritas por Harlow y Lane en *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Se pueden producir anticuerpos policlonales, por ejemplo, según se describe en Shigemoto *et al.*, *Neuron* 12:1245-55 (1994), que describe anticuerpos policlonales que reconocen mGluR1, incorporada aquí mediante referencia. Se pueden producir fácilmente anticuerpos monoclonales que reconocen mGluRs por un experto en la técnica. La metodología general para fabricar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas se conoce bien en la técnica. Véase, p.ej., M. Schreier *et al.*, *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1980); Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier Biomedical Press 1981); Kennett *et al.*, *Monoclonal Antibodies* (Plenum Press, 1980), incorporadas aquí mediante referencia. También se pueden producir líneas celulares secretoras de anticuerpos, inmortales, mediante técnicas distintas de la fusión, como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico o EBV. Se pueden usar varias fuentes de antígeno, si se desea, para estimular a la población de B-linfocitos normal, que se convierte después en una línea celular inmortal.

Por ejemplo, los polipéptidos utilizados para la producción de anticuerpos proceden de un receptor metabotrópico de glutamato y, más específicamente, son el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID Nº:1, o sus fragmentos.

25 I. Sustancias que se fijan a mGluR conjugados con toxinas

La invención describe asimismo sustancias que se fijan al receptor, incluyendo anticuerpos y/o sus fragmentos, que se pueden conjugar con un resto de toxina, o expresarse junto con un resto de toxina como proteína de fusión recombinante. El resto de toxina se unirá a una célula elegida como objetivo y penetrará en ella, usando la interacción de la sustancia de fijación y el receptor superficial celular correspondiente elegido como objetivo. El resto de toxina produce la destrucción de la célula elegida como objetivo. Por tanto, las células que tienen receptores metabotrópicos de glutamato característicos de una enfermedad o trastorno, como cánceres, se pueden elegir como objetivo por la presente invención.

35 Restos de toxina adecuados fijados a una sustancia de fijación incluyen proteínas como una proteína antivírica de la fitolaca, abrina, exotoxina de la difteria, o exotoxina de *Pseudomonas*; ricino y un radionucleido que emite elevada energía, como el cobalto-60. Otros ejemplos de posibles restos de toxina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J.M. Cruse and R.E. Lewis, Jr. (compiladores), Carger Press, Nueva York, (1989). El resto de toxina elegido debería ser farmacéuticamente aceptable.

40 La conjugación de la sustancia de fijación con otro resto (p.ej., toxina bacteriana) se puede lograr conectando las dos moléculas, usando técnicas estándar, siempre que ambas moléculas mantengan su actividad respectiva. Se pueden obtener conexiones posibles mediante diferentes mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión de afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. Preferiblemente, se usa unión covalente. La unión covalente se puede lograr, bien mediante condensación directa de cadenas laterales existentes, o mediante la incorporación de moléculas puente externas.

Muchas sustancias de conexión bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteína, como anticuerpos, a otras moléculas. Sustancias de acoplamiento representativas incluyen compuestos orgánicos, como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehídos, diazo-bencenos y hexametilen-diaminas. (Véase Killen y Lindstrom 1984, "Specific killing of lymphocytes that cause experimental autoimmune myasthenia gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugates" *J. Immunol.* 133:1335-2549; Jansen *et al.*, 1982, "Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity". *Immunological Rev.* 62: 185-216; y Vitetta *et al.*, citado más arriba).

55 J. Compuestos direccionados al nuevo receptor metabotrópico de glutamato

Los compuestos agonistas y antagonistas de mGluR descritos en la literatura científica se refieren al agonista endógeno, glutamato (para revisión, véanse: Cockcroft *et al.*, *Neurochem. Int.* 23:583-594, 1993; Schoepp y Conn, *Trends Pharmacol. Sci.* 14:13-20, 1993; Hollmann y Heinemann, *Annu. Rev. Neurosci.* 17:31-108, 1994, Watkins y Collinridge, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:333, 1994; Knopfel *et al.*, *J. Med. Chem.* 38:1417, 1995). Tales compuestos agonistas y antagonistas tienen un resto ácido, normalmente un ácido carboxílico, pero a veces un ácido fosfónico. Presumiblemente entonces, tales compuestos se fijan a mGluRs en el mismo sitio que el aminoácido, glutamato. Esto se ha confirmado para metil-carboxi-fenil-glicina, que se demostró que era un antagonista competitivo de glutamato (Eaton *et al.*, *Eur. J. Pharm. - Mol. Pharm. Sect.* 244:195-197, 1993). Debido a que estos compuestos son mayoritariamente aminoácidos o derivados de aminoácidos, tienen biodisponibilidades limitadas, lo cual dificulta los estudios *in vivo* para valorar la fisiología, farmacología y potencial terapéutico de mGluR. Además, los agonistas y antagonistas de

ES 2 292 193 T3

mGluR disponibles actualmente son de uso limitado, como herramientas de búsqueda y como sustancias terapéuticas potenciales, a consecuencia de su falta de actividad y selectividad. La identificación de agonistas y antagonistas con un elevado grado de actividad y selectividad para subtipos de mGluR individuales es, por tanto, el requisito más importante para incrementar la comprensión de varios papeles de los mGluRs en procesos fisiológicos y patofisiológicos en el SNC de mamíferos.

El aislamiento del ácido nucleico que codifica el nuevo mGluR de la presente invención permite la expresión del receptor en líneas de células transfectadas, y estas células se pueden utilizar para detectar nuevos compuestos capaces de fijarse al nuevo mGluR y modular su actividad. Estos compuestos se podrían fijar en el mismo sitio que el glutamato o, alternativamente, en nuevos sitios de fijación de la proteína mGluR. Tal detección puede identificar compuestos con actividad y selectividad mejorada para el nuevo mGluR. Estos compuestos pueden tener también otras características beneficiosas, como biodisponibilidad incrementada. Tales compuestos serían útiles como herramientas de investigación mejoradas para deducir los papeles fisiológicos y patofisiológicos del nuevo mGluR, y como sustancias terapéuticas potenciales.

Los compuestos direccionados al nuevo receptor metabotrópico de glutamato pueden presentar varios usos, incluyendo usos terapéuticos y de diagnóstico. La síntesis de compuestos que se pueden fijar a mGluRs y modular su actividad se describen por Nemeth *et al.*, titulado "Calcium Receptor Active Molecules" Número de publicación internacional WO 93/04373, y en el documento de EE.UU. Nº 08/485.038, presentado el 7 de junio de 1995, incorporado aquí como referencia en su totalidad, pero los compuestos potenciales activos frente a mGluR no están limitados a estos compuestos. Aquellos compuestos que se fijan a un receptor metabotrópico de glutamato y aquellos compuestos eficaces para modular la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, se pueden identificar usando los procedimientos aquí descritos. Aquellos compuestos que se pueden unir selectivamente al receptor metabotrópico de glutamato, se pueden usar terapéuticamente o, alternativamente, como sustancias de diagnóstico para determinar la presencia del receptor metabotrópico de glutamato frente a otros receptores de glutamato.

K. Modulación de la actividad del receptor metabotrópico de glutamato

La modulación de la actividad del receptor metabotrópico de glutamato se puede usar para producir diferentes efectos, como efectos anticonvulsivos, neuroprotectores, analgésicos, promotores de la cognición, y de relajación muscular. Cada uno de estos efectos tienen aplicaciones terapéuticas. Los compuestos usados terapéuticamente deberían presentar efectos secundarios mínimos a dosis terapéuticamente efectivas.

La actividad moduladora del receptor metabotrópico de glutamato produce un incremento o reducción en una respuesta celular, que se produce tras la activación del receptor metabotrópico de glutamato. Las respuestas celulares frente a la activación del receptor metabotrópico de glutamato varían dependiendo del tipo de receptor metabotrópico de glutamato activado. Generalmente, la activación del receptor metabotrópico de glutamato produce una o más de las siguientes actividades: (1) activación de fosfolipasa C, (2) incrementos de la hidrólisis de fosfoinositido (PI), (3) liberación de calcio intracelular, (4) activación de fosfolipasa D, (5) activación o inhibición de adenilil-ciclasa, (6) incrementos o reducciones en la formación de adenosina-monofosfato cíclico (AMPc), (7) activación de guanilil-ciclasa, (8) incrementos en la formación de guanosina-monofosfato cíclico (GMPc), (9) activación de fosfolipasa A₂, (10) incrementos en la liberación de ácido araquidónico, y (11) incrementos o reducciones en la actividad de los canales de iones, por ejemplo, canales de iones dependientes de voltaje y ligando. La inhibición de la activación del receptor metabotrópico de glutamato, evita que se produzcan una o más de estas actividades.

La activación de un receptor metabotrópico de glutamato particular, se refiere a la producción de una o más actividades asociadas con el tipo de receptor activado, por ejemplo: (1) activación de fosfolipasa C, (2) incrementos en la hidrólisis de fosfoinositido (PI), (3) liberación de calcio intracelular, (4) activación de adenilil-ciclasa, (5) incrementos en la formación de adenosina-monofosfato cíclico (AMPc), (6) activación de fosfolipasa A₂, (7) incrementos en la liberación de ácido araquidónico, y (8) incrementos o reducciones en la actividad de los canales de iones.

La capacidad de un compuesto de modular la actividad metabotrópica del glutamato se puede supervisar usando pruebas electrofisiológicas y bioquímicas que miden una o más actividades metabotrópicas del glutamato. Ejemplos de tales pruebas incluyen la valoración electrofisiológica de la función del receptor metabotrópico de glutamato en oocitos de *Xenopus* que expresan receptores metabotrópicos de glutamato clonados, la valoración electrofisiológica de la función del receptor metabotrópico de glutamato en líneas de células transfectadas (p.ej., células CHO, células HEK 293, etc.) que expresan receptores metabotrópicos de glutamato clonados, la valoración bioquímica de la hidrólisis de PI y la acumulación de AMPc en líneas celulares transfectadas que expresan receptores metabotrópicos de glutamato clonados, la valoración bioquímica de la hidrólisis de PI y la acumulación de AMPc en láminas de cerebro de rata (p.ej., en el hipocampo, córtex, cuerpo estriado, etc.), mediciones fluorimétricas de Ca²⁺ citosólico en células granulares cerebrales de rata cultivadas, y mediciones fluorimétricas de Ca²⁺ citosólico en líneas celulares transfectadas que expresan receptores metabotrópicos de glutamato clonados.

Previamente a su uso terapéutico en un ser humano, los compuestos se analizan preferiblemente *in vivo*, usando modelos animales. Se pueden realizar estudios en animales para evaluar la efectividad de un compuesto para tratar diferentes enfermedades o trastornos, o ejercer un efecto, como un efecto analgésico, un efecto mejorador de la cognición, o un efecto de relajación muscular, usando técnicas estándar.

L. Tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos y otros estados

Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar modulando la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, incluyen uno o más de los tipos siguientes: (1) aquellos caracterizados por una actividad anormal del receptor metabotrópico de glutamato; (2) aquellos caracterizados por una cantidad anormal de un mensajero extracelular o intracelular, cuya producción puede estar afectada por la actividad del receptor metabotrópico de glutamato; (3) aquellos caracterizados por un efecto anormal (p.ej., un efecto diferente en tipo o magnitud) de un mensajero intracelular o extracelular que se puede mejorar, a su vez, mediante la actividad del receptor metabotrópico de glutamato; y (4)

- 10 otras enfermedades o trastornos en los que la modulación de la actividad del receptor metabotrópico de glutamato ejercerá un efecto beneficioso, por ejemplo, en enfermedades o trastornos en los que la producción de un mensajero intracelular o extracelular, estimulada por la actividad del receptor, compensa una cantidad anormal de un mensajero diferente. Ejemplos de mensajeros extracelulares cuya secreción y/o efecto pueden estar afectados por la modulación de la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, incluyen iones inorgánicos, hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y quimioquinas. Ejemplos de mensajeros intracelulares incluyen calcio intracelular, AMPc,
- 15 GMPc, IP₃ y diacil-glicerol.

Los compuestos y métodos se pueden usar también para producir otros efectos, como un efecto analgésico, efecto de incremento de la cognición, y efecto relajante muscular.

- 20 Los compuestos y métodos descritos se pueden usar en particular en el tratamiento de enfermedades y trastornos neurológicos. Pacientes que padecen una enfermedad o trastorno neurológico se pueden diagnosticar mediante metodología clínica estándar.

25 Las enfermedades o trastornos neurológicos incluyen enfermedades neurodegenerativas, excitotoxicidad de glutamato, ictus isquémico y hemorrágico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño de células nerviosas inducido por hipoxia y epilepsia. Estas diferentes enfermedades o trastornos se pueden caracterizar más médica mente. Por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington.

- 30 Otro uso preferido de la presente invención es la producción de otros efectos terapéuticos, como efectos analgésicos, efectos de incremento de la cognición, o efectos de relajación muscular. La presente invención se usa preferiblemente para producir uno o más de estos efectos en un paciente que precise tal tratamiento.

35 Los pacientes que precisan tal tratamiento se pueden identificar mediante técnicas médicas estándar. Por ejemplo, la producción de actividad analgésica se puede usar para tratar pacientes que padecen estados clínicos de dolor agudo y crónico, incluyendo los siguientes: analgesia preoperatoria preventiva; neuropatías periféricas, como sucede con la diabetes mellitus y la esclerosis múltiple; dolor de miembros fantasma; causalgia; neuralgias como las que se producen con el Herpes zoster; dolor central como el que se observa en lesiones de la médula espinal; hiperalgesia; y alodinia.

40 *M. Diagnóstico in vitro*

45 Las diferentes moléculas de la presente invención se pueden usar para facilitar el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el receptor metabotrópico de glutamato. El diagnóstico se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención se pueden usar para analizar defectos en receptores metabotrópicos de glutamato.

50 Se pueden usar sondas de ácido nucleico para identificar defectos en receptores metabotrópicos de glutamato que se producen a nivel genético. Por ejemplo, se pueden usar sondas de hibridación complementarias a un ácido nucleico que codifica un receptor, para clonar el receptor. El receptor clonado se puede insertar en una célula, como un ovocito, y determinarse su sensibilidad a un ligando de mGluR. Otro ejemplo de uso de sondas de análisis de hibridación para detectar defectos, implica usar las sondas para detectar niveles de RNAm o la presencia de secuencias de ácido nucleico asociadas con una enfermedad particular. Un nivel de RNAm reducido será consecuente con una cantidad reducida de receptor expresado.

