



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 453**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01951650 .9**

96 Fecha de presentación : **05.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1319022**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54 Título: **Procedimiento de amplia aplicación para identificar moduladores de receptores acoplados a la proteína G.**

30 Prioridad: **08.07.2000 DE 100 33 353**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.07.2010

73 Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Bruningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es: **Kostenis, Evi**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de amplia aplicación para identificar moduladores de receptores acoplados a la proteína G.

5 La invención se refiere a un procedimiento de amplia aplicación para identificar compuestos químicos que modulan la proteína G de receptores acoplados, por medio de nuevas proteínas híbridas G con una especificidad de receptores muy amplia, así como a compuestos químicos que se pueden identificar por medio de tal procedimiento.

10 Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) juegan un papel importante en una pluralidad de procesos fisiológicos. Representan una de las familias de proteínas más importantes conocidas hasta ahora y se supone que en el genoma humano aproximadamente 1000 genes codifican esta clase de receptores. Los GPCR tienen una estructura característica: Se trata de cadenas peptídicas que se enrollan siete veces en forma de hélices α a través de la capa doble de fosfolípido de la membrana celular, disponiéndose en forma circular. Se estima que aproximadamente el 60% de los medicamentos con venta bajo receta, actualmente disponibles, se unen con los GPCR. Esto destaca el papel importante de esta clase de receptores para la industria investigadora de medicamentos.

20 Todos los receptores acoplados a la proteína G funcionan según un modelo básico común: La unión de un ligando extracelular lleva a una modificación de la conformación de la proteína del receptor de modo que puede tomar contacto con una proteína G. Las proteínas G ubicadas del lado citoplasmático de la membrana plasmática son los mediadores de la señal extracelular en el interior de la célula y allí pueden provocar diversas reacciones.

25 Los GPCR representan las proteínas blanco terapéuticas hasta ahora más significativas. Estimativamente, el 40% de los medicamentos prescritos por el médico actúan como agonistas o antagonistas de los GPCR. En virtud del tamaño y la importancia de la familia de proteínas y en vista al hecho de que para muchos GPCR aún no se conocen pares de unión químicos (GPCR huérfanos), se ha de partir del hecho de que esta clase de receptores será en un futuro uno de los reservorios más importantes para proteínas blanco apropiadas en la búsqueda de nuevos medicamentos.

30 Los GPCR son proteínas de membrana integrales. Transmiten una señal mediada por una sustancia de señal mayormente hidrofílica que se une en el lado exterior de la célula a través de una familia de proteínas de unión a guanina-nucleótido, llamadas proteínas G, hacia el interior de la célula. En este caso, se desencadenan, en función de la especificidad del receptor y de las proteínas G activadas de esta manera, diversas vías de transducción de señales. Según el tipo de receptor, se producen diversos efectos que tienen como consecuencia la formación de "second messengers". De esta manera, se puede elevar el nivel de cAMP intracelular a través de la activación de una adenilato-ciclase en posición de membrana o bien se puede reducir en caso de una inhibición. La estimulación de una fosfodiesterasa específica de cGMP puede llevar a la reducción del nivel de cGMP. Por otra parte, la proteína G activada a través de la unión con un canal iónico puede llevar, por ejemplo, al aumento de iones Ca^{2+} o K^{+} . Además, a través de una proteína G activada puede producir la activación de una fosfolipasa y, así, la formación de inositol-1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol. A su vez, llevan al aumento de Ca^{2+} o a la activación de una proteína quinasa C, con otros efectos en ambos casos. Los second messengers son moléculas mensajeras intracelulares como, por ejemplo, cAMP, cGMP, Ca^{2+} u otras, que desencadenan reacciones en la célula a través de la activación o desactivación de proteínas intracelulares.

40 Las proteínas G heterotrímeras se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática. Están compuestas por las tres subunidades α , β y γ . Un receptor activado entra en contacto con el heterotrímero de la proteína G que, consiguientemente, lo disocia en una subunidad alfa y un complejo beta-gamma. Tanto la subunidad alfa activada como el complejo beta-gamma pueden influir sobre las proteínas efectoras intracelulares. La familia de la subunidad α de la proteína G se clasifica actualmente en cuatro clases diferentes (clase $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$). Los GPCR se clasifican según la proteína G incorporada en la transducción de señales.

50 Es decir, los GPCR de la clase G_s median, a través de la activación de $G_{\alpha s}$, la estimulación de la adenilciclase y elevan la concentración intracelular de AMPc.

55 Los GPCR de la clase G_i median a través de la activación de $G_{\alpha i}$ una inhibición de la clase de adenilato y reducen los GPCR de cAMP intracelular de la clase G_q que median a través de una activación de $G_{\alpha q}$ una estimulación de distintas isoformas de PLC β y llevan a una hidrólisis de fosfatidil-inositol-4.5-bisfosfato en posición de membrana en diacilglicerol y trifosfato de inositol (IP3). IP3 libera Ca^{2+} a partir de los depósitos intracelulares.

60 La mayoría de los GPCRs puede entrar en contacto solamente con una subunidad alfa de la proteína G, es decir, poseen selectividad para una vía determinada de transducción de señales. A los fines de desarrollar un procedimiento con cuya ayuda se han de identificar compuestos químicos que modulan las vías de transducción de señales dependientes de GPCR, esta estrecha especificidad es muy embarazosa. Más allá de ello, tales vías de transducción de señales proporcionan sólo una señal apropiada que se puede aprovechar en un tipo de ensayo con alto rendimiento de muestras (= High Throughput Screening = HTS)), en las que, por ejemplo, la activación de la proteína G lleva al aumento del nivel intracelular de Ca^{2+} .

65 Es posible construir estas proteínas G con especificidad modificada para los receptores y diferente fijación a una vía de transducción de señales mediante la unión de componentes de distintas proteínas G a proteínas G híbridas, a través de métodos de biología molecular y bioquímica.

Las proteínas G híbridas son construcciones de fusión, que unen en el interior de una proteína secuencias de diferentes subunidades $G\alpha$. De esta forma, por ejemplo, se puede fabricar un híbrido $G\alpha q/i$ a través de la fusión de la región de reconocimiento del receptor de $G\alpha i$ con la región de activación del efector de $G\alpha q$, capaz de captar señales de receptores acoplados a G_i , pero que conecte la vía de transducción de la señal de $G\alpha q$ -PLC β . Conklin *et al.*, Nature 363, 274276 (1993) describieron por primera vez un híbrido de este tipo, en el que los 5-aminoácidos C-terminales de $G\alpha q$ habían sido sustituidos por la correspondiente secuencia $G\alpha i$ ($G\alpha iq5$).

