



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 863**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99955480 .1**

(86) Fecha de presentación : **10.06.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1086132**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2001**

(54) Título: **Gen que codifica un transportador de anión orgánico.**

(30) Prioridad: **11.06.1998 US 88864 P**
03.05.1999 US 132267 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(73) Titular/es: **GILEAD SCIENCES, Inc.**
333 Lakeside Drive
Foster City, California 94404, US

(72) Inventor/es: **Cihlar, Tomas**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Gen que codifica un transportador de anión orgánico.

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a procedimientos que se refieren al procesamiento de aniones por el riñón humano. En particular, se refiere a procedimientos que emplean ácidos nucleicos y polipéptidos transcritos y expresados en los riñones que son responsables de la retirada de aniones tóxicos de la circulación.

Sweet y col. han descrito un gen de rata (ROAT1) que codifica una proteína transportadora de aniones orgánicos expresada en el riñón de ratas (Journal of Biological Chemistry 272:30088-30095 [1997]). Sekine y col. parece que también han descrito esencialmente el mismo gen, denominado OAT1 (Journal of Biological Chemistry 272:18526-18529 [1997]). Es evidente que el equivalente murino se ha descrito por Lopez-Nieto y col. en Journal of Biological Chem. 272:6471-6478 (1997).

Un objetivo de esta invención es aislar un ácido nucleico que codifique un transportador de aniones orgánicos humano (hOAT).

Otro objeto de esta invención es expresar de forma recombinante un ácido nucleico que codifique hOAT.

Otro objetivo es obtener hOAT expresado en elevados rendimientos en cultivo de células recombinantes.

Un objetivo es preparar un polipéptido aislado que codifique hOAT.

Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar nuevos polipéptidos hOAT.

Un objetivo adicional de esta invención es un ensayo para la evaluación de interacciones fármaco-fármaco potenciales debidas a la interferencia de un fármaco o grupo de fármacos con la excreción renal activa mediada por hOAT de otro fármaco.

Un objetivo adicional de esta invención es un sistema de ensayo para explorar compuestos candidatos que agonicen o antagonicen la expresión de hOAT y/o la actividad biológica del polipéptido hOAT, especialmente su actividad de transporte de aniones.

Otro objetivo es proporcionar un sistema de ensayo de exploración de hOAT para identificar variantes de compuestos nefrotóxicos que se captarán y transportarán por hOAT a un grado menor que en el caso con el compuesto precursor.

Un objetivo adicional es identificar alelos o isoformas de hOAT que estén asociadas con la sensibilidad a compuestos nefrotóxicos, particularmente fármacos nefrotóxicos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de exploración que comprende proporcionar un hOAT candidato agonista o antagonista, poner en contacto el candidato con un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2, o poner en contacto el candidato con una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido, determinar el efecto del candidato sobre la transcripción del ácido nucleico o la expresión o actividad biológica del polipéptido, identificar un agonista o antagonista de hOAT a partir de los candidatos, y preparar opcionalmente cantidades adicionales del agonista o antagonista identificado.

De acuerdo con una realización particular, la secuencia que codifica el polipéptido es la secuencia codificante de hOAT representada en la SEC ID N° 1.

La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento que comprende identificar uno o más alelos y/o isoformas de la secuencia de hOAT en seres humanos individuales y determinar si dichos alelos o isoformas se correlacionan o no con la nefrotoxicidad de un fármaco seleccionado en seres humanos individuales, donde hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2; y a un procedimiento que comprende identificar una variación de secuencia nucleica en la secuencia codificante de hOAT, dominios de control de la expresión de hOAT o secuencias de corte y empalme de ARN de hOAT en seres humanos individuales y determinar si dicha variación se correlaciona o no con la nefrotoxicidad de un fármaco seleccionado en seres humanos individuales, donde hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento que comprende proporcionar una forma modificada covalentemente de un análogo fosfonato nucleotídico y determinar si el análogo se transporta o no por hOAT, donde hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

De acuerdo con una realización particular, el análogo fosfonato nucleotídico es un derivado de PMEAs, cidofovir o PMPA.