- 55 Se pueden usar anticuerpos y sus fragmentos capaces de reconocer un antígeno de receptor metabotrópico de glutamato, para ayudar a determinar el número de receptores, integridad, estructura y para localizar células que expresan receptores metabotrópicos de glutamato en el cuerpo. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos direccionalos a receptores metabotrópicos de glutamato para determinar el número de receptores sobre una célula; se pueden usar anticuerpos capaces de distinguir receptores normales y defectuosos para determinar la presencia de receptores defectuosos; se pueden usar anticuerpos direccionalos a un receptor metabotrópico de glutamato para determinar si una enfermedad o proceso quirúrgico produce la expansión de células normales o anormales que expresan receptores metabotrópicos de glutamato; y se pueden usar anticuerpos direccionalos a un receptor metabotrópico de glutamato para localizar células que tienen un número o estructura anormal del receptor metabotrópico de glutamato para dirigir el tratamiento posterior.

ES 2 292 193 T3

N. Formulación y administración

Las diferentes moléculas descritas por la presente invención se pueden usar para tratar diferentes enfermedades o trastornos modulando la actividad del receptor metabotrópico de glutamato. Las moléculas de la invención se pueden 5 formular para diferentes modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica, o localizada. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar generalmente en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA.

La formulación y modo de administración óptimos de los compuestos de la presente solicitud a un paciente, 10 depende de factores conocidos en la técnica, como la enfermedad o trastorno particular, el efecto deseado y el tipo de paciente. Aunque los compuestos se usarán típicamente para tratar pacientes humanos, también se pueden usar para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados, como primates, animales de granja, como cerdos, ganado vacuno y aviar, animales para deportes, y mascotas, como caballos, perros y gatos.

15 Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente efectivo se proporciona como una composición farmacéutica. Una sustancia o composición farmacológica se refiere a una sustancia o composición en una forma adecuada para administración a un organismo multicelular, como un ser humano. Las formas adecuadas dependen, en parte, del uso o la vía de entrada, por ejemplo oral, transdérmica o mediante inyección. Tales formas deberían permitir a la sustancia o composición alcanzar una célula elegida como objetivo, tanto si la célula elegida como objetivo está en un hospedador 20 multicelular, como si está en cultivo. Por ejemplo, las sustancias o composiciones farmacológicas inyectadas en el torrente sanguíneo, deberían ser solubles. Otros factores son conocidos en la técnica, e incluyen consideraciones como toxicidad y formas que evitan que la sustancia o composición ejerzan su efecto.

25 Las composiciones reivindicadas se pueden formular también como sales farmacéuticamente aceptables (p.ej., sales de adición ácidas) y/o sus complejos. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales atóxicas a la concentración a la que se administran. La preparación de tales sales puede facilitar el uso farmacológico, alterando las características fisicoquímicas de la composición sin evitar que la composición ejerza su efecto fisiológico. Ejemplos de alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen la reducción del punto de fusión para facilitar la administración transmucosa, y el incremento de la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones mayores del fármaco.

30 Sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácidas, como aquellas que contienen sulfato, clorhidrato, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metano-sulfonato, etano-sulfonato, benceno-sulfonato, p-tolueno-sulfonato, ciclohexil-sulfamato y quinato. (Véase, p.ej., PCT/US92/03736, citada más arriba). Se pueden obtener sales farmacéuticamente aceptables de ácidos, como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido 35 sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metano-sulfónico, ácido etano-sulfónico, ácido benceno-sulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido ciclohexil-sulfámico y ácido químico.

40 Se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables mediante técnicas estándar. Por ejemplo, la forma de base libre de un compuesto se disuelve en un disolvente adecuado, como una solución acuosa o acuosa-alcohólica, que contiene el ácido apropiado, y luego se aísla mediante evaporación de la solución. En otro ejemplo, se prepara una sal, haciendo reaccionar la base libre y un ácido en un disolvente orgánico.

45 También se pueden usar vehículos o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Ejemplos de vehículos y excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, como lactosa, glucosa o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y disolventes compatibles fisiológicamente. Las composiciones o composición farmacéutica se pueden administrar mediante diferentes vías, incluyendo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular, oral, tópica o transmucosa.

50 Los compuestos de la invención se pueden formular para diversos modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar generalmente en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

55 Para administración sistémica, se prefiere la administración oral. Para la administración oral, los compuestos se formulan en formas de dosificación oral convencionales, como cápsulas, comprimidos y tónicos.

Alternativamente, se puede usar la inyección, p.ej., intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intratecal o intracerebroventricular. Para inyección, los compuestos de la invención se formulan en soluciones líquidas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente, como solución de Hank o solución de Ringer. Alternativamente, los compuestos de la invención se formulan en uno o más excipientes (p.ej., propilenglicol), que se aceptan 60 generalmente como seguros, según se define por los estándares de la USP. Además, los compuestos se pueden formular en forma sólida y volverse a disolver o suspender inmediatamente antes del uso. También se incluyen las formas liofilizadas.

65 La administración sistémica puede ser también mediante medios transmucosos o transdérmicos, o las moléculas se pueden administrar oralmente. Para administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para las barreras a permear. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, se pueden usar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ser, por ejemplo, a través de pulveriza-

ES 2 292 193 T3

dores nasales, o usando supositorios. Para la administración oral, las moléculas se formulan en formas de dosificación de administración oral convencionales, como cápsulas, comprimidos y preparaciones líquidas.

Para administración tópica, los compuestos de la invención se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, 5 como se conoce generalmente en la técnica.

Como se muestra en los ejemplos aquí proporcionados se pueden determinar las cantidades de los diversos compuestos de esta invención a administrar, mediante procedimientos estándar. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva está entre aproximadamente 1 nmol y 3 μ moles de la molécula, preferiblemente entre aproximadamente 10 0,1 nmol y 1 μ mol, dependiendo de su EC₅₀ o IC₅₀ y de la edad y tamaño del paciente, y la enfermedad o trastorno asociado con el paciente. Generalmente, es una cantidad entre aproximadamente 0,1 y 50 mg/kg, preferiblemente 0,01 y 20 mg/kg del animal a tratar.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no limitan su alcance.
15

II. Ejemplos

Más adelante se proporcionan ejemplos para ilustrar los diferentes aspectos y realizaciones de la presente invención. Estos ejemplos no están destinados de ningún modo a limitar la invención descrita. Más bien, ilustran metodologías mediante las cuales se puede aislar el nuevo mGluR de la presente invención, expresarse en sistemas eucarióticos y valorarlo para su actividad funcional. También ilustran metodologías mediante las que se pueden seleccionar los compuestos para identificar aquellos que se fijan al nuevo mGluR o modulan su actividad.
20

Ejemplo 1

Clonación de receptores iónicos inorgánicos y receptores metabotrópicos de glutamato mediante el uso de cebadores de PCR degenerados

Se han clonado receptores de calcio de glándula paratiroides bovina y humana y de riñón y cerebro de rata (Brown et al., *Nature* 366:575, 1993; Garrett et al., *J. Biol. Chem.* 270:12919, 1995; Riccardi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:131, 1995, Ruat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3161, 1995). El análisis de las secuencias del receptor de calcio (bovino, humano y de rata) mediante comparación con bases de datos de secuencias, indicó que, aunque las secuencias receptoras de calcio eran únicas, presentaban una homología débil pero significativa (20-30% de identidad 35 de aminoácidos) con los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). Este resultado indicaba que los receptores de calcio están relacionados estructuralmente con los mGluRs y, probablemente, se desarrollaron a partir de un gen ancestral común. A pesar de esta relación estructural, los receptores de calcio son farmacológicamente distintos de mGluRs y, en experimentos con células paratiroides bovinas, o con ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores de calcio ectópicamente, no se observaron respuestas a los agonistas de mGluR glutamato, trans-ACPD y quisqualato.
40

El descubrimiento de las secuencias de receptores de calcio hizo posible determinar regiones de elevada conservación de secuencia entre los receptores de calcio y mGluRs. Tales regiones fueron útiles para guiar la preparación de sondas de hibridación y de PCR que se podrían usar para detectar y aislar secuencias de DNA y genómico que codificasen miembros adicionales de esta familia de receptores ampliada.
45

El análisis de las secuencias de aminoácidos de los receptores de calcio y mGluRs indicaba que la homología de secuencia era mayor en varias regiones limitadas que incluían porciones de los dominios extracelulares putativos N-terminales, las regiones putativas de siete dominios transmembranales y los bucles intracelulares putativos 1 y 3. Basándose en las homologías en los dominios transmembranales 2 y 5, y los dominios de bucles intracelulares 1 y 50 3, se sintetizaron cuatro oligonucleótidos degenerados para uso en PCR. Estos oligonucleótidos contenían sitios de restricción Xhol o EcoRI en sus extremos 5', para facilitar la subclonación de los productos de amplificación. Estos eran:

55 TM2:
CCTGCTCGAGACIA(A,G)(C,T)CGGGA(A,G)CT(C,T)T(C,G)CTA(C,T)(C,A)T;

TM5:
CGGAATTCCGTTICGGG(A,T)(C,T)TTGAA(C,G)GC(A,G)(A,T)A(G,C);
60

CL1:
CCTGCTCGAGTCAAGGCTACG(A,G)(A,G)I(C,A)G(G,A,C,T)GA(G,A)(C,T)T; y

65 CL3:
CGGAATTCCATTGGCTTCGTGAAI(T,G)T(A,G,C,T)(G,T)C(G,A,T,C)GG.

ES 2 292 193 T3

Se usaron cuatro combinaciones de cebadores diferentes en intentos para obtener nuevos clones de receptores iónicos y de receptores metabotrópicos de glutamato: TM2 + TM5, TM2 + CL3, CL1 + TM5, y CL1 + CL3. Se realizaron reacciones PCR usando condiciones descritas previamente (Abe *et al.* *J. Biol. Chem.*, 19:13361, 1992) con temperaturas de hibridación entre 37°C y 55°C. Cada combinación de cebadores originó productos de aproximadamente 500 pb de tamaño, cuando se usaban para amplificar a partir de DNAc o DNA genómico. Se prepararon bibliotecas de tales productos de PCR, subclonando los productos en un vector plasmídico después de la amplificación. El análisis de los productos produjo la detección de secuencias de receptores de calcio, cinco secuencias de mGluR y secuencias adicionales que se están caracterizando.

Este ejemplo, como los otros ejemplos aquí descritos, no pretende ser limitativo. Se pueden identificar otras regiones de secuencia altamente conservada, y utilizarse de forma similar. Tales avances se han hecho posibles por el descubrimiento de secuencias de receptores de calcio que permiten la identificación de las secuencias más altamente conservadas entre los receptores de calcio y mGluRs, y el diseño de cebadores de PCR degenerados, basados en estas homologías de secuencia. Se puede utilizar PCR degenerada para clonar fragmentos de DNA relacionados. Los productos de PCR clonados, como los descritos anteriormente, se pueden usar como sondas de hibridación para aislar clones genómicos completos y clones de DNAc completos. A medida que se descubran miembros adicionales de esta familia de receptores y se determinen sus secuencias, será posible el refinamiento de este enfoque. Por tanto, esta invención permite el descubrimiento de otros miembros de esta familia de receptores, mediante un procedimiento iterativo.

20 Ejemplo 2

Clonación de la secuencia de un nuevo mGluR humano

Se realizó PCR usando DNA genómico humano como molde y los cebadores degenerados y condiciones de reacción indicados en el ejemplo anterior (Abe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 19:13361, 1992). Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y, aquellos que correspondían aproximadamente a 500 pb de tamaño, se subclonaron después de la digestión con las endonucleasas de restricción XhoI y EcoRI. El análisis de la secuencia de DNA de los subclones a través de secuenciación de DNA de doble hebra con Sequenase Versión 2.0 (US Biochemical), identificó secuencias para el receptor de calcio humano y diversas secuencias de mGluR humano. La mayoría de estas últimas se identificaron fácilmente como los homólogos humanos de mGluRs de rata conocidos. Sin embargo, se encontró un subclón entre los producidos a partir de la reacción de amplificación de CL1 + CL3, que parecía ser único. El análisis de secuencia parcial del clon FF6.175 (véase SEQ ID N°:3) indicaba que presentaba fuertes homologías con las secuencias nucleotídicas de mGluR4, mGluR6 y mGluR7 de rata. La traducción de la secuencia nucleotídica de FF6.175 reveló una secuencia de aminoácidos que era homóloga a mGluRs 4, 6 y 7 de rata, pero presentaba diferencias de aminoácidos únicas. Esto sugirió que FF6.175 no codificaba el homólogo humano de mGluR4, mGluR6 o mGluR7, sino que codificaba un nuevo mGluR, que es, posiblemente, un miembro de esta subfamilia.

La publicación posterior de las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de mGluR8 de ratón (Duvoisin *et al.*, *J. Neuroscience* 15:3075, 1995) confirmó esta hipótesis. La secuencia de ácido nucleico parcial de FF6.175 (SEQ ID N°:3) presentaba 92,2% de identidad de secuencia con la región correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de mGluR8 de ratón. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico parcial FF6.175, presentaba 96,4% de identidad con la secuencia de aminoácidos correspondiente de mGluR8 de ratón. Estas relaciones implicaban que FF6.175 era un fragmento de PCR derivado del DNA genómico humano, que posiblemente codificaba un mGluR8 humano. Los cebadores específicos de PCR (FF6.175 RTS: 5'-CTA CAT TGA CTA TGG AGA GCA GCG-3', FF6.175.RTS3: 5'-GAC CAT CAA GAG GAT ACT GTA TCC-3'), basados en la secuencia de ácido nucleico parcial de FF6.175, se sintetizaron comercialmente (Midland Certified Reagent Company). La PCR se realizó usando 100 ng de DNA genómico humano (Clontech), 0,1 μM de cada cebador, tampón de PCR IX de Perkin Elmer, dNTPs 0,2 mM y 1,25 unidades de enzima AmpliTaq, en un volumen de reacción de 50 μl. Se empleó un sistema de PCR de GeneAmp, 9600, para realizar 25 ciclos de PCR: 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 15 segundos y 72°C durante 15 segundos, seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C. El producto de 121 pb resultante se subclonó en pT7Blue (Novagen) y se denominó pX120.15. El producto de PCR clonado se sometió a análisis de secuencia de DNA, a través de secuenciación de DNA de doble hebra con Sequenase versión 2.0 (US Biochemical) y se verificó que X120.15 correspondía a un subfragmento de 121 pb (nucleótidos 10 a 130) del producto de PCR FF6.175 original. La secuencia de este clon se proporciona en SEQ ID N°:4.

pX120.15 se linealizó con EcoRI y se usó como molde para sintetizar una ribosonda antisentido marcada con ³²P, con RNA-polimerasa T7 (Ambion). Se hibridaron múltiples transferencias Northern humanas (Clontech) durante 18 horas a 60°C en NaPO₄ 400 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS al 5%, 1 mg/ml de BSA, 100 μg/ml de DNA de esperma de salmón sometido a ultrasonidos, formamida al 50% y 1 x 10⁶ cpm/ml ribosonda. Las membranas se lavaron cuatro veces durante 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente con 2 x SSC, SDS al 0,05%, seguido de dos lavados de 30 minutos a 65°C con 0,1 x SSC, SDS al 0,1%. Las membranas se sometieron luego a autorradiografía.