Este “reacoplamiento” de receptores tiene la ventaja de que se puede acceder de manera más sencilla al parámetro final del ensayo (elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} , comparada con la inhibición de la adenilato-ciclasa) mediante procedimientos técnicos de medición, y se puede utilizar en la Exploración de Alto Rendimiento.

Sin embargo, es desventajoso en estos constructos de fusión $G\alpha q/G\alpha i$ que algunos GPCR como, p.j., el receptor SSTR1 no puedan activar q_i5 (Conklin *et al.*, Mol. Pharmacol. 50, 885-890 (1996)).

Asimismo, se describieron constructos de fusión entre $G\alpha q$ y $G\alpha s$. También ellos poseen la desventaja de que no todos los receptores acoplados a G_s como, por ejemplo, el receptor adrenérgico β_2 o el receptor de dopamina D1 se pueden unir con la vía de transducción de señales de PLC β .

Además de las modificaciones C-terminales para la modificación de la unión de receptores a determinadas vías de transducción de señales, se describió una modificación N-terminal de $G\alpha q$ que lleva a una promiscuidad de receptores. Por promiscuidad de receptores, se ha de entender en este caso la capacidad de una proteína G de poder captar y transmitir señales de distintos receptores. Se trata de una proteína $G\alpha q$ en la que se suprimió la región que comprende 6aa N-terminal altamente conservada; (Kostenis *et al.*, J. Biol. Chem. 272, 19107-19110 (1997)). Esta supresión permite a Gq resultante (también denominado -6q) recibir no sólo señales de Gq , sino también de receptores acoplados con G_s o G_i/o y de transmitirlos a PLC β .

Esta subunidad $G\alpha$ comprende ahora también receptores como el receptor de SSTR1-somatostatina, el receptor de dopamina D1 y el receptor adrenérgico β_2 . Sin embargo, el receptor $edg5$ también puede no estar comprendido por esta proteína G. Más allá de ello, la intensidad de las señales de esta proteína G es tan débil que en la práctica no se puede usar (Kostenis *et al.*, J. Biol. Chem. 272, 19107-19110 (1997)).

Además, se conoce con $G\alpha 16$ una subunidad $G\alpha$ que une los GPCR de distintas clases funcionales con la vía de transducción de señales de PLC β - Ca^{2+} . Prácticamente se trata de una proteína G no selectiva por naturaleza. Pero también esta subunidad no es empleable de modo universal, porque los receptores como el receptor $edg5$ o el receptor de SSTR1-somatostatina no se acoplan o sólo se acoplan débilmente con $G\alpha 16$. Por este motivo, sería de gran utilidad si una proteína G estuviese a disposición, la cual se pudiese activar por medio de otras clases funcionales de los GPCR y, más allá de ello, pudiese dar en la célula una señal suficientemente potente que pudiera utilizarse en un ensayo en especial un ensayo de High Throughput para la identificación de compuestos que modulan los GPCR y/o las vías de transducción de señales dependientes, como, por ejemplo, el aumento o la reducción de la concentración intracelular de Ca^{2+} .

Los documentos WO 97/48820 y WO 99/05177 describen ahora procedimientos para la identificación de un modulador de un GPCR, en los que se emplean proteínas α mixtas, por ejemplo, de acuerdo con el documento WO 99/05177, una proteína α mutada de la clase Gq .

El objeto de la presente invención consiste, en consecuencia, en poner a disposición otras proteínas G híbridas para el procedimiento de screening para identificar compuestos químicos que se caracterizan porque presentan una especificidad muy amplia en cuanto a los GPCR reconocibles y estas proteínas G se acoplan a una vía de señales que lleva a un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Adicionalmente, se expresan tan alto que se mejora la intensidad de las señales.

La invención se refiere a un procedimiento para la identificación de un compuesto químico que modifica la acción de al menos una de las vías de transducción de señales de un organismo biológico dependiente de un receptor acoplado a la proteína G (GPCR),

en donde dicho procedimiento contiene las siguientes etapas de procedimiento:

- a) Preparación de al menos una célula que contiene al menos una vía de transducción de señales dependiente de un GPCR, en donde se prepara una o más de una proteína G;
- b) Preparación de al menos un compuesto químico por ensayar;
- c) Puesta en contacto de una célula de acuerdo con a) con un compuesto químico por ensayar de acuerdo con b);
- d) Determinación del efecto cuantitativo o cualitativo de un compuesto químico por ensayar de b) sobre la vía de transducción de señales de una célula de a) por medio de una señal medible dependiente de la vía de transducción de señales,

caracterizado porque al menos una proteína G está seleccionada de -6qi4myr o -6qs5myr.

La modificación de la acción de al menos una de las vías de transducción de señales dependiente de un receptor acoplado a la proteína G (GPCR) de un organismo biológico puede resultar inhibidora o estimulante. Una acción inhibidora de un compuesto químico está presente cuando la señal medible dependiente de la vía de transducción de señales se produce más débilmente en presencia del compuesto químico que cuando se deja de lado. Los compuestos que producen tal efecto también se denominan antagonistas. Por otra parte, hay una acción estimulante de un compuesto químico cuando la señal medible dependiente de la vía de transducción de señales es más potente que cuando se deja de lado el compuesto químico. Estos compuestos también son denominados agonistas.

El procedimiento se basa en una forma de ejecución preferida de una célula, en donde al menos se producen dos proteínas G. Estas proteínas G pueden depender de uno o de diferentes GPCR. Básicamente, se utilizan para la realización del procedimiento todas las proteínas G apropiadas sin tener en cuenta su especificidad receptora, su secuencia, su estructura, el origen respecto de célula, tejido u órgano o respecto de la especie para la que son específicas. Con preferencia, se prepara en la célula al menos una proteína G proveniente de -6qi4myr, -6qs5myr, -6qi4, -6qs5. En el caso de las proteínas G -6qi4myr, -6qs5myr, -6qi4, -6qs5, se trata de proteínas G híbridas que se formaron por partes de diferentes proteínas G de ratón y que, en algunos casos, contienen modificaciones adicionales. Las proteínas G pueden ser producidas por la célula de forma individual o en combinación. En especial, por la célula se puede producir, independientemente de las proteínas G híbridas recién mencionadas, también Galpha16. Cada una de las proteínas G puede estar presente de forma individual o en combinación con una o varias otras proteínas G en una célula. La preparación de Galpha16 en una célula siempre se debe llevar a cabo de modo tal que se nunca se produzca sola sino en combinación con otra de las proteínas G antes mencionadas.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas G se publican para Gαq en Seq ID Nro. 2, para -6qi4myr en Seq ID Nro. 4, para -6qi4 en Seq ID Nro. 6 y Seq ID Nro. 8 y para Galpha16 en Seq ID Nro. 10.