La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento que comprende identificar una interacción fármaco-fármaco poniendo en contacto un fármaco candidato con hOAT y al menos un segundo fármaco cuyo efecto sobre el transporte mediado por hOAT del fármaco candidato tiene que determinarse, y analizar el efecto del segundo o más fármacos sobre el transporte mediado por hOAT del fármaco candidato, donde hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

Por tanto, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica hOAT y el polipéptido hOAT aislado. El hOAT se expresa en células recombinantes, donde encuentra uso para evaluar compuestos para la nefrotoxicidad o para identificar compuestos que tienen la capacidad de evitar la nefrotoxicidad. El hOAT también es útil en un procedimiento para identificar cualquier alelo e isoforma de hOAT que esté correlacionada con sensibilidad del paciente a agentes nefrotóxicos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 (SEC ID N° 1 y 2) representa una secuencia de nucleótidos para el ADNc que codifica hOAT y su secuencia traducida.

Descripción detallada de la invención

El polipéptido hOAT se define como una secuencia polipeptídica que es al menos un 90%, y preferiblemente al menos aproximadamente un 95% idéntica a la secuencia de la Fig. 1 (hOAT de secuencia de referencia).

Se encuentra una marca de secuencia expresada (EST) de aproximadamente 200 pb que tiene elevada homología con un segmento de hOAT en las entradas EST de GenBank con el N° de acceso R25797.

“Homología” se define como el porcentaje de restos en una secuencia de aminoácidos candidata que son idénticos a los restos del hOAT de secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología. Se conocen bien en la técnica procedimientos y programas informáticos para el alineamiento. Un programa informático que puede usarse o adaptarse con el propósito de determinar si una secuencia candidata están dentro de esta definición es “Align 2”, autorizado por Genentech, Inc., que se presentó con documentación de usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

Ácido nucleico de hOAT “aislado” es uno que se ha separado de su entorno como se encuentra en la naturaleza, es decir, del genoma en el caso de ADN o del entorno celular en el caso de ARN.

Polipéptido hOAT “aislado” es uno que se ha separado de su entorno celular normal, e incluye la proteína hOAT que es homogénea por SDS-PAGE usando tinción con plata.

Para calcular la homología de secuencia de aminoácidos, las secuencias candidata y de referencia se alinean del modo que produce la cantidad máxima de restos alineados, con inserciones y deleciones de restos representadas por huecos en las secuencias alineadas. Por ejemplo, un polipéptido de 120 restos que contiene un fragmento de secuencia de referencia de 100 restos fusionado en su extremo N-terminal a una marca de afinidad de polihistidina de 6 restos, pero con una única sustitución en el dominio hOAT, se calcula como del 99% homóloga a la secuencia de referencia de hOAT ya que la secuencia del fragmento corresponde exactamente a la secuencia de referencia de hOAT con alineación máxima excepto por una sustitución de un único resto y la fusión N-terminal de 6 restos. Por tanto, si la comparación de maximización de alineación de las secuencias candidata y de referencia revela una inserción (o delección) de uno o más restos aminoacídicos, entonces estos restos se ignoran para los propósitos de hacer el cálculo de homología. El solicitante reconoce que esta convención da lugar a una homología teórica del 100% entre 2 secuencias diferentes, pero se ha elegido para establecer su propia definición para los propósitos de esta presentación.

El análisis de la homología se basa en una cualquiera o más de las secuencias imputadas del ácido nucleico usado para expresar el hOAT, la secuencia del producto como se ha producido primero *in vitro*, o la secuencia después de cualquier modificación post-traducciona. Por tanto, si las secuencias de referencia y candidata son idénticas cuando se expresan, pero un resto de glutamina se desamina posteriormente en ácido glutámico, el primer candidato es un 100% homólogo, pero la secuencia desaminada no.

Para los propósitos de este documento “actividad hOAT” significa una cualquiera o más de las funciones realizadas por hOAT en el ser humano, incluyendo, en particular, el transporte de aniones orgánicos.

No es necesario que un polipéptido tenga actividad de transporte de aniones para estar dentro de la definición de hOAT de este documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones los polipéptidos hOAT tienen al menos un epítipo inmune que es capaz de reacción cruzada sustancial con un anticuerpo creado contra hOAT de secuencia de referencia, y por tanto son útiles en inmunoensayos para hOAT, pero muchos tienen mutaciones que vuelven al polipéptido incapaz del transporte de aniones.