El análisis de transferencia Northern reveló que un RNAm de aproximadamente 3,8 kb, que hibridaba con la ribosonda X120.15 en condiciones altamente restrictivas, se expresaba ampliamente a través del cerebro humano (16 de las 16 regiones examinadas), con los niveles de expresión más elevados en el n úcleo subtalámico y el córtex cerebral. A fin de obtener un clon de DNAc completo correspondiente a este RNAm, se escrutó una biblioteca de DNAc del córtex cerebral humano en el vector del fago lambda DR2 (nº de catálogo HL1143X, Clontech), usando como

ES 2 292 193 T3

sonda el producto de PCR X120.15. X120.15 se marcó con ^{32}P mediante cebado aleatorio, usando el kit Decaprime II, según el protocolo del fabricante (Ambion). Se reprodujeron aproximadamente 9×10^5 placas por duplicado sobre filtros Hybond-N (Amersham). Estos filtros se hibridaron durante 18 horas a 42°C en NaPO₄, pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS al 5%, 1 mg/ml de BSA, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón sometido a ultrasonidos, formamida al 50% y, aproximadamente 3×10^5 cpm/ml de sonda. Los filtros se lavaron dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos, cada lavado en 2 x SSC, SDS al 1%, luego una vez durante 30 minutos a 55°C en 0,1 x SSC, SDS al 1%, y se autoradiografiaron. Se aisló un sólo clon que hibridaba (CCX-1) y se rescató en el plásmido pDR2 mediante conversión de cre-loxP. Este clon se denominó pCCX-1 y se sometió a análisis de secuencia de DNA, a través de secuenciación de DNA bicatenario con Sequenase versión 2.0 (US Biochemical).

La secuencia de nucleótidos del inserto de DNA albergada en pCCX-1 se representaba en SEQ ID Nº:2. El DNA de CCX-1 tiene aproximadamente 3850 pb de longitud y contiene 515 pb de secuencia 3' sin traducir; un marco de lectura abierto de 2724 pb; y, aproximadamente, 610 pb de secuencia 3' sin traducir. La ambigüedad relativa a la longitud de la región no traducida en 3' se debe a la dificultad para establecer el número exacto de nucleótidos en la cola poliA. El marco de lectura abierto de 2724 pb (nucleótidos 1 a 2724, SEQ ID Nº: 5) es idéntico en un 91,8% a la secuencia nucleotídica del mGluR8 de ratón (Duvoisin *et al.*, *J. Neuroscience* 15: 3075, 1995), desde los nucleótidos 1 a 2677. Sin embargo, una inserción de 55 nucleótidos que son está presente en el DNA del mGluR8 de ratón, empieza en el nucleótido 2678 del DNA de CCX-1 y se extiende hasta el nucleótido 2732. La secuencia nucleotídica desde 2733 a 2779 del DNA de CCX-1 presenta nuevamente una fuerte homología (89,4% de identidad) con los 47 nucleótidos que preceden al codón TGA del DNA del mGluR8 de ratón.

El marco de lectura abierto de 2724 pb del DNA de CCX-1 codifica una proteína de 908 aminoácidos (SEQ ID Nº:1), exactamente del mismo tamaño que la proteína mGluR8 de ratón. La secuencia de aminoácidos del nuevo mGluR humano es idéntica en un 97,5% a la secuencia de aminoácidos de mGluR8 (Duvoisin *et al.*, *J. Neuroscience* 15: 3075, 1995) hasta el residuo 893. Debido a esta identidad de secuencia, el nuevo mGluR humano se denomina aquí mGluR8. Sin embargo, como resultado de la inserción de 55 nucleótidos que contiene dos codones de parada internos al marco (TAATAG) en los nucleótidos 2725 a 2730, los 15 aminoácidos C-terminales codificados por el DNA de CCX-1 divergen completamente de los 15 aminoácidos correspondientes en el extremo carboxilo de la proteína mGluR8 de ratón.

El hecho de que los nucleótidos 2735 a 2779 en la región 3' sin traducir del DNA de CCX-1 codifiquen 15 aminoácidos de los cuales 14 son idénticos a los 15 aminoácidos correspondientes en el extremo carboxilo de la proteína mGluR8 de ratón, sugería fuertemente que la escisión alternativa podría producir un segundo RNAm de mGluR8. Esta variante de escisión del RNAm que carece de la inserción de 55 nucleótidos, codificaría una proteína mGluR8 humana con una secuencia de aminoácidos C-terminal casi idéntica a la de la proteína mGluR8 de ratón.

Se realizó un experimento basado en PCR para determinar si la inserción de 55 nucleótidos en el DNA de CCX-1 podía reflejar una escisión alternativa para producir dos RNAm humanos de mGluR8 que codificaban dos secuencias de aminoácidos C-terminales diferentes. Se diseñaron cebadores de PCR específicos (CCX.2: 5'-GAT GTA CAT CCA GAC AAC AAC AC-3', nucleótidos 2430 a 2452 de CCX-1) y (CCX.14: 5'-CAG ATT GTG CCA TTT CCC TGT TTC-3', complementario a los nucleótidos 2781 a 2804 de CCX-1) para flanquear las uniones de escisión putativas C-terminales (sintetizadas comercialmente por Midland Certified Reagent Company, Midland, TX). Estos cebadores se utilizaron para amplificar desde 10 ng cada uno de córtex cerebral humano, núcleo subtalámico y DNA de retiniana (Clontech, Palo Alto, CA), con las condiciones de reacción descritas anteriormente para el producto de amplificación de PCR X120.15. Se usó como testigo positivo una amplificación de aproximadamente 20 ng del DNA del plásmido pCCX1. Los productos de PCR resultantes se sometieron a electroforesis a través de gel de agarosa al 2% (Nusieve® GTG®, FMC, Rockland, ME), y posteriormente se transfirieron sobre una membrana de níquel (Hybond-N, Amersham) mediante transferencia capilar. La membrana se hibridó durante 18 horas a 37°C en 5 x SSC, NaPO₄ 25 mM, pH 7,5, 5 x Denhardt's, EDTA 5 mM, pirofosfato al 0,1%, SDS al 1%, formamida al 30%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón con una sonda oligonucleotídica de 24 unidades, (CCX.17: 5'-GGA AAT GAC AGA CCA AAT GGC GAG-3', nucleótidos 2617 a 2640 de CCX-1). Se marcaron con ^{32}P 100 ng de CCX.17 usando polinucleotido-quinasa T4 (New England Biolabs, Beverly, MA), se purificaron sobre una columna TE-10 (Clontech) y la reacción completa se usó para hibridación. La membrana se lavó cuatro veces a temperatura ambiente durante 5 minutos cada lavado en 2 x SSC, SDS al 0,1% y dos veces a 45°C durante 30 minutos cada lavado en 0,2 x SSC, SDS al 0,1%. La membrana se sometió a autorradiografía.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 6. Se amplificó un producto de PCR de 375 nucleótidos que hibridaba con el oligonucleótido CCX.17 marcado, a partir del núcleo subtalámico, el córtex cerebral y los DNA de la retina. Este producto era idéntico en tamaño al obtenido cuando el DNA del plásmido pCCX-1 se usaba como molde, indicando que una especie de RNAm que corresponde al DNA de CCX-1 (hmGluR 375) se expresa en los tres tejidos. Sin embargo, también se amplificaba a partir de los tres tejidos un producto de PCR adicional de aproximadamente 320 nucleótidos, que hibridaba con el oligonucleótido CCX.17 marcado (hmGluR 320).

Estos resultados demuestran que, a partir de la escisión alternativa, se producen dos especies de RNAm de mGluR8 diferentes; y ambas se expresan en la retina humana y en las dos regiones del cerebro humano que se examinaron. Los resultados son consecuentes con la conclusión de que la especie de RNAm que produce el producto de PCR de 320 nucleótidos en la Figura 6, hmGluR 320, representa un RNAm de mGluR8 humano, en el que el segmento de 55 nucleótidos se ha eliminado durante la escisión. Es bastante probable que la eliminación de este segmento produzca

ES 2 292 193 T3

un RNAm que codifique una proteína mGluR8 humana, en la que 14 de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal son idénticos al extremo C-terminal de la proteína mGluR8 de ratón. Como contraste, la segunda especie de RNAm, que produce el producto de PCR de 375 nucleótidos de la Figura 6, hmGluR 375, representa un RNAm de mGluR8 que corresponde al DNAc de CCX-1. El segmento de 55 nucleótidos se mantiene en este RNAm durante la escisión,

5 y produce una segunda proteína receptora mGluR8 humana con una secuencia de 15 aminoácidos diferente en el extremo carboxilo (SEQ ID N°:1), que es completamente divergente de la secuencia de 15 aminoácidos del extremo carboxilo del mGluR8 de ratón.

10 Ejemplo 3

Construcción de pHmGR8b

El DNA de pCCX-1 se digirió con XhoI y XbaI, liberando un fragmento que se extendía desde el nucleótido 825
15 en el DNAc de CCX-1, hasta el extremo de la cola poliA. Este fragmento (~2,5 Kb) se subclonó en los sitios XhoI y XbaI del vector de expresión de mamífero, DNAPc I/Amp (Invitrogen), y el clón resultante se denominó pHmGR8-3'. Se sintetizaron comercialmente (Midland Certified Reagent Company) los cebadores de PCR (CCX.6B: 5'-CAT GGG CCC TGA TGG AAG CTT CCA GAA GGT G-3', CCX.9: 5'-GAT GAA TCC CGA GCA ATT CGC TCC-3') y se usaron para amplificar un producto de PCR que contenía los nucleótidos -108 a 1184 del nuevo mGluR humano, a
20 partir de aproximadamente 20 ng de pCCX-1, bajo las condiciones de PCR descritas previamente para la amplificación del producto de PCR X120.15. El producto de PCR de 1,3 kb resultante se digirió con HindIII y EcoRI y se subclonó en los sitios correspondientes de pHmGR8-3', para producir una construcción de expresión del nuevo mGluR humano completo. El plásmido de expresión resultante (pHmGR8b) se sometió a un análisis de secuencia de DNA a través de
25 secuenciación de DNA bicatenario con Sequenase versión 2.0 (US Biochemical), para verificar que el fragmento de HindIII-EcoRI subclonado no contenía mutaciones inducidas por PCR.

Ejemplo 4

30 Activación funcional del nuevo receptor metabotrópico de glutamato expresado en ovocitos de *Xenopus*

Este ejemplo describe la activación del nuevo mGluR, usando una prueba de expresión de ovocito de *Xenopus*. El DNA de pHmGR8b se linealizó mediante digestión con enzimas de restricción y se sintetizó RNAc de una cadena sentido con extremo protegido, mediante transcripción con RNA-polimerasa T7. El RNA transcrita *in vitro* se concentró
35 mediante precipitación con etanol, y el tamaño e integridad del DNA se valoró sobre geles de agarosa desnaturizantes. Se sintetizaron de forma similar los RNAc para la subunidad del canal de potasio rectificadora de corriente entrante acoplada a la proteína G de rata (GIRK) (Kubo *et al.*, *Nature* 364:802, 1993) y la subunidad del canal de potasio rectificadora de corriente entrante cardíaca de rata (Ashford *et al.*, *Nature* 370:456, 1994; Krapivinsky *et al.*, *Nature* 374: 135, 1995).

40 Se aislaron ovocitos de *Xenopus* según un protocolo estándar. Se inyectaron ovocitos individuales con una mezcla de RNAc que contenía 5 ng de HmGR8b, 1,5 ng de GIRK y 1,5 ng de CIR; o una segunda mezcla testigo que contenía 1,5 ng de GIRK y 1,5 ng de CIR solos. Después de una incubación de 4 días, los ovocitos se bloquearon para el potencial, a un potencial de mantenimiento de -90 mV, usando técnicas estándar de bloqueo de potencial de dos
45 electrodos. Los ovocitos se perfundieron con una solución salina que contenía KCl 25 mM, NaCl 75 mM, CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,5. La presencia de KCl 25 mM desvía el potencial de equilibrio de los iones potasio (E_K) hasta un potencial más positivo (aproximadamente -40 mV), y esto permite la detección de corrientes a través de GIRK/CIR a potenciales negativos hasta aproximadamente -40 mV. Se usaron rampas de voltaje (1 segundo de duración) para determinar la amplitud de corriente a potenciales que variaban de -130 mV hasta +20 mV, bajo
50 condiciones de control y en presencia de L-glutamato.

En solución salina que contenga KCl 25 mM, una rampa de voltaje de -130 mV hasta +20 mV producía una corriente rectificadora de entrada a potenciales inferiores a -40 mV (véase Figura 7, testigo), para ovocitos a los que se les había inyectado una mezcla de RNAc de GIRK/CIR o la mezcla de RNAc de HmGR8b/GIRK/CIR. Esta corriente de entrada es típica en ovocitos que expresan GIRK/CIR, e indica el nivel basal de activación de GIRK/CIR.

En ovocitos a los que se les había inyectado la mezcla de RNAc de HmGR8b/GIRK/CIR, la corriente de entrada se incrementó adicionalmente mediante aplicación de L-glutamato 100-300 μM y los incrementos netos de corriente excedían típicamente 1000 nA, a un potencial de membrana de -130 mV (véase Figura 7, L-glutamato 300 μM). No se observaba ningún cambio en las amplitudes de corriente por debajo de -40 mV. Este efecto de la aplicación de L-glutamato no se observaba con ovocitos a los que sólo se les había inyectado RNAc de GIRK/CIR. Estos datos indican que la expresión conjunta de HmGR8b y RNAc de GIRK/CIR en ovocitos de *Xenopus* produce la activación intensa del complejo del canal de potasio GIRK/CIR, a través de la activación de un receptor mGluR8 humano funcional con L-glutamato.