La puesta a disposición de un compuesto químico se realiza usualmente en forma disuelta. Con preferencia, para la solución del compuesto químico se usa agua. La solución puede contener, además del disolvente, sustancias tampón, sales o excipientes como solubilizantes, detergentes, conservantes u otros.

La puesta en disposición de una célula comprende su producción, cría y posterior procesamiento. La puesta a disposición se realiza, por ejemplo, por preparación de un material celular apropiado de órganos o tejidos o por reproducción de líneas celulares o microorganismos apropiados. Para la cría, se pueden usar diferentes medios nutrientes apropiados. Las células se mantienen a la temperatura óptima para el organismo. Eventualmente, se añade al medio de crecimiento utilizado en cada caso conservantes, antibióticos, indicadores del pH, componentes de suero sanguíneo, suero sanguíneo, excipientes u otros. Los procedimientos para la preparación, cría y posterior procesamiento se describen en obras estándar. (Ejemplo: Basic Cell Culture; Ed. J.M. Davis; IRL Press; 1994).

En el procedimiento previamente descrito, se pone a disposición, en formas de realización preferidas, la célula de una especie de vertebrado, una especie de insecto, un *C. elegans* o una levadura. En formas de realización de especial preferencia, se pone a disposición la célula de una célula de HeLa, 293, COS, CHO o *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la determinación del efecto cuantitativo o cualitativo de un compuesto químico por ensayar sobre la vía de transducción de señales de una célula de una señal medible dependiente de la vía de transducción de señales, se usará en una forma de realización preferida la concentración intracelular de Ca^{2+} . La modificación de la concentración intracelular de Ca^{2+} se puede comprobar, por ejemplo, por uso de aequorina, un colorante o la tecnología FLIPR™ de la empresa "Molecular Devices".

Los procedimientos previamente descritos se pueden usar en una forma de realización preferida para la identificación de un medicamento.

Los compuestos químicos que modifican la acción de al menos una de las vías de transducción de señales dependiente de un receptor acoplado con una proteína G (GPCR) de un organismo biológico se pueden identificar por medio de al menos un procedimiento de esta invención. Estos compuestos químicos podrían comprender, por ejemplo, transformaciones respecto de la estructura química de sustancias señal hidrofílicas, que inducen GPCR, como determinadas hormonas, aromatizantes, determinados medicamentos.

La presente revelación se refiere, además, a una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido con la propiedad de una proteína G, en donde el polipéptido está seleccionado de una de las siguientes secuencias:

- a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según la Seq ID Nro. 2, Seq ID Nro. 4, Seq ID Nro. 6 o Seq ID Nro. 8;
- b) un polipéptido según a), al que le faltan uno o varios aminoácidos;
- c) un polipéptido según a), al que se la añaden uno o varios aminoácidos;
- d) una variante alélica del polipéptido según a).

ES 2 342 453 T3

Las variantes alélicas comprenden todos los polipéptidos que resultan de la composición de bases de la forma característica del gen en el locus del gen definido para las parejas proporcionales de las proteínas híbridas.

La revelación se refiere, además, a un polinucleótido que contiene una secuencia de polinucleótidos, en donde la secuencia de polinucleótidos se selecciona de una de las siguiente secuencias:

- a) una secuencia de polinucleótidos según la Seq ID Nro. 1, Seq ID Nro. 3, Seq ID Nro. 5 o Seq ID Nro. 7 o su correspondiente secuencia complementaria;
- b) una secuencia de polinucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de polinucleótidos según a).

La rigurosidad de una solución se determina por medio de su temperatura y contenido de sal. Con la rigurosidad, se puede regular la dimensión de los pares de bases de dos secuencias homólogas de nucleótidos. La rigurosidad depende de la longitud y la composición de las bases de un polinucleótido. Las condiciones de rigurosidad en el sentido de esta invención existen cuando la secuencia de polinucleótidos y la secuencia hibridante presentan una concordancia del 95% o más.

Una forma de realización preferida de una secuencia de polinucleótidos o de un polinucleótido tal como se describió previamente es un polinucleótido que es componente de una construcción de vector recombinante. Las construcciones de vector recombinante se pueden generar con la ayuda de los conocimientos científicos pertinentes, tal como se reflejan, por ejemplo, en "F.M. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York". En este caso, se incorpora un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos según una de las informaciones de secuencia descritas previamente (Seq ID Nro. 2, 4, 6, 8) o una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con una de las informaciones de secuencia descritas previamente (Seq ID Nro. 1, 3, 5, 7) en un vector de base. Como vector de base se entiende un vector en el cual se puede incorporar una secuencia de polinucleótidos de un polinucleótido, por medio de los métodos de la biología molecular, clonándolo entonces en un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, hongo o en las células de un cultivo celular. El vector básico puede estar compuesto, por ejemplo, por un plásmido con un marcador de resistencia a un antibiótico, un "origin of replication" ("origen de replicación") apropiado para la multiplicación del plásmido en bacterias o cultivos celulares, así como un promotor adecuado para la expresión de una proteína. El vector básico puede estar formado, por ejemplo, también por un vector fago, un fagómido, un fásmid, un cósmido, un vector vírico, un vector YAC u otro tipo de vector. Ejemplos de vectores básicos son pUC 18, pUC19, pBluescript, pKS, pSK y otros. La introducción del polinucleótido que se debe incorporar se lleva a cabo a través de puntos de corte de restricción por medio de las correspondientes enzimas de restricción, comercializadas por compañías tales como BioLabs, Roche Diagnostics, Stratagene y otras. Estos puntos de corte de restricción pueden ser, por ejemplo, los puntos de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI, EcoRI, Sall, EcoRV y otras.

En una forma de realización preferida, la construcción del vector recombinante se compone de un vector de expresión utilizable en eucariotas y/o procariotas. Un vector de expresión contiene un promotor que puede estar unido funcionalmente con una secuencia de polinucleótidos, de modo que se puede sintetizar una proteína codificada por esta secuencia de polinucleótidos en un organismo biológico, por ejemplo, una bacteria, hongo o en las células de una línea celular eucariota. El promotor puede ser inducible, por ejemplo, por triptófano, o puede ser constitutivo en su actividad. Ejemplos de vectores de expresión son pUC18, pUC19, pBluescript, pcDNA3.1 u otros.