Los polipéptidos hOAT de esta invención comprenden sustituciones, deleciones, o inserciones de cualquier resto aminoacídico adyacente a cualquiera de los sitios de restos aminoacídicos de la secuencia de referencia mostrados en la Fig. 1. Los hOAT de sustitución son aquellos en los que al menos un resto aminoacídico en la secuencia de referencia se ha retirado y se ha insertado un aminoácido diferente en su lugar en la misma posición. Se sustituyen uno o más restos.

La alanina es una sustitución común para cualquier resto, y se usa habitualmente en exploración de alaninas para identificar restos funcionales, pero está dentro del alcance de esta invención sustituir otros restos en la secuencia de referencia de hOAT. Los restos introducidos generalmente son aminoácidos de origen natural, habitualmente G, A, Y, V, L, I, S, T, D, E, Q, C, M, N, F, P, W, K, R o H (usando el código de una letra convencional; documento EP 323.149). Los restos adecuados también incluyen hidroxiprolina, ácido beta-hidroxiaspártico, ácido gamma-carboxiglutámico, hidroxilisina o norleucina, a emplear como alternativas a sus homónimos.

Estas sustituciones pueden ser conservativas, es decir, el resto de sustitución es estructural o funcionalmente similar al resto sustituido. Otras sustituciones serán menos conservativas porque constituyen un intercambio entre diferentes clases estructurales o funcionales de restos. Para los propósitos de este documento, estas clases son las siguientes: 1. Electropositivos: R, K, H; 2. Electronegativos: D, E; 3. Alifáticos: V, L, I, M; 4. Aromáticos: F, Y, W; 5. Pequeños: A, S, T, G, P, C; 6. Cargados: R, K, D, E, H; 7. Polares: S, T, Q, N, Y, H, W; y 8. Pequeños Hidrófilos: C, S, T. Las sustituciones entre grupos generalmente tendrán mayores efectos sobre la función de la proteína que las sustituciones conservativas (dentro de la clase). Por tanto, está particularmente dentro del alcance de esta invención introducir sustituciones conservativas en hOAT y, si los resultados no son satisfactorios, introducir sustituciones no conservativas en los sitios. Típicamente, sin embargo, las sustituciones o inserciones de prolina, glicina, y cisteína en la secuencia no están favorecidas. Un ejemplo de una variante expresada es un cambio en el codón 498 de AGC a ATC, que provoca la expresión de isoleucina en lugar de serina. Otras variantes se introducen en el ADN que codifica hOAT sin provocar un cambio en la secuencia proteica, por ejemplo de ATC a ATT en el codón 453 o de GGG a GGT en el codón 491.

Las variantes de hOAT se identifican fácilmente por procedimientos evidentes para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, sitios mostrados por la exploración de alanina para influir en la actividad biológica seleccionada se someten a mutagénesis por saturación para identificar la modificación óptima para la actividad en cuestión, por ejemplo la selectividad para el transporte de un anión particular.

Los hOAT que representan combinaciones de variantes de secuencia están dentro del alcance de esta invención. Se introducen 2, 3, 4, 5, o más sustituciones, deleciones o inserciones en hOAT como se define en este documento. Típicamente, una delección de un único resto se conseguirá por una inserción en 1 a aproximadamente 3 restos del sitio de delección. Generalmente, deleciones de dominios mayores innecesarios para la actividad de transporte de aniones no tienen que estar acompañadas por una inserción. Los resultados de sustituciones aminoacídicas individuales generalmente son aditivos excepto cuando los restos interaccionan entre sí directa o indirectamente. Se exploran fácilmente usando los mismos procedimientos descritos en Sweet y col. o Sekine y col. (*supra*) para identificar los que tienen las propiedades de hOAT de secuencia de referencia o las propiedades modificadas deseadas.

Se incluyen dentro del alcance de esta invención hOAT que tienen uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido de hOAT en cualquier posición de la secuencia de referencia. Los hOAT de inserción generalmente tendrán una estructura polipeptídica que comprende la secuencia $\text{NH}_2\text{-PP-A-(X)}_{n1}\text{-B-PP-COOH}$, en la que X es el(los) resto(s) insertado(s) (que pueden ser iguales o diferentes), $n1$ es un número entero (generalmente 1-30, típicamente 1 ó 2), A o B son los sitios de los restos indicados para la inserción y PP representa el resto del hOAT o un enlace en el extremo N o C terminal de hOAT.