ES 2 292 193 T3

Ejemplo 5

Construcción de pCEP4-HmGR8b

5 El DNA del plásmido pHmGR8b se digirió con HindIII, y los extremos de HindIII escindidos se hicieron romos con el fragmento de Klenow de la DNA-polimerasa I (New England Biolabs), usando condiciones estándar (Sambrook *et al.*, *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El DNA se digirió a continuación con XbaI y el fragmento de 3,4 Kb que codificaba mGluR8 humano se aisló en agarosa de punto de fusión bajo, tras la separación electroforética del DNA del vector pcDNA I Amp. El fragmento de 3,4 Kb se subclonó 10 a continuación en el vector de expresión de mamíferos episómico pCEP4, disponible comercialmente (Invitrogen). Para lograr ésto, el DNA del plásmido pCEP4 se digirió primero con PvuII, y, posteriormente, con NheI. El fragmento de 3,4 Kb de XbaI, de extremos romos, que codificaba mGluR8 humano se ligó en los sitios PvuII y NheI de pCEP4. El plásmido resultante se denominó pCEP4-HmGR8b, y su integridad se validó mediante mapeo con enzimas de restricción y secuenciación de DNA bicatenario, usando Sequenase versión 2.0 (US Biochemical).

15

Ejemplo 6

Transfección y expresión estable del nuevo mGluR en células de mamífero

20 Este ejemplo proporciona un método para la producción de líneas celulares de mamífero transfectadas de forma estable que expresan el nuevo mGluR humano, pero no está destinado a ser limitativo. Se cultivaron células de riñón embrionario humano (293, ATCC, CRL 1573) de forma rutinaria. Las células se sembraron en placas de cultivo celular de 10 cm en medio de Eagle modificado con Dulbecco (D-MEM) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) y IX penicilina-estreptomicina (Life Technologies), de forma que eran confluentes aproximadamente al 70% 25 tras incubación durante la noche. Para preparar DNA para transfección, el plásmido pCEP4-HmGR8b se precipitó con etanol, se aclaró y se volvió a poner en suspensión en agua estéril a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se incubaron catorce microgramos del DNA plasmídico con la formulación liposómica LipofectAMINE® (Life Technologies) durante 20 minutos en 1,7 ml de Opti-MEM exento de suero (Life Technologies). Después de la incubación a temperatura 30 ambiente, se añadieron 6,8 mls de Opti-MEM a la mezcla de transfección. Esta solución se añade a las células que se han aclarado dos veces con lavados de 5 ml de Opti-MEM. Las células y la mezcla de transfección se incuban a 37°C durante 5 horas, momento en el que se añaden 8,5 ml de Opti-MEM/FBS al 20%, para llevar la concentración de FBS hasta el 10%. Tras una incubación durante la noche, el medio se cambia de nuevo a D-MEM con FBS al 10%, 35 IX penicilina-estreptomicina y glutamina 2 mM. Tras una incubación adicional de 24 h, las células se separan con tripsina y se vuelven a sembrar en placa en un medio que contiene 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina (Boehringer Mannheim). Aquellas células que crecen, deberían contener pCEP4-HmGR8b, que codifica el gen de resistencia a higromicina. Las líneas de células clonales individuales se recuperan y propagan, usando técnicas de cultivo de tejidos estándar. Se 40 pueden preparar subcultivos, tanto de líneas de células clónicas individuales, como de conjuntos de muchas de tales líneas celulares, mediante disociación en medio de cultivo de tejido reciente, y siembra en placa en placas de cultivo recientes, con intervalos de 1:10 células. La expresión del nuevo RNAm de mGluR de la presente invención en líneas celulares clonales, se puede valorar mediante análisis de transferencia Western, para identificar líneas celulares que presentan elevados niveles de expresión de RNAm.

Ejemplo 7

Activación funcional del nuevo mGluR expresado en células de mamífero

45 El nuevo mGluR humano es, probablemente, un miembro de la subfamilia del Grupo III de mGluR, que incluye el mGluR4 de rata y humano (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8: 169, 1992; Flor *et al.*, *Neuropharmacol.* 34: 149, 1994), mGluR6 de rata (Nakajima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 11868, 1993), mGluR7 de rata y humano (Okamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 1231, 1994; Flor *et al.*, *Soc. Neurosci. Abstr.* 20:468, 1994) y mGluR8 de ratón (Duvoisin *et al.*, *J. Neuroscience* 15: 3075, 1995). Como estos otros mGluRs del grupo III, se espera que el nuevo mGluR codifique un receptor acoplado a G_i (acoplado de forma inhibidora a adenilil-ciclasa). Las líneas celulares de mamífero transfectadas de forma estable con la construcción de expresión pCEP4-HmGR8b se pueden utilizar para examinar la inhibición inducida por glutamato de la adenilin-ciclasa, en la que interviene la activación del mGluR8 humano. La actividad de la adenilil-ciclasa se puede valorar midiendo la acumulación de AMPc tras la exposición de células transfectadas a forskolina, en presencia o ausencia de glutamato u otros agonistas de mGluR, según se describió previamente (Tanabe *et al.*, *Neuron* 8: 169, 1992; Nakajima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 2437, 1992). En resumen, las células clonales se siembran 50 en placas de 12 pocillos, a una densidad de 1,5 x 10⁵ células por pocillo, y se dejan crecer durante 3 días. Después de una preincubación de 20 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 3-isobutil-1-metil-xantina 1 mM (IBMS) a 37°C, las células se incuban con PBS reciente que contiene forskolina 10 μM , IBMX 1 Mm y sustancias de prueba, durante 10 minutos. El medio se aspira y la reacción se detiene con etanol. Los niveles de AMPc 55 se miden mediante radioinmunoanálisis con un kit (Amersham). Para el tratamiento con toxina de Pertussis (PTX), las células se preincuban con concentraciones variables de PTX, durante 11 horas a 37°C.

ES 2 292 193 T3

Ejemplo 8

Pruebas de unión a receptor recombinante

5 El siguiente es un ejemplo de una prueba de detección rápida para obtener compuestos que se fijan al sitio de unión del glutamato del nuevo mGluR humano. La prueba de detección mide la fijación de compuestos a mGluRs recombinantes expresados en células de mamífero transfectadas de forma estable (O'Hara *et al.*, *Neuron* 11:41, 1993). Las células transfectadas de forma estable con la construcción de expresión pCEP4-HmGR8b se dejaron crecer hasta la confluencia, se aclararon dos veces con PBS, y se recogieron mediante raspado en PBS. Las células recogidas se conformaron en glóbulos mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se congelaron a -70°C. Las membranas celulares se prepararon homogeneizando el glóbulo dos veces con Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EDTA 10 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 0,1 mM (PMSF), ácido D,L-bencil-succínico 0,1 mM, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina de clara de huevo de pavo; centrifugación a 30.000 x g durante 10 minutos a 4°C; luego tratamiento con DNasa y recogida mediante centrifugación. Las suspensiones de membrana se lavan dos veces y se vuelven a poner en suspensión en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), CaCl₂ 2,5 mM (Tris/Ca) y la concentración de proteína total se ajusta hasta 450-675 µg/ml. Para pruebas de unión, se añaden 25 µl de [³H]glutamato 200 nM (Dupont NEN) a 225 µl de suspensión de membrana, en presencia o ausencia de competidor frío (glutamato 10 mM), y se incuba sobre hielo durante 1 hora. Las pruebas se detienen mediante la adición rápida de cuatro ml de tampón Tris/Ca enfriado en hielo, y recogida inmediata de las membranas sobre filtros GF/C de Whatman mediante filtración al vacío. Se añadieron diez ml de Optifluor (Packard) a filtros en viales de centelleo, y la radioactividad se cuantificó mediante recuento de centelleo.

25 El ejemplo anterior está destinado a ser limitativo. En un contexto más amplio, se pueden desarrollar por los expertos en la técnica pruebas de unión similares utilizando otros radioligandos que se fijen al sitio de unión del glutamato u otros sitios sobre el mGluR humano. Tales pruebas se pueden utilizar para medir la fijación de compuestos a receptores o fragmentos de receptores expresados de forma recombinante. Los compuestos que se fijan al nuevo mGluR humano, se pueden examinar después para su capacidad de modular una o más actividades funcionales de este mGluR.

30 Ejemplo 9

*Detección de moléculas usando ovocitos de *Xenopus**

35 Los ovocitos a los que se había inyectado la mezcla de RNAc HmGR8b/GIRK/CIR, descritos en el Ejemplo 4, proporcionan un sistema para valorar las acciones de compuestos nuevos sobre el nuevo mGluR humano, midiendo la actividad del canal de potasio rectificador de corriente de entrada. Los compuestos se pueden valorar para la activación funcional de mGluR8, en ausencia de glutamato u otros agonistas de mGluR conocidos (actividad agonista); acentuación de la activación de mGluR8 humano por glutamato u otros agonistas de mGluR conocidos (modulación alostérica positiva); o bloqueo de la activación de mGluR8 por glutamato u otros agonistas de mGluR conocidos (actividad antagonista).

Ejemplo 10

Detección de moléculas usando mGluRs recombinantes expresados en líneas celulares transfectadas de forma estable

45 Las líneas celulares transfectadas de forma estable con las nuevas construcciones de expresión de mGluR humano, según se describieron en el Ejemplo 6, se pueden utilizar para valorar la afinidad de compuestos sobre el nuevo mGluR humano, utilizando pruebas de fijación, según se describió en el Ejemplo 8.

50 Además, se pueden utilizar líneas celulares transfectadas de forma estable con construcciones de expresión de mGluR8 humano, según se describió en el Ejemplo 6, para valorar las acciones de compuestos sobre el nuevo mGluR8 humano, midiendo la producción de AMPc estimulada por forskolina, según se describió en el Ejemplo 7. La activación funcional del mGluR8 humano inhibirá la producción de AMPc estimulada por forskolina en tales líneas celulares.

55 Alternativamente, se pueden utilizar líneas celulares que expresan conjuntamente mGluR8 humano en combinación con las subunidades del canal de potasio GIRK y CIR, para valorar la acción de compuestos sobre el nuevo mGluR8. Como en el caso de los ovocitos de *Xenopus* (Ejemplo 4), la activación funcional del mGluR8 humano debería conducir a la activación del canal de potasio GIRK/CIR en líneas celulares que expresan conjuntamente mGluR8, GIRK y CIR.

60 Los compuestos se pueden valorar para la activación funcional de mGluR8 humano en ausencia de glutamato u otros agonistas de mGluR conocidos (actividad agonista); acentuación de la activación de mGluR8 humano por glutamato u otros agonistas de mGluR conocidos (modulación alostérica positiva); o bloqueo de la activación de mGluR8 humano mediante glutamato u otros agonistas de mGluR conocidos (actividad antagonista).

65 Otras realizaciones están incluidas en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína receptora metabotrópica de glutamato, que comprende al menos 6 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos 894 a 908, mostrada en la Figura 1.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácido 894 a 908 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.
- 15 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína receptora metabotrópica de glutamato que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.
- 20 4. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la secuencia mostrada en la Figura 5.
- 25 5. Una molécula de ácido nucleico que comprende una parte de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, teniendo dicha parte al menos 18 nucleótidos de longitud y codificando al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 894 a 908 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.
- 30 6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5, que comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 2678 a 2724 mostrada en la Figura 5.
- 35 7. La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 5 o 6, que codifica al menos 30 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.
- 40 8. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio extracelular contenido en la secuencia de aminoácidos según se muestra en la Figura 1, en la que la secuencia de aminoácidos codificada está exenta sustancialmente de porciones de dominio que se extiende en la membrana y porciones de dominio intracelular, o una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia complementaria a la misma.
- 45 9. La secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 8, en la que dicha molécula de ácido nucleico está acoplada transcripcionalmente a una segunda molécula de ácido nucleico que codifica los dominios transmembranal e intracelular de un receptor no metabotrópico de glutamato, o una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia complementaria a la misma.
- 50 10. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio extracelular y dominios que se extienden en la membrana, contenida en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, en la que la secuencia de aminoácidos codificada está exenta sustancialmente de porciones de dominio intracelular, o una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia complementaria a la misma.
- 55 11. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio transmembranal de un receptor mGluR8, contenido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, en la que la secuencia de aminoácidos codificada está exenta sustancialmente de dominios intracelular y extracelular, o una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia complementaria a la misma.
- 60 12. Una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 65 13. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende una secuencia de DNA genómico, una secuencia de DNaC, o una secuencia de RNA.
- 70 14. Un polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos procedente de los residuos de aminoácido 894 a 908 de la secuencia de aminoácidos según se muestra en la Figura 1, y que es codificada por una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13.
- 75 15. El polipéptido de la reivindicación 14, que comprende los residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, que comprende el dominio intracelular de un receptor mGluR8.
- 80 16. El polipéptido de la reivindicación 14 o 15, que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 894 a 908 mostrada en la Figura 1.