La presente revelación se refiere también a una célula huésped que puede contener un polinucleótido o una construcción de vector recombinante descrita como con anterioridad. La célula huésped está compuesta, en una forma de realización preferida, de una célula humana. En otras formas de realización preferidas, la célula huésped está compuesta por una especie vertebrada, una especie de insecto, un *C. elegans*, una bacteria o una levadura. En formas de realización de muy especial preferencia, la célula está compuesta por una célula HeLa, 293, COS, CHO, la célula de un *Escherichia coli* o de las células de un *Saccharomyces cerevisiae*. Más allá de ello, también se pueden usar células eucariotas, en especial, líneas celulares, bacterias, en especial *Bacillus spec.*, *Streptomyces spec.* u hongos, en especial *Penicillium spec.*, *Aspergillus spec.*

La revelación se refiere también a la preparación de una célula huésped descrita como con anterioridad por introducción de un polinucleótido de acuerdo con una o varias de las secuencias de polinucleótidos tal como se describe en la Seq ID Nro. (1-8) o una de las construcciones de vectores recombinantes caracterizadas como con anterioridad en una célula eucariota o procariótica. La introducción de las secuencias de polinucleótidos se puede realizar, por ejemplo, por electroporación o transformación de las células eucariotas o procariotas con la secuencia de polinucleótidos, además por precipitación de fosfato de Ca^{2+} de las células eucariotas o procariotas junto con la secuencia de polinucleótidos u otros métodos.

Una célula huésped de este tipo se puede usar para realizar un procedimiento de esta invención descrito previamente.

ES 2 342 453 T3

Más allá de ello, la presente revelación se refiere a un procedimiento para la preparación de una proteína compuesta por una secuencia de aminoácidos seleccionada de una de las secuencias Seq ID Nro. 2, Seq ID Nro. 4, Seq ID Nro. 6, Seq ID Nro. 8 que contiene las siguientes etapas de procedimiento:

- a) preparación de una célula huésped que contiene una correspondiente secuencia de polinucleótidos y se prepara tal como se describió precedentemente;
- b) cultivo de esta célula huésped en un medio de crecimiento apropiado para la célula huésped, así como eventualmente la inducción de la expresión de la proteína;
- c) obtención del material celular y descomposición de las células;
- d) separación de una proteína por medio de métodos bioquímicos para la purificación de las proteínas.

Para la preparación y la purificación de las proteínas designadas, se pueden utilizar correspondientemente métodos conocidos tal como se describen en "F.M. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York".

Ejemplos

Ejemplo 1

Activación de una vía de transducción de señales por medio de la mutante de de proteína $G\alpha$ -6q a través de distintos receptores

Se cultivaron células COS7 en DMEM (medio Eagle modificado con Dulbecco) con adición de 10% de FCS (suero fetal de ternero) a 37°C (5% de CO₂). Para las transfecciones, se sembraron 1 x 10⁶ células en placas de 100 mm. Aprox. 24 h más tarde, se cotransformaron las células con los plásmidos de expresión αq o -6q (1 μ g de ADN/placa de 100 mm) y en cada caso uno de los siguientes constructos de receptores (4 μ g de ADN/placa de 100 mm): M2 (receptor muscarínico en pCD), D2 (receptor de dopamina en pCDNAI), kappa (receptor de opioides en pCDNA3), SSTR1 (receptor de somatostatina en pCMV), A1 (receptor de adenosina en CDM7), D1 (receptor de dopamina en pCDNAI), V2 (receptor de vasopresina en pCD-ps), $\beta 2$ (receptor adrenérgico en pSVL).

Aprox. 24 h después de la transfección, se dividieron las células en placas de 6 cavidades en porciones iguales y se añadieron en DMEM 3 μ Ci/ml de [³H]mio-inositol (20 Ci/mmol). Después de incubar durante 24 horas, las células se incubaron a temperatura ambiente con HBSS (+ 10 mM de LiCl) durante 20 min. Luego se estimularon las células durante una hora con los correspondientes agonistas y se determinó el incremento de los monofosfatos de inositol intracelular por cromatografía de intercambio aniónico.

A los mutantes de proteína $G\alpha$ -6q les faltan en comparación con la secuencia de tipo salvaje los seis restos de aminoácidos altamente conservados del extremo aminoterminal. Los resultados se obtuvieron a continuación con la construcción de la proteína $G\alpha$ -6q. La preparación de tales mutantes o de los constructos receptores utilizados se realizó con ayuda de métodos estándar de la biología molecular tal como se describió exhaustivamente, por ejemplo, en "F.M. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York".

Se incubaron células COS7 que expresan WTq o -6q y distintos receptores acoplados con Gi/o (A) o Gs (B) durante 1 h (37°C) en presencia y en ausencia de los correspondientes agonistas (ver más abajo). El aumento de la concentración intracelular de IP1 se midió como en el protocolo 1 adjunto. Los datos representan valores medios + D.E. de 3-7 experimentos independientes, en cada caso, ejecutados como determinaciones triples. Los siguientes ligandos fueron utilizados: A m2 (receptor muscarínico): carbacol (100 μ M); D2 (receptor de dopamina): (-)-Quinpirol (10 μ M); kappa (receptor de opioides): (-)-U50488 (10 μ M); SSTR1 (receptor de somatostatina): somatostatina 14 (1 μ M); B, A1 (receptor de adenosina): R(-)-PIA (10 mM);

B D1 (receptor de dopamina): dopamina (1 mM); V2 (receptor de vasopresina): AVP (1 nM); $\beta 2$ (receptor adrenérgico): (-)-isoproterenol (200 μ M).

Se comprobó que la mutante de proteína $G\alpha$ -6q estimula una formación de IP1 en función de distintas clases de receptores. IP1 es una molécula señal que se produce en la vía de transducción de señales PLC- β y que lleva en el curso ulterior de la transmisión de señales a un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺. La liberación de IP1 por medio del constructo de -6q resulta tanto con receptores acoplados a Gi/o (A: m2, D2, k-OR, SSTR1, A1) como también a Gs (B: D1, V2, $\beta 2$).

Ejemplo 2

Preparación de mutantes altamente expresadas de proteínas G α con amplia especificidad por receptores

Primero se construyen subunidades α de proteína G híbrida a las que les faltan los seis aminoácidos altamente conservados del término amino y que presentan al mismo tiempo en el término C ya sea una secuencia α i o α s. Respecto de la secuencia α i o α s contenida, la denominación resulta como -6qi4 o -6qs5. El constructo -6qi4 une los receptores acoplados a Gs como a algunos Gi/o con la vía de transducción de señales de PLC β . Estos receptores comprenden también el receptor SSTR1 o edg5. El receptor edg5 no se puede unir con G α 16 a la vía de transducción de señales de PLC β . G α 16 es una proteína G con amplia especificidad por receptores que está revelada en el documento WO 97/48820 (título: Promiscuous G-protein compositions and their use).

El constructo -6qs5 une los receptores Gi/o- así como receptores adicionales acoplados a Gs con la vía de transducción de señales de PLC β y comprende también receptores como el receptor de dopamina D1 o el receptor β 2 adrenérgico.

Una combinación de estas dos subunidades α de la proteína G en una línea celular comprende así un amplio espectro de GPCR como toda subunidad por sí misma o G α 16.