La invención incluye fusiones de hOAT y secuencias de reconocimiento de anticuerpos seleccionadas (polipéptidos heterólogos) para la purificación por inmutafinidad de hOAT del cultivo celular, fusiones de secuencias de hOAT con marcas de afinidad tales como FLAG o polihistidina, y secuencias quiméricas (particularmente fusiones de fragmentos de la secuencia de hOAT con fragmentos de otros receptores de la clase de 12 regiones transmembrana).

También se incluyen dentro del alcance de esta invención hOAT en los que se introduce un sitio de glicosilación o se retira de la secuencia de referencia, sea por sustitución, inserción o delección de uno o más restos aminoacídicos. Dichos cambios provocarán la instalación o retirada de la secuencia NXS o NXT, donde X puede ser cualquier resto. Por tanto, la asparagina puede sustituirse por cualquier resto localizado 2 restos N-terminales a serina o treonina para introducir un sitio de glicosilación. Como alternativa, puede omitirse una única glicosilación sustituyendo asp glicosilada con cualquier resto, delecionando la serina o treonina adyacente a un sitio sustituyendo cualquier resto en el sitio de glicosilación para alterar la secuencia NXS o NST.

También se incluyen dentro del alcance de esta invención hOAT de delección, es decir, hOAT en los que se ha retirado uno o más restos aminoacídicos de la secuencia de referencia en un sitio indicado, por lo que los restos flanqueantes ahora se unen por un enlace peptídico del modo habitual. Generalmente no se prefiere deleccionar restos P, C o G.

Típicamente, las delecciones o inserciones son relativamente pequeñas, del orden de 1 a 10 restos y generalmente no más de 2, aunque las delecciones o inserciones pueden ser bastante grandes si no están en partes críticas de la secuencia de referencia, o la secuencia adicional tiene que retirarse en algún punto durante el procesamiento post-traducciona

Los hOAT de esta invención pueden someterse a modificación covalente post-traducciona, por ejemplo desamidación de asparagina o glutamina, u oxidación de restos de cisteína. La glicosilación puede ser variante o estar ausente dependiendo de la célula huésped usada para expresar la variante. Los hOAT que contienen dichas modificaciones se incluyen dentro del alcance de esta invención. Si el hOAT se glicosila en cultivo de células recombinantes, preferiblemente se glicosila con carbohidratos característicos de células de mamífero, aunque también puede contener patrones de glicosilación fúngicos (tales como de levaduras). La glicosilación que es aceptable es característica de la expresión de hOAT a partir de una o más células o líneas celulares de fibroblastos, renales, de cerebro, pulmonares, de piel, neurales, hepáticas o de médula ósea, o a partir de cualquier línea celular de mamífero tal como células CHO o de riñón embrionario.

Los alelos humanos de origen natural se incluyen dentro del alcance de esta invención. Éstos se identifican fácilmente obteniendo muestras de ácido nucleico de individuos de una población, secuenciando hOAT a partir de dichos individuos y determinando los restos en los que se encuentra la variación. Una vez se ha identificado cada variación, es sencillo determinar la frecuencia del supuesto alelo en otros individuos por PCR usando cebadores específicos para el dominio en cuestión, u otros procedimientos tales como los convencionales en el campo de la determinación de proporciones de alelos en poblaciones humanas.

Preparación de Polipéptidos hOAT

Los hOAT de esta invención se preparan fácilmente por procedimientos conocidos en la técnica. En general, el ácido nucleico que codifica el hOAT se preparara por PCR, por síntesis *in vitro* (Vasser y col., "N.A.R." 18(a0): 3089 [1990]), por clonación a partir de una biblioteca genómica o de ADNc renal humano o combinaciones de los mismos. Se usa mutagénesis dirigida al sitio del ácido nucleico que codifica hOAT para preparar el ácido nucleico que codifica variantes de secuencia. Las cadenas + (codificantes) y - (antisentido) de hOAT se incluyen dentro del alcance de ácido nucleicos de hOAT, ya que son ADNc que codifican hOAT, ADN genómico y ARN. El ADN de hOAT incluye regiones 5' y 3' del gen de hOAT que no se transcriben pero sirven como dominios de control de la transcripción, y se transcriben pero no expresan dominios tales como intrones (incluyendo uniones de corte y empalme), señales de poliadenilación, dominios de reconocimiento de ribosomas y similares.