ES 2 292 193 T3

17. Un vector de expresión biológicamente funcional, que comprende una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 5 18. Una célula hospedadora procariótica o eucariótica transformada o transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 17.
19. La célula hospedadora de la reivindicación 18, en la que dicha célula hospedadora es una célula de vertebrado.
- 10 20. Un procedimiento para la producción de un producto polipeptídico, comprendiendo dicho proceso: cultivar células hospedadoras procarióticas o eucarióticas transformadas o transfectadas con el vector de expresión de la reivindicación 19, bajo condiciones de nutrientes adecuadas, de forma que permitan la expresión del producto polipeptídico codificado en dicha molécula de ácido nucleico insertada en dicho vector de expresión.
- 15 21. El proceso de la reivindicación 20, que comprende adicionalmente el aislamiento de dicho producto polipeptídico.
- 20 22. Un método para crear un mamífero transgénico no humano, que comprende la etapa de insertar en un mamífero no humano una molécula de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, o una de sus porciones biológicamente funcionales, que comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de residuos 894 a 908 mostrada en la Figura 1.
- 25 23. Un método de detección de un compuesto que se fija a un receptor metabotrópico de glutamato que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, o una de sus porciones biológicamente funcionales, o modula su actividad, que comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de residuos 894 a 908 mostrada en la Figura 1, que comprende:
- 30 (a) introducir dicho receptor metabotrópico de glutamato y un compuesto potencial en un medio aceptable; y
(b) supervisar la fijación o modulación mediante medios detectables físicamente, identificando así aquellos compuestos que interaccionan con dicho receptor metabotrópico de glutamato o modulan su actividad.
- 35 24. El método de la reivindicación 23, en el que dicho receptor metabotrópico de glutamato es un receptor quimérico que tiene
(a) un dominio extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos contenida en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1; y
(b) un dominio intracelular de un receptor diferente del receptor que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.
- 40 25. El método de la reivindicación 23, que comprende una prueba de fijación competitiva con una sustancia de fijación conocida marcada.
- 45 26. El método de la reivindicación 23, en el que el receptor metabotrópico de glutamato se expresa por una célula, comprendiendo además supervisar el efecto de dicho compuesto sobre dicha célula.
27. El método de la reivindicación 26, en el que la célula es una célula eucariótica.
- 50 28. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 29. Uso de una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en excitotoxicidad de glutamato, ictus isquémico y hemorrágico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño celular nervioso inducido por hipoxia, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.
- 60 30. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que inhibe específicamente la expresión del receptor metabotrópico de glutamato, en la que dicho receptor metabotrópico de glutamato comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos procedente de los residuos 894 a 908 mostrada en la Figura 1 y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en la que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido o una ribozima dirigida a un ácido nucleico que codifica dicho receptor metabotrópico de glutamato.
- 65 31. Uso de una molécula de ácido nucleico que inhibe específicamente la expresión de un receptor metabotrópico de glutamato, en la que dicho receptor metabotrópico de glutamato comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de residuos 894 a 908 mostrada en la Figura 1, para la preparación de una composición

ES 2 292 193 T3

farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en excitotoxicidad de glutamato, ictus isquémico y hemorrágico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, daño celular nervioso inducido por hipoxia, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington, y en la que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido o una ribozima dirigida a un ácido nucleico que codifica dicho receptor metabotrópico de glutamato.

5 32. Una sustancia que se fija al receptor metabotrópico de glutamato, que es un anticuerpo purificado y es capaz de fijarse selectivamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de residuos 894 a 908 mostrada en la Figura 1, y un tampón farmacéuticamente aceptable.

10 33. La sustancia de fijación de la reivindicación 32, en la que dicho anticuerpo está acoplado a una toxina.

15 34. Un método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad en un paciente, que comprende las etapas de:

20 (a) identificar el número o localización de uno o más receptores metabotrópicos de glutamato, donde dichos receptores metabotrópicos de glutamato comprenden al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos procedente de los residuos de aminoácido 894 a 908 mostrada en la Figura 1, en dicho paciente; y

25 (b) comparar dicho número o localización con los observados en pacientes normales, o en un paciente que se sabe que tiene dicha enfermedad o trastorno.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 292 193 T3

10	20	30	40	50	60	70
*	*	*	*	*	*	*
MVCEGKRSAS CPCFFLLTAK FYWILTMQR THSOEYAHSI RVDGDIILGG LFPVHAKGER GVPKGELKKE						
80	90	100	110	120	130	140
*	*	*	*	*	*	*
KGIHRLEAML YAIDQINKDP DLLSNITLGV RILDTCSDT YALEDSLTFV QALIEKDASD VKCANGDPPI						
150	160	170	180	190	200	210
*	*	*	*	*	*	*
FTKPDKISGV IGAAASSVSI MVANILRLFK IPOISYASTA PELSONTRYD FFSRVVPPDS YQAQAMVDIV						
220	230	240	250	260	270	280
*	*	*	*	*	*	*
TALGWNYVST LASEGNYGES GVEAFTQISR EIGGVCIAQS OKIPREPRPG EFEKIIKRLL ETPNARAVIM						
290	300	310	320	330	340	350
*	*	*	*	*	*	*
FANEDDIRRI LEAAKKLNQS GHFLWIGSDS WGSKIAPVYQ QEETIAGAVT ILPKRASIDG FORYFRSRSL						
360	370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*	*
ANNRRNVWFA EFWEENFGCK LGSHGKRNSH IKKCTGLERI AROSSYEDEG KVQFVIDAVY SMAYALHNMH						
430	440	450	460	470	480	490
*	*	*	*	*	*	*
KDLCPGYIGL CPRMSTIDGK ELLGYIRAVN FNGSAGTPYT FNENGDAAPGR YDIFQYQITN KSTEYKVIGH						
500	510	520	530	540	550	560
*	*	*	*	*	*	*
WTNQLHLKVE DMQWAHRENT HPASVCSLPC KPGERKKTVK GYPCCWHCER CEGNYQVDE LSCELCPLDQ						
570	580	590	600	610	620	630
*	*	*	*	*	*	*
RPNMMRTGCQ LIPIIKLEWH SPWAVVPVFV AILGIIATTF VIVTFVRYND TPIVRASGRE LSYVLLTGIF						
640	650	660	670	680	690	700
*	*	*	*	*	*	*
LCYSITFLMI AAPDTIICSF RRVFLGLGMC FSYAALLTKT NRIHRIFEQG KKSVTAPKFI SPASQLVITF						
710	720	730	740	750	760	770
*	*	*	*	*	*	*
SLISVQLLGV FWFWVVDPFH IIDYGEQRT LOPEKARGVL KCDISDLISI CSLGYSILLM VTCTVYAIKT						
780	790	800	810	820	830	840
*	*	*	*	*	*	*
RGVPETFNEA KPIGFTMYTT CIIWLAFIPI FFGTAQSAEK MYIQTTTLTV SMSLSASVSL GMLYMPKYYI						
850	860	870	880	890	900	
*	*	*	*	*	*	
IIFHPEQNVO KRKRSPFKAVV TAATMOSKLI QKGNDRPNGE VKSELCESLE TNSKSSVEFP HVKSGSTS						

Fig. 1

ES 2 292 193 T3

-506	-496	-486	-476	-466	-456
*	*	*	*	*	*
GCGGCCGCCG GTGGGAGTAT TTGTTATTCA CATGGAAGAG ACTTGCGGCC TGCTAGGCCA					
-446	-436	-426	-416	-406	-396
*	*	*	*	*	*
GCTCAGCCCC CTCAGCCCCAG AGATCAGCCA CAAGTGCAGGC CGCTGTGCTC GCCTCACGCG					
-386	-376	-366	-356	-346	-336
*	*	*	*	*	*
GCGGCCGCCGG CGGCGGCCGGC GGCGCGTACG TGGAGCTGCG GGCCCCCGGC GGGCTTCCTC					
-326	-316	-306	-296	-286	-276
*	*	*	*	*	*
ACCGCGCCCT CTGCAGGGAG CAGGGAAATAA TTCTGCTACA AGGCTGATTT CAAGGACATG					
-226	-256	-246	-236	-226	-216
*	*	*	*	*	*
AATTGTTGAC CTCATCCCAA CATCAGAACCC TCAGATGTTTC TAATTTTGC ACCATTCCAG					
-206	-196	-186	-176	-166	-156
*	*	*	*	*	*
GCAAGTTGAT CTTATAAGGA AATAAAATTG AACCTTAGGG GTCTGATGGA AATTCACTGT					
-146	-136	-126	-116	-106	-96
*	*	*	*	*	*
GACATTCAAA TCAAGAAAAC TTGCTAATGC CCACAGAGCC TTTTCCCCAT GGGCCCTGAT					
-86	-76	-66	-56	-46	-36
*	*	*	*	*	*
GGTAGCCTCC AGAAGGTGCA GCCTCAGGTG GTGCCCTTC TTCTGTGGCA AGAATAAAACT					
-26	-16	-6	5	15	25
*	*	*	*	*	*
TTGGGTCTTG GATTGCAATA CCACCTGTGG AGAAAATGGT ATGCGAGGGGA AAGCGATCAG					
35	45	55	65	75	85
*	*	*	*	*	*
CCTCTTGCCC TTGTTCTTC CTCTTGACCG CCAAGTTCTA CTGGATCCTC ACAATGATGC					
95	105	115	125	135	145
*	*	*	*	*	*
AAAGAACTCA CAGCCAGGAG TATGCCATT CCATAACGGGT GGATGGGGAC ATTATTTGG					
155	165	175	185	195	205
*	*	*	*	*	*
GGGGTCTCTT CCCTGTCCAC GCAAAGGGAG AGAGAGGGGT GCCTTGTGGG GAGCTGAAGA					
215	225	235	245	255	265
*	*	*	*	*	*
AGGAAAAGGG GATTACAGA CTGGAGGCCA TGCTTATGC AATTGACCAG ATTAACAAGG					

Fig. 2A

ES 2 292 193 T3

275	285	295	305	315	325
*	*	*	*	*	*
ACCTGATCT CCTTCCAAC ATCACTCTGG GTGTCCGCAT CCTCGACACG TGCTCTAGG					
335	345	355	365	375	385
*	*	*	*	*	*
ACACCTATGC TTGGAGCAG TCTCTAACAT TCGTGCAGGC ATTAATAGAG AAAGATGCTT					
395	405	415	425	435	445
*	*	*	*	*	*
CGSATGTGAA GTGTGCTAAT GGAGATCCAC CCATTTCAC CAAGCCGAC AAGATTTCTG					
455	465	475	485	495	505
*	*	*	*	*	*
GCGTCATAGG TGCTGCAGCA AGCTCCGTGT CCATCATGGT TGCTAACATT TTAAGACTTT					
515	525	535	545	555	565
*	*	*	*	*	*
TTAAGATAACC TCAAATCAGC TATGCATCCA CAGCCCCAGA GCTAAGTGAT AACACCAGGT					
575	585	595	605	615	625
*	*	*	*	*	*
ATGACTTTT CTCTCGAGTG GTTCCGCCTG ACTCCTACCA AGCCAAGCC ATGGTGGACA					
635	645	655	665	675	685
*	*	*	*	*	*
TCGTGACAGC ACTGGGATGG AATTATGTTT CGACACTGGC TTCTGAGGGG AACTATGGTG					
695	705	715	725	735	745
*	*	*	*	*	*
AGAGCGGTGT GGAGGCCTTC ACCCAGATCT CGAGGGAGAT TGGTGGTGT TGCAATTGCTC					
755	765	775	785	795	805
*	*	*	*	*	*
AGTCACAGAA AATCCCACGT GAACCAAGAC CTGGAGAATT TGAAAAAATT ATCAAACGCC					
815	825	835	845	855	865
*	*	*	*	*	*
TGCTAGAAC ACCTAATGCT CGAGCAGTGA TTATGTTGC CAATGAGGAT GACATCAGGA					
875	885	895	905	915	925
*	*	*	*	*	*
GGATATTGGA AGCAGCAAAA AAACTAAACC AAAGTGGCA TTTCTCTGG ATTGGCTCAG					
935	945	955	965	975	985
*	*	*	*	*	*
ATAGTTGGGG ATCCAAAATA GCACCTGTCT ATCAGCAAGA AGAGATTGCA GAAGGGCTG					
995	1005	1015	1025	1035	1045
*	*	*	*	*	*
TGACAAATTG GCCAAACGA GCATCAATTG ATGGATTGCA TCGATACTTT AGAAGCCGAA					

Fig. 2B

ES 2 292 193 T3

1055	1065	1075	1085	1095	1105
*	*	*	*	*	*
CTCTTGCCAA TAATCGAAGA AATGTGTGGT TTGCAGAATT CTGGGAGGAG AATTTTGGCT					
1115	1125	1135	1145	1155	1165
*	*	*	*	*	*
GCAAGTTAGG ATCACATGGG AAAAGGAACA GTCATATAAA GAAATGCACA GGGCTGGAGC					
1175	1185	1195	1205	1215	1225
*	*	*	*	*	*
GAATTGCTCG GGATTCATCT TATGAACAGG AAGGAAAGGT CCAATTGTA ATTGATGCTG					
1235	1245	1255	1265	1275	1285
*	*	*	*	*	*
TATATTCCAT GGCTTACGCC CTGCACAATA TGACAAAGA TCTCTGCCT GGATACATTG					
1295	1305	1315	1325	1335	1345
*	*	*	*	*	*
GCCTTTGCC ACGAATGAGT ACCATTGATG GGAAAGAGCT ACTTGGTTAT ATTGGGGCTG					
1355	1365	1375	1385	1395	1405
*	*	*	*	*	*
TAAATTTAA TGGCAGTGCT GGCACTCCTG TCACTTTAA TGAAAACGGA GATGCTCTG					
1415	1425	1435	1445	1455	1465
*	*	*	*	*	*
GACGTTATGA TATCTCCAG TATCAAATAA CCAACAAAAG CACAGAGTAC AAAGTCATCG					
1475	1485	1495	1505	1515	1525
*	*	*	*	*	*
GCCACTGGAC CAATCAGCTT CATCTAAAAG TGGAAGACAT GCAGTGGGCT CATAGAGAAC					
1535	1545	1555	1565	1575	1585
*	*	*	*	*	*
ATACTCACCC GGCGTCTGTC TGCAAGCTGC CGTGTAAGCC AGGGGAGAGG AAGAAAAACGG					
1595	1605	1615	1625	1635	1645
*	*	*	*	*	*
TGAAAGGGGT CCCTTGCTGC TGGCACTGTG AACGCTGTGA AGGTTACAAC TACCAGGTGG					
1655	1665	1675	1685	1695	1705
*	*	*	*	*	*
ATGAGCTGTC CTGTGAACCT TGCCCTCTGG ATCAGAGACC CAACATGAAC CGCACAGGCT					
1715	1725	1735	1745	1755	1765
*	*	*	*	*	*
GCCAGCTTAT CCCCATCATC AAATTGGAGT GGCATTCTCC CTGGGCTGTG GTGCCCTGTGT					
1775	1785	1795	1805	1815	1825
*	*	*	*	*	*
TTGTTGCAAT ATTGGGAATC ATGCCACCA CCTTTGTGAT CGTGACCTTT GTCCGCTATA					
1835	1845	1855	1865	1875	1885
*	*	*	*	*	*
ATGACACACC TATGTTGAGG GCTTCAGGAC GCGAACTTAG TTACGTGCTC CTAACGGGGA					