La aplicabilidad en procedimientos técnicos de screening se podría mejorar si se aumentara la expresión de estas subunidades G α (-6qi4; -6qs5), porque, de esa manera, también se podría lograr una señal más potente.

Por este motivo, se incorporaron secuencias de reconocimiento adicionales de miristoilación/palmitoilación en el área aminoterminal de las subunidades G α . Esto llevó a la construcción de las proteínas G -6qi4myr y -6qs5myr. La secuencia proteica de -6qi4myr y -6qs5myr respecto del término amino es MGCC a diferencia de MACC de la secuencia inicial de las variantes 6q. Los nuevos constructos -6qi4myr y -6qs5myr contienen ahora una secuencia de consenso para la miristoilación/palmitoilación. -6qi4myr se preparó de -6qi4 y -6qs5myr se preparó de -6qs5. Se sabe que la separación de restos de miristilo o palmitilo en proteínas G llevan a una distribución en la célula: la pérdida de restos de palmitato o miristato influyen sobre el modelo de expresión de las proteínas G de modo que la eliminación del resto de ácido graso tiene como consecuencia una localización principalmente citosólica. Las subunidades α de proteína G se hallan tanto en la membrana celular como también en el citosol. Sin embargo, sólo las proteínas G en posición de membrana pueden seguir conduciendo las señales de los GPCR en los efectores intracelulares. Sólo eran conocidas las consecuencias de la eliminación de una secuencia de consenso para la palmitoilación/miristoilación por mutación. Por el contrario, no era conocido que la introducción del sitio de consenso adicional para la miristoilación/palmitoilación en las mutantes de delección G α lleva al aumento de la expresión. Se pudo demostrar que la introducción de sitios adicionales de palmitoilación/miristoilación aumenta la cantidad expresada en la membrana celular de la subunidad G α . En el Westernblot de SDS-PAGE (Westernblot por electroforesis de gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida) se ha de reconocer que la expresión de -6qi4myr en comparación con -6qi4 está claramente aumentada. Un Westernblot de SDS-PAGE de un fraccionamiento en una fracción particulada (p; con contenido de membranas) y fracción soluble (s; sc) de qwt y -6qi4myr muestra que la variante más miristoilada/palmitoilada -6qi4myr sólo está contenida en la fracción particulada.

20 μ g de proteínas de membrana se prepararon para ello a partir de células transfectadas COS7, se separaron por electroforesis de gel SDS-PAGE (10%) y se analizaron por medio de análisis Westernblot usando el anticuerpo monoclonal 12CA5 (Roche Biosciences).

Todas las subunidades α de proteína G se detectaron con el anticuerpo monoclonal 12CA5 (acoplado con peroxidasa de rábano picante), que está dirigido contra el rótulo de epitopo HA. El rótulo HA está contenido en todos los constructos de proteína G. En qwt qi5, reemplaza a los aminoácidos 125-130, en las proteínas G suprimidas N-terminales (-6q, -6qi4, -6qi4myr), los aminoácidos 119-124. 20 μ g de proteína de membrana, preparados a partir de células transfectadas de COS7, se separaron por medio de electroforesis de gel SDS PAGE, se sometieron a blot en nitrocelulosa y se detectaron las subunidades α de proteína G con el anticuerpo 12CA5. Las proteínas G inmunorreactivas se hicieron visibles con un sistema de quimioluminiscencia (Amersham).

Ejemplo 3

Estimulación de distintas proteínas G α altamente expresadas con amplia especificidad por receptores a través de diferentes receptores

Se ensayó la estimulación de las variantes de G α altamente expresadas -6qs5myr y -6qi4myr por medio de diferentes receptores. Se reconoció que -6qi4myr (=Δ6qi4myr) se conecta por medio de receptores acoplados a Gi/o (por ejemplo, dopamina D2, edg5, CCR5, SSTR1, KOR) a la vía de transducción de señales de PLC β y lleva a una alta señal que es proporcional a la liberación de Ca²⁺. Como controles, se utilizaron un constructo de vector, así como la proteína G α 16 (+16). Se mostró que los receptores acoplados a Gs se unen por medio de -6qs5myr (=Δ6qs5myr) a la vía de transducción de señales de PLC β . Como referencia también sirve aquí la proteína G G α 16.

ES 2 342 453 T3

Para la determinación experimental del Ca^{2+} liberado por medio del sistema de aequorina, se cotransfectaron células CHO con el plásmido de expresión de apoaequorina cytAEQ/pCDNAI, el receptor de ADN indicado (SSTR1, KOR, D2, D1, beta2), así como las subunidades α de la proteína G G16 y -6qi4myr utilizando lipofectamina. Después de incubar durante 10 horas en medio OPTIMEM, se lavaron las células una vez con medio RPMI 1640 y se incubaron con 5 μM de coelenterazina f en RPMI 1640 durante 2 h a 37°C. Luego se lavaron las células dos veces con PBS y se estimularon con los correspondientes agonistas de receptores: somatostatina 14 para el receptor SSTR1, U50488 para el receptor de kappa opioides, (-)-Quinpirol para el receptor de dopamina D2, dopamina para el receptor de dopamina D1 e isoproterenol para el receptor beta2. La estimulación del agonista de los receptores acoplados a Gi/o (SSTR1, KOR, D2) y los receptores acoplados a Gs (D1, beta2) lleva a la activación de las proteínas G G16, así como -6qi4myr con posterior estimulación de PLC β y liberación intracelular de Ca. La unión de Ca con el complejo de apoaequorina-coelenterazina lleva a emisión de luz que se midió con un luminómetro (TOPCount, Hewlett Packard).

Resumen de los resultados:

1. Alineación de las áreas aminoterminales de distintas proteínas G α .
2. Estimulación de la vía de transducción de señales de PLC β por medio de la variación proteica -6q-G α por receptores acoplados a Gi/o (A) y receptores acoplados a Gs (B) usando la mayor concentración posible del correspondiente agonista.
3. Aumento de la expresión de -6qi4myr en comparación con -6qi4 según Westernblot SDS-PAGE. Además, se muestra la expresión de otras proteínas G α .
4. Fraccionamiento en fracción particulada (p; con contenido de membranas) y fracción soluble (s; sc) de qwt y -6qi4myr según Westernblot SDS-PAGE. Las subunidades de proteína G se detectaron con el anticuerpo monoclonal 12CA5 y dan como resultado bandas de proteínas en un tamaño de -42KD.
5. Unión de distintos receptores acoplados a Gi/o por medio de -6qi4myr (=Δ6qi4myr) con la vía de transducción de señales de PLC β . D2, kappa y SSTR1 son receptores acoplados a Gi/o. Como controles, se utilizaron un constructo de vector, así como la proteína G α 16 (+16).
6. Unión de receptores acoplados a Gs por medio de -6qs5myr (=Δ6qs5myr) con la vía de transducción de señales de PLC β . β 1, β 2 y D1 son receptores acoplados a Gs. Como referencia, sirve un constructo de vector y la proteína G α 16 (+16).
7. Unión del receptor de dopamina D2 acoplado a Gi/o con la vía de transducción de señales de PLC β -Ca en presencia de la subunidad α G16 menos sensible, en presencia de la subunidad G α muy sensible -6qi4myr, así como en combinación con G16 y -6qi4myr. Es evidente que la potente activación de la liberación del calcio por -6qi4myr no se perjudica mediante la presencia de G16.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación de un compuesto químico que modifica la acción de al menos una vía de transducción de señales dependiente del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) de un organismo biológico, en donde dicho procedimiento contiene las siguientes etapas de procedimiento:

- a) preparación de al menos una célula que contiene al menos una vía de transducción de señales dependiente de un GPCR, en donde se prepara una o más de una proteína G;
- b) preparación de al menos un compuesto químico por ensayar;
- c) puesta en contacto de una célula de acuerdo con a) con un compuesto químico por ensayar de acuerdo con b);
- d) determinación del efecto cuantitativo o cualitativo de un compuesto químico por ensayar de b) sobre la vía de transducción de señales de una célula de a) por medio de una señal medible dependiente de la vía de transducción de señales,

caracterizado porque al menos una proteína G está seleccionada de -6qi4myr o -6qs5myr, en donde “-6qi4” significa que la subunidad α de la proteína G de la clase G α q lleva una delección N-terminal de 6 aminoácidos y presenta en el término C una secuencia α i, y en donde “6qs5” significa que la subunidad α de la proteína G de la clase G α s lleva una delección N-terminal de 6 aminoácidos y que presenta en el término C una secuencia α s, y “myr” significa que la correspondiente proteína G en el término amino presenta una secuencia de reconocimiento de miristoilación/palmitoilación MGCC en lugar de la secuencia específica de G α q MACC.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la célula, que se pone a disposición según a), se preparan al menos dos proteínas G.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que en la célula, que se pone a disposición según a), se preparan al menos dos proteínas G seleccionadas de -6qi4myr, 6qs5myr, -6qi4, -6qs5 o Galpha16.

4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula según a) es la célula de una especie de vertebrados, una especie de insectos, una *C. elegans* o una levadura.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la célula es una célula de HeLa, 293, COS, CHO o una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, en el que para determinar el efecto cuantitativo o cualitativo de un compuesto químico por ensayar por medio de una señal medible en función de la vía de transducción de señales de acuerdo con la reivindicación 1 d) se usa la concentración intracelular de Ca²⁺.

7. Procedimiento para la identificación de un medicamento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6.

ES 2 342 453 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

5 <120> Procedimiento con amplio intervalo de aplicaciones para identificar moduladores de los receptores acoplados a la proteína G.

<130> AVE D-2000/A033

10

<140>

<141>

15 <160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 1080

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

25

<400> 1

30 atgactctgg agtccatcat ggcgtgctgc ctgagcgagg aggccaagga agccccggcg 60
atcaacgacg agatcgagcg gcacgtccgc agggacaagc gggacgcccg ccgggagctc 120
aagctgctgc tgctcgggac aggagagagt ggcaagagta cgtttatcaa gcagatgaga 180
atcatccatg ggtcaggata ctctgatgaa gataaaaagg gcttcaccaa gctggtgtat 240
cagaacatct tcacggccat gcaggccatg atcagagcca tggacacact caagatccca 300
35 tacaagtatg agcacaataa ggctcatgca caattagtgc gagaagttga tgtggagaag 360
gtgtctgctt ttgagaatcc atatgtagat gcaataaaga gtttatggaa tgatcctgga 420
atccagggaat gctatgatag acgacgagaa tatcaattat ctgactctac caaatactat 480
cttaatgact tggaccgctg agctgacct gcctacctgc ctacgcaaca agatgtgctt 540
40 agagtctgag tccccaccac agggatcctc gaatacccct ttgacttaca aagtgtcatt 600
ttcagaatgg tcgatgtagg gggccaaagg tcagagagaa gaaaatggat acactgcttt 660
gaaaatgtca cctctatcat gtttctagta gcgcttagtg aatatgatca agttctcgtg 720
gagtcagaca atgagaaccg aatggaggaa agcaaggctc tctttagaac aattatcaca 780
45 taccctggt tccagaactc ctcggttatt ctgttcttaa acaagaaaga tcttctagag 840
gagaaaatca tgtattccca tctagtcgac tacttcccag aatatgatgg accccagaga 900
gatgccagg cagcccgaga attcattctg aagatgttcg tggacctgaa cccagacagt 960
gacaaaatta tctactccca cttcacgtgc gccacagaca ccgagaatat ccgctttgtc 1020
50 tttgctgccg tcaaggacac catcctccag ttgaacctga aggagtacaa tctggtctaa 1080

<210> 2

55 <211> 359

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

60

65

ES 2 342 453 T3

<400> 2

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

ES 2 342 453 T3

Thr Ile Ile Thr Tyr Pro Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe
 260 265 270
 5 Leu Asn Lys Lys Asp Leu Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu
 275 280 285
 10 Val Asp Tyr Phe Pro Glu Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala
 290 295 300
 15 Ala Arg Glu Phe Ile Leu Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser
 305 310 315 320
 20 Asp Lys Ile Ile Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn
 325 330 335
 25 Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn
 340 345 350
 30 Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val
 355
 <210> 3
 <211> 1062
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 3
 atggggtgct gcctgagcga ggaggccaag gaagcccggc ggatcaacga cgagatcgag 60
 cggcacgtcc gcagggacaa gcgggacgcc cgccgggagc tcaagctgct gctgctcggg 120
 40 acaggagaga gtggcaagag tacgtttatc aagcagatga gaatcatcca tgggtcagga 180
 tactctgatg aagataaaaag gggcttcacc aagctggtgt atcagaacat cttcacggcc 240
 atgcaggcca tgatcagagc catggacaca ctcaagatcc catacaagta tgagcacaat 300
 aaggctcatg cacaattagt tcgagaagtt gatgtggaga aggtgtctgc ttttgagaat 360
 45 ccatatgtag atgcaataaa gagtttatgg aatgatcctg gaatccagga atgctatgat 420
 agacgacgag aatatcaatt atctgactct accaaatact atcttaatga cttggaccgc 480
 gtagctgacc ctgcctacct gcctacgcaa caagatgtgc ttagagttcg agtccccacc 540
 acagggatca tcgaataccc ctttgactta caaagtgtca ttttcagaat ggtcgatgta 600
 50 gggggccaaa ggtcagagag aagaaaatgg atacactgct ttgaaaatgt cacctctatc 660
 atgtttctag tagcgcttag tgaatatgat caagttctcg tggagtcaga caatgagaac 720
 cgaatggagg aaagcaaggc tctctttaga acaattatca catacccctg gttccagaac 780
 tcctcgggta ttctgttctt aaacaagaaa gatcttctag aggagaaaat catgtattcc 840
 55 catctagtcg actacttccc agaatatgat ggaccccgaga gagatgcccga ggcagcccgga 900
 gaattcatte tgaagatgtt cgtggacctg aaccagaca gtgacaaaat tatctactcc 960
 cacttcacgt gcgccacaga caccgagaat atccgctttg tctttgctgc cgtcaaggac 1020
 accatcctcc agttgaacct gaaggagtgt ggcctcttct aa 1062
 60
 <210> 4
 <211> 353
 65 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 342 453 T3