Fig.2C

ES 2 292 193 T3

1895	1905	1915	1925	1935	1945
*	*	*	*	*	*
TTTTCTCTG TTATTCAATC ACGTTTTAA TGATTGCAGC ACCAGATACA ATCATATGCT					
1955	1965	1975	1985	1995	2005
*	*	*	*	*	*
CCTTCCGACG GGTCTTCCTA GGACITGGCA TGTGTTTCAG CTATGCAGCC CTTCTGACCA					
2015	2025	2035	2045	2055	2065
*	*	*	*	*	*
AAACAAACCG TATCCACCGA ATATTTGAGC AGGGGAAGAA ATCTGTCACA GCGCCCAAGT					
2075	2085	2095	2105	2115	2125
*	*	*	*	*	*
TCATTAGTCC AGCATCTCAG CTGGTGATCA CCTTCAGCCT CATCTCCGTC CAGCTCCTG					
2135	2145	2155	2165	2175	2185
*	*	*	*	*	*
GAGTGTGGT CTGGTTGGT GTGGATCCCC CCCACATCAT CATTGACTAT GGAGAGCAGC					
2195	2205	2215	2225	2235	2245
*	*	*	*	*	*
GGACACTAGA TCCAGAGAAG GCCAGGGGAG TGCTCAAGTG TGACATTTCT GATCTCTCAC					
2255	2265	2275	2285	2295	2305
*	*	*	*	*	*
TCATTTGTT ACCTGGATAAC AGTATCCTCT TGATGGTCAC TTGTACTGTT TATGCCATTA					
2315	2325	2335	2345	2355	2365
*	*	*	*	*	*
AAACGAGAGG TGTCCCAGAG ACTTTCAATG AAGCCAAACC TATTGGATTT ACCATGTATA					
2375	2385	2395	2405	2415	2425
*	*	*	*	*	*
CCACCTGCAT CATTGGTTA GCTTTCATCC CCATCTTTTG TGGTACAGCC CAGTCAGCAG					
2435	2445	2455	2465	2475	2485
*	*	*	*	*	*
AAAAGATGTA CATCCAGACA ACAACACTTA CTGTCCTCAT GAGTTAACGT GCTTCAGTAT					
2495	2505	2515	2525	2535	2545
*	*	*	*	*	*
CTCTGGGCAT GCTCTATATG CCCAAGGTTT ATATTATAAT TTTTCATCCA GAACAGAATG					
2555	2565	2575	2585	2595	2605
*	*	*	*	*	*
TTCAAAAAACG CAAGAGGAGC TTCAAGGCTG TGGTGACAGC TGCCACCATG CAAGCAAAC					
2615	2625	2635	2645	2655	2665
*	*	*	*	*	*
TGATCCAAA AGGAATGAC AGACCAAATG GCGAGGTGAA AAGTGAACTC TGTGAGAGTC					
2675	2685	2695	2705	2715	2725
*	*	*	*	*	*
TTGAAACCAA CAGTAAGTCA TCTGTAGAGT TTCCGATGGT CAAGAGCGGG AGCACTTCCT					

Fig. 2D

ES 2 292 193 T3

2735	2745	2755	2765	2775	2785
*	*	*	*	*	*
AATAGATCTT CCTCTACCAA GACAACATAT ATCAGTTACA GCAATCATTG AATCTGAAAC					
2795	2805	2815	2825	2835	2845
*	*	*	*	*	*
AGGGAAATGG CACAATCTGA AGAGACGTGG TATATGATCT TAAATGATGA ACATGAGACC					
2855	2865	2875	2885	2895	2905
*	*	*	*	*	*
GCAAAAATTC ACTCCTGGAG ATCTCCGTAG ACTACAATCA ATCAAATCAA TAGTCAGTCT					
2915	2925	2935	2945	2955	2965
*	*	*	*	*	*
TGTAAGGAAC AAAAATTAGC CATGAGCCAA AAGTATCAAT AAACGGGGAG TGAAGAAACC					
2975	2985	2995	3005	3015	3025
*	*	*	*	*	*
CGTTTTATAC AATAAAACCA ATGAGTGTCA AGCTAAAGTA TTGCTTATTG ATGAGCAGTT					
3035	3045	3055	3065	3075	3085
*	*	*	*	*	*
AAAACAAATC ACAAAAGGAA AACTAATGTT AGCTCGTGA AAAATGCTG TTGAAATAAA					
3095	3105	3115	3125	3135	3145
*	*	*	*	*	*
TAATGTCTGA TGTTATTCTT GTATTTTCT GTGATTGTGA GAACTCCCGT TCCGTGCCA					
3155	3165	3175	3185	3195	3205
*	*	*	*	*	*
CATTGTTTAA CTTGTATAAG ACAATGAGTC TGTTTCTTGT AATGGCTGAC CAGATTGAAG					
3215	3225	3235	3245	3255	3265
*	*	*	*	*	*
CCCTGGGTTG TGCTAAAAAT AAATGCAATG ATTGATGCAT GCAATTTTT ATACAAATAA					
3275	3285	3295	3305	3315	
*	*	*	*	*	
TTTATTTCTA ATAATAAAGG AATGTTTTGC AAATGTTAAA AAAAAAAAAA AAA					

Fig. 2E

ES 2 292 193 T3

10 20 30 40 50
* * * * *
CCCCCACATC TACATTGACT ATGGAGAGCA GCGGAÇACTA GATCCAGAGA

60 70 80 90 100
* * * * *
AGGCCAGGGG AGTGCTCAAG TGTGACATTT CTGATCTCTC ACTCATTTGT

110 120 130 140 150
* * * * *
TCACTTGGAT ACAGTATCCT CTTGATGGTC ACTTCTACTG TTTATGCCAT

160
*
TAAAACGAGA GGTGTC

Fig. 3

ES 2 292 193 T3

10 20 30 40 50
* * * * *
CTACATTGAC TATGGAGAGC AGCGNACACT AGATCCAGAG AAGGCCAGGG

60 70 80 90 100
* * * * *
GAGTGCTCAA GTGTGACATT TCTGATCTCT CACTCATTTG TTCACTTGGA

110 120
* *
TACAGTATCC TCTTGATGGT C

Fig. 4

ES 2 292 193 T3

10	*	20	*	30	*	40	*	50	*	60	*	70	*	80	*	90	*	100
*	ATGGTATGCG	AGGGAAAGCG	ATAGCCCTT	TGCCCTTGT	TCTCCCTT	GACGCCAG	TTCIACCTGA	TCTCACAA	GATGCAAAGA	ACTCACAGC	*	*	*	*	*	*	*	*
110	*	120	*	130	*	140	*	150	*	160	*	170	*	180	*	190	*	200
*	AGGAGTAIGC	CCATTCATA	CGGGTGGATG	GGGACATTAT	TTTGGGAGGT	CCTCTCTG	TCCACGCCAA	GAGAGAGAGA	GGGGTGCCTT	GTGGGGAGCT	*	*	*	*	*	*	*	*
210	*	220	*	230	*	240	*	250	*	260	*	270	*	280	*	290	*	300
*	GAAGAAGGAA	AAGGGGATT	ACAGACTGGA	GGGGCACTTG	TATGCAATTG	ACCAGATTAA	CAAGGACCT	GAATCTCTT	CCAACATCAC	TCTGGGGTGTG	*	*	*	*	*	*	*	*
310	*	320	*	330	*	340	*	350	*	360	*	370	*	380	*	390	*	400
*	CGCATCTCG	ACACGIGCTC	TAGGGACACC	TATGCTTGG	AGGAGTCCT	AACATTGCTG	CAGGCCATTA	TAGAGAAAGA	TGCTTCGGAT	GTGAAGTGTG	*	*	*	*	*	*	*	*
410	*	420	*	430	*	440	*	450	*	460	*	470	*	480	*	490	*	500
*	CTAATGGAGA	TCCACCCATT	TTCAACAAAC	CCGACAAGAT	TCTGGGCTC	ATAGGGTGTG	CAGGAAAGTC	CGTGTCCATC	ATGGTTGCTA	ACATTTAAAG	*	*	*	*	*	*	*	*
510	*	520	*	530	*	540	*	550	*	560	*	570	*	580	*	590	*	600
*	ACTTTTAAG	ATACCTCAA	TCAAGCTATGC	ATTCACAGCC	CCGAGGCTAA	GTGATAACAC	CAGGTATGAC	TTTTCTCTC	GAATGGTTCC	GCCTGACTCC	*	*	*	*	*	*	*	*
610	*	620	*	630	*	640	*	650	*	660	*	670	*	680	*	690	*	700
*	TACCAAGCCC	AAGCCATGGT	GGACATCGTG	ACAGGACTG	GATGGAAATA	TGTTTGACAA	CTGGCTTCTG	AGGGAAACTA	TGGTGAGAGC	GGTGTGGAGG	*	*	*	*	*	*	*	*
710	*	720	*	730	*	740	*	750	*	760	*	770	*	780	*	790	*	800
*	CCTTACCCA	GATCTCGGG	GGAGATTGGT	GTGTTGGAT	TECTCAGTCA	CAGAAATCC	AAGCTGACC	AAGCTGGA	GAATTGAAA	AAATTATCAA	*	*	*	*	*	*	*	*

Fig. 54

810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ACGCCCTCTTA GAAACACCTA ATGGCTGAGC ACTGTTAATG TTGGCTAATG AGGATGACAT CAEAGGAAIA TTGGAAAGCA CAAAATACT AACCCAAAGT									
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GGGCATTTC TCTGGATTGG CTAGATAGT TGGGATCCA AAATAGCACC TGTCTATCG DAAGAGGAA TTGGAGAAG GGCTGTGALA ATTTCGCCA									
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ACCGAGGATC AATTGATGGA TTGATGCAAT ACCTTAGAAG CGGAACTCTT GGCGATAATC GAAGAAATGT GGGTTTGCA GAATTCTGGG AGGAGATT									
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TGGCTGCAAG TTAGGATCAC ATGGAAAAAG GAACAGTCAT ATAAGAAAT GCACAGGGCT GEAGCGAAATT GTCTGGGATT CAITCTTGA ACAGGAAGGA									
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAGGTCAAT TGTAAATTGAA TCTGTATIAI TCCATGECCT ACCGCCCTGCA CAATATGCAC AAAGATCTCTT GCCCTGGATA CATTGGCTT TTGTCAGGAA									
1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TGAGTACCAT TGATGGAAA GAGCTACTATG GGTGTAAAT TTTAATGGCA GTCTGTGAC ACCTGTGACT TTTAATGAAA ACGGGAGATGC									
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCCTGGACGT TATGATACTC TCCAGTATCA AAATACCCAC AAAAGCACAG ATGTCACAGT CATGGCAAC TGACCCATC AGCTTCATCT AAAAGTGAA									
1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GACATGCACT GGGCTCATAG AGAACATACT CACCCCCGGT CTGCTGAG CCTGCCGTGT AAGCCAGGGG AGAGGAAGAA AACGGTCAAAG GGGGTCCCTT									

Fig. 5B

ES 2 292 193 T3

1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GCTGGCGCA CTGTGAAACGC TGTTGAAGTTT ACAACTACCA GGTGGATGAG CTGTCCTGTG AACTTGGCC TCTGGATAG AGACCCAAA TGAACCCGAC									
1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AGGCTGCCAG CTTAICCCCCA TCATCAATT GGAGTGGCAT TCTCCCTGGG CTGTTGGCC TGTGGTGGT GCAATATTGG GAATCATGG CACCACCTT									
1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GTGATCGIGA CCTTTGTCGG CTATAATGAC ACACCTATCG TGAGGSCCTTC AGGACGGAA CTTAGTTAG TGCTCTAAC GGGGATTTTT CTCTGTATT									
1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CAATCAGTT TTAAATGATT GCAGCACAG ATTACATCAT ATGCTCTTC OGAGGGGTCT TCTTAGGACT TGGCATGTGT TICAGCTATG CAGCCCTCT									
2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GACCAAAACA AACCGTATCC ACCGAATT ATTGAGGAGGG AAGAAATCTG YCAGAGGCC CAAGTCATT AGTCAGGAT CTCAGCTGGT GATCACCTTC									
2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AGCCTCACT CCTGGAGCT TTTCCTGTCT CTCACATT TGTGGTGA TCCGCCAC ATCATCTTG ACTATGGAGA GCAGGGGACA CTAGATCCAG									
2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AGAAGGCCAG GGGAGTGTC AAGTGAGACA TTTCCTGTCT CTCACATT TGTTCACCTG GATACAGTAT CCTCTTGATG GTCACTTGTGA CTGTTTATGC									
2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CATTAAAAACG AGAGGTGTCC CAGAGACTTT CATTGAGGCC AAACCTATG GATTACCAT GTATACCAAC TGATCATTTT GTTAACTT CATCCCCATC									

Fig. 5C

ES 2 292 193 T3

2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TTT	GGTA	CAGCCAGTC	AGCAGAAAG	ATGTACATCC	AGACACAAC	ACTTACTGTC	TCACTGAGTT	TAAGTGCTC	AGTATCTGC
2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ATATGCCAA	GGTTTATATT	ATAAATTTTC	ATCCAGGAA	GAATGTTCAA	AAACGAAAGA	GGAGCTCAA	GGATGTGGTG	ACAGTGCCA	CCATGAAAG
2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CAAACTGATC	CAAAAAGGAA	ATGACAGACC	AAATGGGAG	GTGAAAGTG	AACCTGTA	GAGCTTGAA	ACCAACAGTA	AGTCATCTGT	AGAGTTCCS
2710	2720								
*	*								
ATGGTCAGA	GCGGGAGGAC	TTCC							

Fig. 5D

FIG. 6A.