<400> 4

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

ES 2 342 453 T3

	Ala	Leu	Ser	Glu	Tyr	Asp	Gln	Val	Leu	Val	Glu	Ser	Asp	Asn	Glu	Asn	
	225						230					235				240	
5	Arg	Met	Glu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Arg	Thr	Ile	Ile	Thr	Tyr	Pro	
						245					250				255		
10	Trp	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser	Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Asn	Lys	Lys	Asp	Leu	
				260						265					270		
15	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Met	Tyr	Ser	His	Leu	Val	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				275					280					285			
20	Tyr	Asp	Gly	Pro	Gln	Arg	Asp	Ala	Gln	Ala	Ala	Arg	Glu	Phe	Ile	Leu	
		290						295				300					
25	Lys	Met	Phe	Val	Asp	Leu	Asn	Pro	Asp	Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Tyr	Ser	
		305					310					315				320	
30	His	Phe	Thr	Cys	Ala	Thr	Asp	Thr	Glu	Asn	Ile	Arg	Phe	Val	Phe	Ala	
					325						330				335		
35	Ala	Val	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Glu	Cys	Gly	Leu	
				340						345					350		
40	Phe																
45	<210> 5																
	<211> 1062																
	<2-12> DNA																
	<213> <i>Mus musculus</i>																
50	<400> 5																
55	atggcgctgct	gcctgagcga	ggaggccaag	gaagcccggc	ggatcaacga	cgagatcgag	60										
60	cggcacgtcc	gcagggacaa	gcgggacgcc	cgccgggagc	tcaagctgct	gctgctcggg	120										
65	acaggagaga	gtggcaagag	tacgtttatc	aagcagatga	gaatcatcca	tgggtcagga	180										
	tactctgatg	aagataaaa	gggcttcacc	aagctggtgt	atcagaacat	cttcacggcc	240										
	atgcaggcca	tgatcagagc	catggacaca	ctcaagatcc	catacaagta	tgagcacaat	300										
	aaggctcatg	cacaattagt	tcgagaagtt	gatgtggaga	aggtgtctgc	ttttgagaat	360										
	ccatatgtag	atgcaataaa	gagtttatgg	aatgatcctg	gaatccagga	atgctatgat	420										
	agacgacgag	aatatcaatt	atctgactct	accaaatact	atcttaatga	cttggaaccg	480										
	gtagctgacc	ctgcctacct	gcctacgcaa	caagatgtgc	ttagagtctg	agtccccacc	540										
	acagggatca	tcgaataccc	ctttgactta	caaagtgtca	ttttcagaat	ggtcgatgta	600										
	ggggggccaaa	ggtcagagag	aagaaaatgg	atacactgct	ttgaaaatgt	cacctctatc	660										
	atgtttctag	tagcgcttag	tgaatatgat	caagtctctg	tggagtcaga	caatgagaac	720										
	cgaatggagg	aaagcaaggc	tctctttaga	acaattatca	catacccttg	gttccagaac	780										
	tcctcggtta	ttctgttctt	aaacaagaaa	gatcttctag	aggagaaaat	catgtattcc	840										
	catctagtcg	actacttccc	agaatatgat	ggaccccaga	gagatgccca	ggcagcccga	900										
	gaattcattc	tgaagatgtt	cgtggacctg	aaccagaca	gtgacaaaat	tatctactcc	960										
	cacttcacgt	gcgccacaga	caccgagaat	atccgctttg	tctttgctgc	cgtcaaggac	1020										
65	accatcctcc	agttgaacct	gaaggagtgt	ggcctcttct	aa		1062										

ES 2 342 453 T3

<210> 6

<211> 353

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 6

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

ES 2 342 453 T3

	180	185	190
5	Val Ile Phe Arg Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg		
	195	200	205
10	Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Thr Ser Ile Met Phe Leu Val		
	210	215	220
15	Ala Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Val Glu Ser Asp Asn Glu Asn		
	225	230	235
20	Arg Met Glu Glu Ser Lys Ala Leu Phe Arg Thr Ile Ile Thr Tyr Pro		
	245	250	255
25	Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Leu		
	260	265	270
30	Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu Val Asp Tyr Phe Pro Glu		
	275	280	285
35	Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Leu		
	290	295	300
40	Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Ser		
	305	310	315
45	His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala		
	325	330	335
50	Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Cys Gly Leu		
	340	345	350
55	Phe		
60			
65			

45 <210> 7
 <211> 1062
 <212> DNA
 50 <213> *Mus musculus*
 <400> 7

55 atggcgctgct gcctgagcga ggaggccaag gaagcccggc ggatcaacga cgagatcgag 60
 cggcacgtcc gcagggacaa gcgggacgcc cgccgggagc tcaagctgct gctgctcggg 120
 acaggagaga gtggcaagag tacgtttatc aagcagatga gaatcatcca tgggtcagga 180
 tactctgatg aagataaaaag gggcttcacc aagctggtgt atcagaacat cttcacggcc 240
 60 atgcaggcca tgatcagagc catggacaca ctcaagatcc catacaagta tgagcacaat 300

ES 2 342 453 T3

```

aaggctcatg cacaattagt tgcagaagtt gatgtggaga aggtgtctgc ttttgagaat 360
ccatatgtag atgcaataaa gagtttatgg aatgatcctg gaatccagga atgctatgat 420
agacgacgag aatatcaatt atctgactct accaaatact atcttaatga cttggaccgc 480
gtagctgacc ctgcctacct gcctacgcaa caagatgtgc ttagagtctg agtccccacc 540
acagggatca tcgaataccc ctttgactta caaagtgtca ttttcagaat ggtcgatgta 600
ggggggccaaa ggtcagagag aagaaaatgg atacactgct ttgaaaatgt cacctctatc 660
atgtttctag tagcgcttag tgaatatgat caagttctcg tggagtcaga caatgagaac 720
cgaatggagg aaagcaaggc tctctttaga acaattatca catacccctg gttccagaac 780
tcctcggtta ttctgttctt aaacaagaaa gatcttctag aggagaaaat catgtattcc 840
catctagtcg actacttccc agaatatgat ggacccaga gagatgcccga ggcagcccga 900
gaattcattc tgaagatggt cgtggacctg aaccagaca gtgacaaaat tatctactcc 960
cacttcacgt gcgccacaga caccgagaat atccgctttg tctttgctgc cgtcaaggac 1020
accatcctcc agttgaacct gaaggagtgt ggcctcttct aa 1062