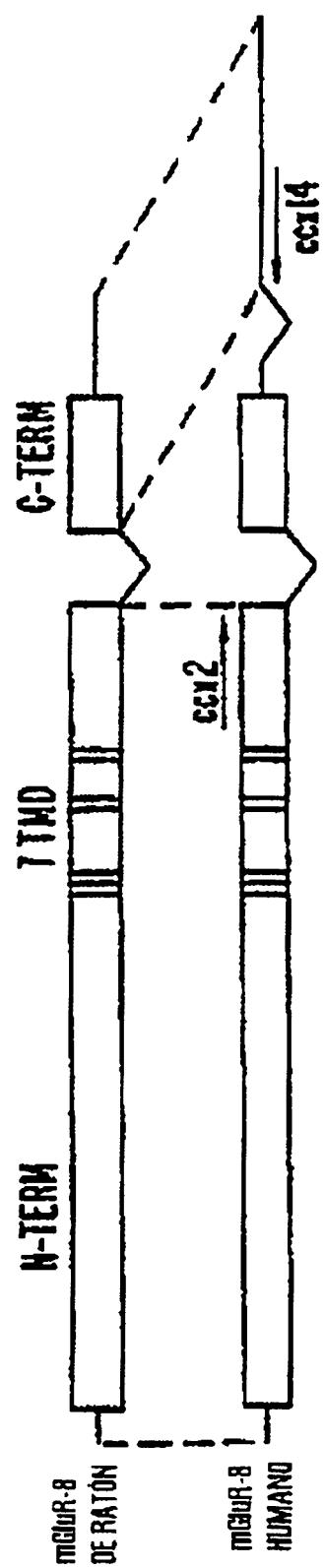
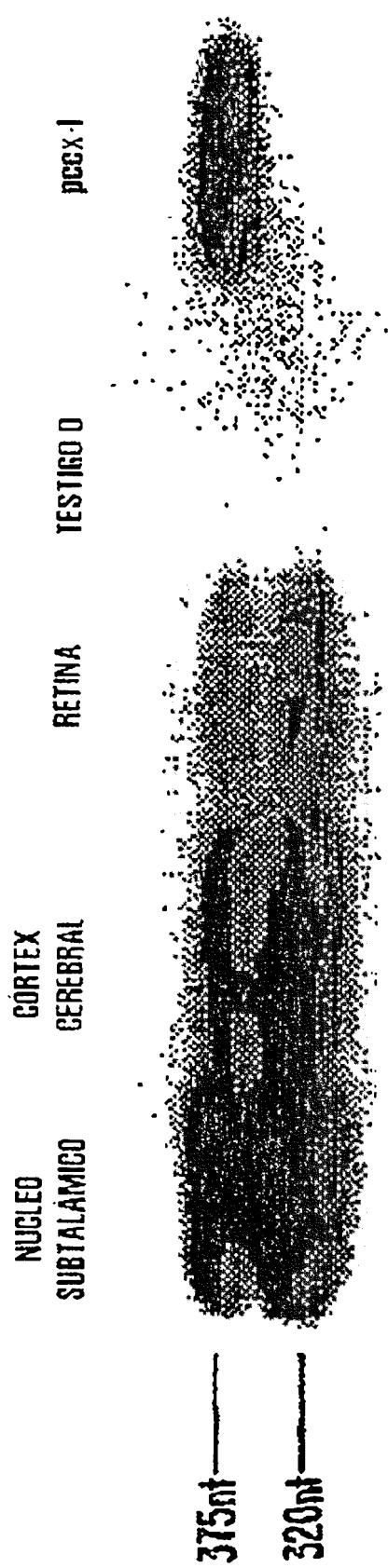


FIG. 6B.



ES 2 292 193 T3

Figura 7

NO SE TIENE QUE TOMAR EN CONSIDERACIÓN (PCT Art. 14/2) 2^a frase)

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: NPS Pharmaceuticals, Inc. 420
Chipeta Way, Suite 240 Salt
Lake City, UT 84108
U.S.A.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: NUEVO RECEPTOR METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO HUMA-
NO
- 15 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 16
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO: Lyon & Lyon
(B) CALLE: 633 West Fifth Street Suite 4700
20 (C) CIUDAD: Los Angeles
(D) ESTADO: California
(E) PAÍS: U.S.A.
25 (F) CÓDIGO: 90071-2066
- (v) SOPORTE LEGIBLE POR ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: Disquete 3,5 pulgadas, 1,44 Mb
30 (B) ORDENADOR: PC Compatible con IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: P.C. DOS 5.0 de IBM
(D) SOFTWARE: FastSEQ para Windows 2.0
- 35 (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US97/09025
(B) FECHA DE SOLICITUD: 6 de mayo de 1997
(C) CLASIFICACIÓN:
- 40 (vii) DATOS DE SOLICITUD PREVIA:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/604.298
(B) FECHA DE SOLICITUD: 21 de febrero de 1996
- 45 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
(A) NOMBRE: Warburg, Richard J.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.327
50 (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 212/044-PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
(A) TELÉFONO: (213) 489-1600
55 (B) TELEFAX: (213) 955-0440
(C) TELEX: 67-3510

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°:1:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 908 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
65 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 1:

ES 2 292 193 T3

	Met Val Cys Glu Gly Lys Arg Ser Ala Ser Cys Pro Cys Phe Phe Leu
	1 5 10 15
5	Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Trp Ile Leu Thr Met Met Gln Arg Thr His
	20 25 30
	Ser Gln Glu Tyr Ala His Ser Ile Arg Val Asp Gly Asp Ile Ile Leu
10	35 40 45
	Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Glu Arg Gly Val Pro Cys
	50 55 60
15	Gly Glu Leu Lys Lys Glu Lys Gly Ile His Arg Leu Glu Ala Met Leu
	65 70 75 80
	Tyr Ala Ile Asp Gln Ile Asn Lys Asp Pro Asp Leu Leu Ser Asn Ile
	85 90 95
20	Thr Leu Gly Val Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp Thr Tyr Ala
	100 105 110
	Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Glu Lys Asp Ala
	115 120 125
25	Ser Asp Val Lys Cys Ala Asn Gly Asp Pro Pro Ile Phe Thr Lys Pro
	130 135 140
	Asp Lys Ile Ser Gly Val Ile Gly Ala Ala Ala Ser Ser Val Ser Ile
	145 150 155 160
30	Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Lys Ile Pro Gln Ile Ser Tyr
	165 170 175
	Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu Ser Asp Asn Thr Arg Tyr Asp Phe Phe
	180 185 190
35	Ser Arg Val Val Pro Pro Asp Ser Tyr Gln Ala Gln Ala Met Val Asp
	195 200 205
	Ile Val Thr Ala Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu Ala Ser Glu
40	210 215 220
	Gly Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Val Glu Ala Phe Thr Gln Ile Ser Arg
	225 230 235 240
45	Glu Ile Gly Gly Val Cys Ile Ala Gln Ser Gln Lys Ile Pro Arg Glu
	245 250 255
	Pro Arg Pro Gly Glu Phe Glu Lys Ile Ile Lys Arg Leu Leu Glu Thr
	260 265 270
50	Pro Asn Ala Arg Ala Val Ile Met Phe Ala Asn Glu Asp Asp Ile Arg
	275 280 285
	Arg Ile Leu Glu Ala Ala Lys Lys Leu Asn Gln Ser Gly His Phe Leu
	290 295 300

55

60

65

ES 2 292 193 T3

Trp Ile Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile Ala Pro Val Tyr Gln
 305 310 315 320
 5 Gln Glu Glu Ile Ala Glu Gly Ala Val Thr Ile Leu Pro Lys Arg Ala
 325 330 335
 Ser Ile Asp Gly Phe Asp Arg Tyr Phe Arg Ser Arg Thr Leu Ala Asn
 10 340 345 350
 Asn Arg Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Glu Asn Phe Gly
 355 360 365
 15 Cys Lys Leu Gly Ser His Gly Lys Arg Asn Ser His Ile Lys Lys Cys
 370 375 380
 Thr Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Asp Ser Ser Tyr Glu Gln Glu Gly
 385 390 395 400
 20 Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr Ser Met Ala Tyr Ala Leu
 405 410 415
 His Asn Met His Lys Asp Leu Cys Pro Gly Tyr Ile Gly Leu Cys Pro
 25 420 425 430
 Arg Met Ser Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Leu Gly Tyr Ile Arg Ala
 435 440 445
 30 Val Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro Val Thr Phe Asn Glu Asn
 450 455 460
 Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Ile Thr Asn
 35 465 470 475 480
 Lys Ser Thr Glu Tyr Lys Val Ile Gly His Trp Thr Asn Gln Leu His
 485 490 495
 Leu Lys Val Glu Asp Met Gln Trp Ala His Arg Glu His Thr His Pro
 40 500 505 510
 Ala Ser Val Cys Ser Leu Pro Cys Lys Pro Gly Glu Arg Lys Lys Thr
 515 520 525
 Val Lys Gly Val Pro Cys Cys Trp His Cys Glu Arg Cys Glu Gly Tyr
 530 535 540
 45 Asn Tyr Gln Val Asp Glu Leu Ser Cys Glu Leu Cys Pro Leu Asp Gln
 545 550 555 560
 Arg Pro Asn Met Asn Arg Thr Gly Cys Gln Leu Ile Pro Ile Ile Lys
 565 570 575
 50 Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val Val Pro Val Phe Val Ala Ile
 580 585 590
 Leu Gly Ile Ile Ala Thr Thr Phe Val Ile Val Thr Phe Val Arg Tyr
 55 595 600 605
 Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val
 610 615 620
 60 Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ser Ile Thr Phe Leu Met Ile
 625 630 635 640
 Ala Ala Pro Asp Thr Ile Ile Cys Ser Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly
 645 650 655
 65 Leu Gly Met Cys Phe Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg
 660 665 670

ES 2 292 193 T3

Ile His Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Lys Ser Val Thr Ala Pro Lys
 675 680 685
 5 Phe Ile Ser Pro Ala Ser Gln Leu Val Ile Thr Phe Ser Leu Ile Ser
 690 695 700
 Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Val Trp Phe Val Val Asp Pro Pro His
 705 710 715 720
 10 Ile Ile Ile Asp Tyr Gly Glu Gln Arg Thr Leu Asp Pro Glu Lys Ala
 725 730 735
 Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Ser Asp Leu Ser Leu Ile Cys Ser
 740 745 750
 15 Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile
 755 760 765
 Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Thr Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly
 20 770 775 780
 Phe Thr Met Tyr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile
 785 790 795 800
 25 Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu Lys Met Tyr Ile Gln Thr Thr
 805 810 815
 Thr Leu Thr Val Ser Met Ser Leu Ser Ala Ser Val Ser Leu Gly Met
 820 825 830
 30 Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Gln Asn
 835 840 845
 Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr
 850 855 860
 35 Met Gln Ser Lys Leu Ile Gln Lys Gly Asn Asp Arg Pro Asn Gly Glu
 865 870 875 880
 Val Lys Ser Glu Leu Cys Glu Ser Leu Glu Thr Asn Ser Lys Ser Ser
 40 885 890 895
 40 Val Glu Phe Pro Met Val Lys Ser Gly Ser Thr Ser
 900 905

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 3833 pares de bases
- 50 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 2:

	GCGGCCGCCG GTGGGAGTAT TTGTTATTCA CATGGAAGAG ACTTGGCGCC TGCTAGGCCA	60
	GCTCAGCCCC CTCAGCCCA AGATCAGCCA CAAGTGCGGC CGCTGTGCTC GCCTCACCGCG	120
	GC GGCGGCCGG CGGC GGCGGC GGCGGTGACA TGGAGCTGCG GGCCCCCGGC GGGCTTCCTC	180
60	ACCGCGCCCT CTGCGGGGAG CAGGAAATAA TTCTGCTACA AGGCTGATTT CAAGGACATG	240
	AATTGTTGAC CTCATCCCAA CATCAGAACCC TCAGATGTT TAATTTTGCA ACCATTCCAG	300
	GCAAGTTGAT CTTATAAGGA AATAAAATTG AACCTTAGGG GTCTGATGGA AATTCACTGT	360
	GACATTCAAA TCAAGAAAAC TTGCTAATGC CCACAGAGCC TTTTCCCCCAT GGGCCCTGAT	420
	GGTAGCCTCC AGAAGGTGCA GCCTCAGGTG GTGCCCTTC TTCTGTGGCA AGAATAAAACT	480
	TTGGGTCTTG GATTGCAATA CCACCTGTGG AGAAAATGGT ATGCGAGGGGA AAGCGATCAG	540
65	CCTCTTGCCC TTGTTCTTC CTCTTGACCG CCAAGTTCTA CTGGATCCTC ACAATGATGC	600

ES 2 292 193 T3

	AAAGAACTCA CAGCCAGGAG TATGCCATT CCATACGGGT GGATGGGGAC ATTATTTGG	660
	GGGGTCTCTT CCTGTCCAC GCAAAGGGAG AGAGAGGGGT GCCTTGTGGG GAGCTGAAGA	720
	AGGAAAAGGG GATTACAGA CTGGAGGCCA TGCTTATGC AATTGACCAG ATTAACAAGG	780
5	ACCCGTATCT CCTTCCAAC ATCACTCTGG GTGTCCGCAT CCTCGACACG TGCTCTAGGG	840
	ACACCTATGC TTGGAGCAG TCTCTAACAT TCGTGCAGGC ATTAATAGAG AAAGATGCTT	900
	CGGATGTGAA GTGTGCTAAT GGAGATCCAC CCATTTCAC CAAGCCGAC AAGATTCCTG	960
	GCGTCATAGG TGCTGCAGCA AGCTCCGTGT CCATCATGGT TGCTAACATT TTAAGACTTT	1020
10	TTAAGATACC TCAAATCAGC TATGCATCCA CAGCCCCAGA GCTAAGTGT AACACCAGGT	1080
	ATGACTTTT CTCTCGAGTG GTTCCGCCTG ACTCCTACCA AGCCCAAGCC ATGGTGGACA	1140
	TCGTGACAGC ACTGGGATGG AATTATGTT CGACACTGGC TTCTGAGGGG AACTATGGTG	1200
15	AGAGCGGTGT GGAGGCCTTC ACCCAGATCT CGAGGGAGAT TGGTGGTGT TGCAATTGCTC	1260
	AGTCACAGAA ATCCCACGT GAACCAAGAC CTGGAGAATT TGAAAAAATT ATCAAACGCC	1320
	TGCTAGAAC ACCTAATGTC CGAGCAGTGA TTATGTTGC CAATGAGGAT GACATCAGGA	1380
	GGATATTGGA AGCAGAAAAA AATCAAACC AAAGTGGGCA TTTCTCTGG ATTGGCTCAG	1440
20	ATAGTTGGG ATCCAAAATA GCACCTGCT ATCAGCAAGA GGAGATTGCA GAAGGGGCTG	1500
	TGACAATTTC GCCAAACGA GCATCAATTG ATGGATTG TGCAACTTT AGAAGCCGAA	1560
	CTCTTGCCAA TAATCGAAGA AATGTGTGGT TTGAGAATT CTGGGAGGAG AATTTGGCT	1620
	GCAAGTTAGG ATCACATGGG AAAAGGAACA GTCATATAAA GAAATGCACA GGGCTGGAGC	1680
25	GAATTGCTCG GGATTCACTT TATGAACAGG AAGGAAAGGT CCAATTGTA ATTGATGCTG	1740
	TATATTCCAT GGCTTACGCC CTGACAAATA TGACAAAGA TCTCTGGCCT GGATACATTG	1800
	GCCTTGTCC AGGAATGAGT ACCATTGATG GGAAGAGCT ACTGGTTAT ATTGGGGCTG	1860
30	TAAATTAA TGCGAGTGT GGCACCTCTG TCACTTTAA TGAAAACGGA GATGCTCCTG	1920
	GACGTTATGA TATCTTCCAG TATCAAATAA CCAACAAAAG CACAGAGTAC AAAGTCATCG	1980
	GCCACTGGAC CAATCAGCTT CATCTAAAGG TGGAGAACAT GCAGTGGGCT CATAAGAGAAC	2040
	ATACTCACCC GGCCTGTGTC TGCAAGCTGC CGTGAAGCC AGGGGAGAGG AAGAAAACGG	2100
	TGAAAGGGGT CCCCTGTGTC TGGCACTGTG AACCTGTGTA AGGTACAC TACCAAGGTGG	2160
35	ATGAGCTGTC CTGTGAACCT TGCCCTCTGG ATCAGAGACC CAACATGAAC CGCACAGGCT	2220
	GCCAGCTTAT CCCCCATCATC AAATTGGAGT GGCATTCTCC CTGGGCTGTG GTGCCCTGTG	2280
	TTGTTGCAAT ATTGGGAAATC ATGCCACCA CCTTGTGAT CGTGACCTTT GTCCGCTATA	2340
	ATGACACACC TATCGTGGG GCTTCAGGAC GCGAACCTAG TTACGTGCTC CTAACGGGGA	2400
	TTTTCTCTG TTATCAATC ACGTTTTAA TGATTGTCAG ACCAGATACA ATCATATGCT	2460
	CCTTCCGACG GGTCTTCTA GGACTTGGCA TGTGTTTCAG CTATGCAGCC CTTCTGACCA	2520
40	AAACAAACCG TATCCACCGA ATATTTGAGC AGGGGAAGAA ATCTGTACAA GCGCCCAAGT	2580
	TCATTAGTCC AGCATCTCAG CTGGTGTATCA CCTTCAGCCT CATCTCGCTC CAGCTCCTG	2640
	GAGTGTGGT CTGTTTGTG GTGGATCCCC CCCACATCAT CATTGACTAT GGAGAGCAGC	2700
	GGACACTAGA TCCAGAGAAG GCCAGGGAG TGCTCAAGTG TGACATTCT GATCTCTCAC	2760
	TCATTGTTC ACTGGATAC AGTATCCTCT TGATGGTCAC TTGTACTGTT TATGCCATTA	2820
	AAACGAGAGG TGTCCAGAG ACTTTCAATG AAGCCAACC TATTGGATT ACCATGTATA	2880
45	CCACCTGCAT CATTGGTTA GCTTTCATCC CCATCTTTTG TGGTACAGCC CAGTCAGCAG	2940
	AAAAGATGTA CATCCAGACA ACAACACTTA CTGCTCCAT CATTGACTAT GGAGAGCAGC	3000
	CTCTGGGCAT GCTCTATATG CCCAAGGTTT ATATTATAAT TTTTCATCCA GAACAGAATG	3060
	TTCAAAAACG CAAGAGGAGC TTCAAGGCTG TGGTACAGC TGCCACCATG CAAACGAAAC	3120
	TGATCCAAA AGGAAATGAC AGACCAAATG GCGAGGTGAA AAGTGAAC TGTGAGAGTC	3180
	TTGAAACCAA CAGTAAGTCA TCTGTAGAGT TTCCGATGGT CAAGAGCGGG AGCACTTCCT	3240
	AATAGATCTT CCTCTACCA GACAACATAT ATCACTTACA GCAATCATTC AATCTGAAAC	3300
	AGGGAAATGG CACAATCTGA AGAGACGTGG TATATGATCT TAAATGATGA ACATGAGACC	3360
	GCAAAATTC ACTCCTGGAG ATCTCCGTAG ACTACAATCA ATCAAATCAA TAGTCAGTCT	3420
	TGTAAGGAAC AAAATTAGC CATGAGCCAA AAGTATCAAT AACCGGGGAG TGAAGAAAACC	3480
	CGTTTATAC AAAAAACCA ATGAGTGTCA AGCTAAAGTA TTGCTTATTC ATGAGCAGTT	3540
55	AAAACAAATC ACAAAAGGA AACTAATGTT AGCTCGTGA AAAATGCTG TTGAAATAAA	3600
	TAATGTCGA TGTATTCTC GTATTTCCT GTGATTGTGA GAACTCCGT TCCTGTCCCA	3660
	CATTGTTAA CTGGTATAAG ACAATGAGTC TGTTTCTGT AATGGCTGAC CAGATTGAAG	3720
	CCCTGGGTTG TGCTAAAAAT AAATGCAATG ATTGATGCAT GCAATTTCAT ATACAAATAA	3780
	TTTATTCTA ATAATAAAGG AATGTTTGC AAATGTTAAA AAAAAAAAAAAA AAA	3833

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 166 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 3:

CCCCCACATC TACATTGACT ATGGAGAGCA GCGGACACTA GATCCAGAGA AGGCCAGGGG	60
AGTGCTCAAG TGTGACATT CTGATCTCTC ACTCATTGTT TCACTTGGAT ACAGTATCCT	120
CTTGATGGTC ACTTCTACTG TTTATGCCAT TAAAACGAGA GGTGTC	166

65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 4:

ES 2 292 193 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 121 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 5 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 10 (D) OTRA INFORMACIÓN: La letra "N" significa A, C, T o G

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 4:

15	CTACATTGAC TATGGAGAGC AGCGNACACT AGATCCAGAG AAGGCCAGGG GAGTGCTCAA GTGTGACATT TCTGATCTCT CACTCATTG TTCACATTGGA TACAGTATCC TCTTGATGGT C	60
		120
		121

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2724 pares de bases
- 25 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 5:

35	ATGGTATGCG AGGGAAAGCG ATCAGCCTCT TGCCCTTGT TCTTCCTCTT GACCGCCAAG TTCTACTGGA TCCTCACAAAT GATGCAAAGA ACTCACAGCC AGGAGTATGC CCATTCCATA CGGGTGGATG GGGACATTAT TTTGGGGGGT CTCTTCCCTG TCCACGCAA GGGAGAGAGA GGGGTGCCTT GTGGGGAGCT GAAGAAGGAA AAGGGGATTC ACAGACTGGA GGCCATGCTT TATGCAATTG ACCAGATTAA CAAGGACCT GATCTCCTT CCAACATCAC TCTGGGTGTC CGCATCCCTCG ACACGTGCTC TAGGGACACC TATGCTTGG AGCAGTCTCT AACATTCGTG CAGGCATTAA TAGAGAAAGA TGCTTCGGAT GTGAAGTGTG CTAATGGAGA TCCACCCATT TTCACCAAGC CGCACAAGAT TTCTGGCGTC ATAGGTGCTG CAGCAAGCTC CGTGTCCATC ATGGTTGCTA ACATTTAACG ACTTTTAAG ATACCTCAAAT TCAGCTATGC ATCCACAGCC 30 CCAGAGCTAA GTGATAACAC CAGGTATGAC TTTTCTCTC GAGTGGTCC GCCTGACTCC TACCAAGCCC AAGCCATGGT GGACATCGTG ACAGCACTGG GATGGAATT TGTTTCGACA CTGCTTCTG AGGGGAACTA TGTTGAGAGC GGTGTGGAGG CCTTCACCCA GATCTCGAGG GAGATTGGTG GTGTTTGAT TGCTCAGTCA CAGAAAATCC CACGTGAACCG AAGACCTGGA GAATTGAAA AAATTATCAAAC CGCCTGCTA GAAACACCTA ATGCTCGAGC AGTGATTATG 40 TTTGCCAATG AGGATGACAT CAGGAGGATA TTGGAAAGCAG CAAAAAAACT AAACCAAAGT GGGCATTTTC TCTGGATTGG CTCAGATAGT TGGGGATCCA AAATAGCACC TGTCTATCAG CAAGAGGAGA TTGAGAAGG GGCTGTGACA ATTTTCCCA AACGAGCATC ATTGATGGA TTTGATCGAT ACTTTAGAGC CGCAACTCTT GCCAATAATC GAAGAAATGT GTGGTTTGC GAATTCTGGG AGGAGAATTG TGGCTGCAAG TTAGGATCAC ATGGGAAAG GAACAGTCAT ATAAAGAAAT GCACAGGGCT GGAGCGAATT GCTCGGGATT CATCTTATGA ACAGGAAGGA 50 AAGGTCCAAT TTGTAATTGA TGCTGTATAT TCCATGGCTT ACGCCTGCA CAATATGCAC AAAGATCTCT GCCCTGGATA CATTGGCTT TGTCCACGAA TGAGTACCAT TGATGGAAA GAGCTACTTG GTTATATTG GGCTGTAAAT TTTAATGGCA GTGCTGGCAC TCCTGTCACT TTTAATGAAA ACGGAGATGC TCTGGACGT TATGATATCT TCCAGTATCA AATAACCAAC AAAAGCACAG AGTACAAAGT CATCGGCCAC TGGACCAATC AGCTTCATCT AAAAGTGGAA GACATGCGT GGGCTCATAG AGAACATACT CACCCGGCGT CTGTCGAG CCTGCGTGT 55 AAGCCAGGGG AGAGGAAGAA AACGGTAAA GGGGTCCCTT GCTGCTGGCA CTGTGAACGC TGTGAAGGTT ACAACTACCA GGTGGATGAG CTGTCCTGTG AACTTTGCC TCTGGATCAG AGACCCAACA TGAACCGCAC AGGCTGCCAC CTTATCCCCA TCATCAAATT GGAGTGGCAT TCTCCCTGGG CTGTTGGGCC TGTGTTGGT GCAATATTGG GAATCATCGC CACCACCTT GTGATCGTGA CCTTTGTCCG CTATAATGAC ACACCTATCG TGAGGGCTTC AGGACGCGAA 60 CTTAGTTACG TGCTCCTAAC GGGGATTTTT CTCTGTTATT CAATCACGTT TTTAATGATT GCAGCACCAG ATACAATCAT ATGTCCTTC CGACGGGTCT TCCTAGGACT TGGCATGTGT TTCAGCTATG CAGCCCTTCT GACCAAAACA AACCGTATCC ACCGAATATT TGAGCAGGG AAGAAATCTG TCACAGCGCC CAAGTTCACT AGTCCAGCAT CTCAGCTGGT GATCACCTTC AGCCTCATCT CCGTCCAGCT CCTTGGAGTG TTGTTCTGGT TTGTTGAGA TCCCCCCCCAC ATCATCATTG ACTATGGAGA GCAGCGGACA CTAGATCCAG AGAAGGCCAG GGGAGTGTCT AAGTGTGACA TTTCTGATCT CTCACTCATT TGTTCACTTG GATACAGTAT CCTCTTGATG	60
		120
		180
		240
		300
		360
		420
		480
		540
		600
		660
		720
		780
		840
		900
		960
		1020
		1080
		1140
		1200
		1260
		1320
		1380
		1440
		1500
		1560
		1620
		1680
		1740
		1800
		1860
		1920
		1980
		2040
		2100
		2160
		2220
		2280

ES 2 292 193 T3

5	GTCACTTGTATGC	CTGTTTATGC	CATTAAAACG	AGAGGGTGTCC	CAGAGACTTT	CAATGAAGCC	2340
	AAACCTATTG	GATTACCAT	GTATACCACC	TGCATCATT	GGTTAGCTTT	CATCCCCATC	2400
	TTTTTGTTA	CAGCCCAGTC	AGCAGAAAAG	ATGTACATCC	AGACAACAAAC	ACTTACTGTC	2460
	TCCATGAGTT	TAAGTGCTTC	AGTATCTCTG	GGCATGCTCT	ATATGCCAA	GGTTTATATT	2520
10	ATAATTTTC	ATCCAGAACAA	GAATGTCAA	AAACGCAAGA	GGAGCTCAA	GGCTGTGGTG	2580
	ACAGCTGCCA	CCATGCAAAG	CAAACGATC	CAAAAAGGAA	ATGACAGACC	AAATGGCGAG	2640
	GTGAAAAGTG	AACTCTGTGA	GAGTCTTGAA	ACCAACAGTA	AGTCATCTGT	AGAGTTCCG	2700
	ATGGTCAAGA	GCAGGGAGCAC	TTCC				2724

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: sencilla
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 25 (D) OTRA INFORMACIÓN: La letra "N" significa inosina.
La letra "R" significa A o G.
La letra "Y" significa C o T.
La letra "S" significa C o G.
La letra "M" significa C o A.

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 6:

30 CCTGCTCGAG ACNARYCGGG ARCTYTSCTA YMT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 31 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
40 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 45 (D) OTRA INFORMACIÓN: La letra "N" significa inosina.
La letra "W" significa A o T.
La letra "Y" significa C o T.
La letra "S" significa C o G.
La letra "R" significa A o G.

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 7:

50 CGGAATTCCG TTNCGGGWYT TGAASGCRWA S

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: sencilla
60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

ES 2 292 193 T3

- 5 (D) OTRA INFORMACIÓN: La letra “R” significa A o G.
La letra “N” en posición 24 significa Inosina.
La letra “M” significa A o C.
La letra “N” en posición 27 significa A, C, T o G.
La letra “Y” significa C o T.

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 8

10 CCTGCTCGAG TCAAGGCTAC GRRNMNGAR YT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 9:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: sencilla
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 25 (D) OTRA INFORMACIÓN: La letra “N” en posición 26 significa Inosina.
La letra “K” significa T o G.
La letra “N” en posición 29 significa A, C, T o G.

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 9:

30 CGGAATTCCA TTTGGCTTCG TTGAANKTNK CNGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 10:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: sencilla
40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 10:

45 CTACATTGAC TATGGAGAGC AGCG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 11:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: sencilla
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 11:

60 GACCATCAAG AGGATACTGT ATCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 12:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 292 193 T3

- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 12:

GATGTACATC CAGACAACAA CAC

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 13:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
15 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 13:

CAGATTGTGC CATTCCCTG TTTC

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
30 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 14:

GGAAATGACA GACCAAATGG CGAG

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 31 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
45 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 15:

CATGGGCCCT GATGGAAGCT TCCAGAAGGT G

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
60 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 16:

GATGAATCCC GAGCAATTG CTCC