```

<210> 8

<211> 353

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

```

Met Ala Cys Cys Leu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Ala Arg Arg Ile Asn
  1              5              10              15

```

```

Asp Glu Ile Glu Arg His Val Arg Arg Asp Lys Arg Asp Ala Arg Arg
          20              25              30

```

```

Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
      35              40              45

```

```

Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu
      50              55              60

```

```

Asp Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala
      65              70              75              80

```

```

Met Gln Ala Met Ile Arg Ala Met Asp Thr Leu Lys Ile Pro Tyr Lys
          85              90              95

```

```

Tyr Glu His Asn Lys Ala His Ala Gln Leu Val Arg Glu Val Asp Val
      100              105              110

```

```

Glu Lys Val Ser Ala Phe Glu Asn Pro Tyr Val Asp Ala Ile Lys Ser
      115              120              125

```

```

Leu Trp Asn Asp Pro Gly Ile Gln Glu Cys Tyr Asp Arg Arg Arg Glu
      130              135              140

```

ES 2 342 453 T3

	Tyr	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Asp	Arg	
	145					150					155					160	
5	Val	Ala	Asp	Pro	Ala	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	Gln	Asp	Val	Leu	Arg	Val	
					165					170					175		
10	Arg	Val	Pro	Thr	Thr	Gly	Ile	Ile	Glu	Tyr	Pro	Phe	Asp	Leu	Gln	Ser	
					180					185					190		
15	Val	Ile	Phe	Arg	Met	Val	Asp	Val	Gly	Gly	Gln	Arg	Ser	Glu	Arg	Arg	
			195					200					205				
20	Lys	Trp	Ile	His	Cys	Phe	Glu	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	Met	Phe	Leu	Val	
	210							215					220				
25	Ala	Leu	Ser	Glu	Tyr	Asp	Gln	Val	Leu	Val	Glu	Ser	Asp	Asn	Glu	Asn	
	225					230					235				240		
30	Arg	Met	Glu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Arg	Thr	Ile	Ile	Thr	Tyr	Pro	
					245					250					255		
35	Trp	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser	Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Asn	Lys	Lys	Asp	Leu	
			260					265					270				
40	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Met	Tyr	Ser	His	Leu	Val	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
			275					280					285				
45	Tyr	Asp	Gly	Pro	Gln	Arg	Asp	Ala	Gln	Ala	Ala	Arg	Glu	Phe	Ile	Leu	
	290					295						300					
50	Lys	Met	Phe	Val	Asp	Leu	Asn	Pro	Asp	Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Tyr	Ser	
	305					310					315				320		
55	His	Phe	Thr	Cys	Ala	Thr	Asp	Thr	Glu	Asn	Ile	Arg	Phe	Val	Phe	Ala	
				325						330				335			
60	Ala	Val	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Glu	Cys	Gly	Leu	
			340					345					350				
65	Phe																

<210> 9

<211> 1128

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

ES 2 342 453 T3

<400> 9

```

5      gccatggccc gctcgctgac ctggcgctgc tgcccctggt gcctgacgga ggatgagaag 60
      gccgcgcgcc gggaggacca ggagatcaac aggatcctct tggagcagaa gaagcaggac 120
      cgcggggagc tgaagctgct gcttttgggc ccaggcgaga gcgggaagag caccttcac 180
      aagcagatgc ggatcatcca cggcgccggc tactcgagg aggagcgcaa gggcttcgg 240
      cccctggtct accagaacat cttcgtgtcc atgcgggcca tgatcgaggc catggagcgg 300
10     ctgcagattc cattcagcag gcccagagac aagcaccacg ctagcctggt catgagccag 360
      gacccctata aagtgaccac gtttgagaag cgctacgctg cgcccatgca gtggctgtgg 420
      agggatgccg gcatccgggc ctgctatgag cgtcggcggg aattccacct gctcgattca 480
      gccgtgtact acctgtccca cctggagcgc atcaccgagg agggctacgt cccacagct 540
15     caggacgtgc tccgcagccg catgcccacc actggcatca acgagtactg cttctccgtg 600
      cagaaaacca acctgcggat cgtggacgtc gggggccaga agtcagagcg taagaaatgg 660
      atccattgtt tcgagaacgt gatcgccctc atctacctgg cctcactgag tgaatacgac 720
      cagtgcctgg aggagaaaca ccaggagaac cgcatgaagg agagcctcgc attgtttggg 780
20     actatcctgg aactaccctg gttcaaaaag acatccgtca tectctttct caacaaaacc 840
      gacatcctgg aggagaaaat cccacacctc cacctggcta cctatttccc cagtttccag 900
      ggccctaagc aggatgctga ggcagccaag aggttcaccc tggacatgta caggaggatg 960
      tacaccgggt gcgtggacgg ccccgagggc agcaagaagg gcgcacgatc ccgacgcctt 1020
25     ttcagccact acacatgtgc cacagacaca cagaacatcc gcaaggtctt caaggacgtg 1080
      cgggactcgg tgctcgcccg ctacctggac gagatcaacc tgctgtga 1128

```

30 <210> 10

<211> 374

<212> PRT

35 <213> *Mus musculus*

<400> 10

```

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

      Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
45              20              25              30

      Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu
50              35              40              45

      Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile
      50              55              60

55     Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro
      65              70              75              80

60     Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala
      85              90              95

      Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His
65

```

ES 2 342 453 T3

	100	105	110
5	Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu 115 120 125		
10	Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile 130 135 140		
15	Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala 145 150 155 160		
20	Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val 165 170 175		
25	Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile 180 185 190		
30	Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp 195 200 205		
35	Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu 210 215 220		
40	Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln 225 230 235 240		
45	Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala 245 250 255		
50	Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val 260 265 270		
55	Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr 275 280 285		
60	Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp 290 295 300		
65	Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr 305 310 315 320		
	Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Lys Lys Gly Ala Arg Ser 325 330 335		
	Arg Arg Leu Phe Ser His Tyr Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Ile 340 345 350		
	Arg Lys Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu 355 360 365		
	Asp Glu Ile Asn Leu Leu 370		