El ácido nucleico de hOAT se expresa en sistemas *in vitro* o en células huésped recombinantes. Un procedimiento para la expresión es síntesis basada en ribosomas usando ARNt especializado (Benner, "TIBTECH" 12:158-163 [1994] y Robertson y col., "J. Am. Chem. Soc." 113:2722-2729 [1991]). Habitualmente, sin embargo, el ácido nucleico que codifica hOAT (generalmente ADN) se inserta en un vector de expresión apropiado reconocido (transcrito y traducido) por las células huésped, las células huésped se transfectan con el vector de expresión, las células huésped recombinantes se cultivan en medio de cultivo adecuado, y opcionalmente el hOAT deseado se recupera del cultivo de células recombinantes por procedimientos cromatográficos u otros procedimientos de purificación. También está dentro del alcance de esta invención sintetizar parcialmente el hOAT en cultivo de células recombinantes o por procedimientos *in vitro* y después ligar los fragmentos polipeptídicos por péptido ligasa (síntesis proteolítica inversa).

El ácido nucleico para la expresión del hOAT puede comprender una secuencia señal exógena. Aquí, el hOAT se expresa como una preproteína de hOAT, por lo que el hOAT se expresa como un precursor que se procesa en hOAT maduro. Las presecuencias adecuadas incluyen las de (a) proteasas microbianas tales como subtilisina, (b) polipéptidos de mamífero, (c) citoquinas tales como interferón gamma o una interleuquina, (d) factores de crecimiento tales como la hormona del crecimiento o TGF-alfa, (e) polipéptidos o proteínas que tienen secuencias maduras N-terminales que son homólogas a hOAT humano, (f) inmunoglobulinas, (g) receptores, o (h) otras presecuencias de proteína secretadas o unidas a la membrana celular. Las secuencias señal opcionalmente se obtienen de o son homólogas a la célula huésped, o al menos la rama filogenética a la que la célula huésped pertenece. Por ejemplo, un especialista en la técnica usaría una presecuencia de una proteína de levaduras, tal como un factor de acoplamiento, en un sistema de expresión de levaduras, o de una bacteria, tal como ST-II o beta-lactamasa, en sistemas de cultivo celular bacterianos. Se conoce una amplia diversidad de secuencias señal adecuadas y pueden usarse en procedimientos para la preparación de los hOAT descritos en este documento.

Las construcciones de ácido nucleico que codifican hOAT generalmente sufren corte y empalme en vectores de expresión donde estarán bajo el control de secuencias que controlan la transcripción, traducción y estabilidad del

ARN. Estas secuencias incluyen promotores, operadores, potenciadores y secuencias de poliadenilación, y se conocen en líneas generales en la técnica. La construcción de vectores de expresión adecuados para los hOAT de esta invención es una materia de rutina para los especialistas en la técnica, y se conseguirá usando las herramientas convencionales de biología molecular, incluyendo síntesis de ácido nucleico *in vitro*, PCR, adaptadores, ligasas, enzimas de restricción, plásmidos de expresión y lanzadera, auxiliares de transfección y similares, todos los cuales están disponibles al público (y para la mayor parte en el mercado).

Las células huésped adecuadas para la transfección con ácido nucleico que codifica hOAT son bien conocidas. Algunas se han mencionado anteriormente mientras que otras se describen en el documento WO 93/13208 en la página 12, línea 21 - página 19, línea 5, y el documento EP 319.312 B1, página 16, líneas 10-18 y la Tabla II del mismo. Puede ser óptimo usar células huésped que sean capaces de glicosilar hOAT, típicamente incluyendo células de mamífero tales como células 293 de riñón embrionario, células COS, CHO, células BHK-21 y similares. Los ovocitos de *Xenopus* son adecuados para la expresión del ARN de hOAT. Además, las células huésped que se han usado hasta ahora para expresar polipéptidos transportadores de aniones en cultivo de células recombinantes son adecuadas.

El sistema huésped-vector debe producir hOAT sustancialmente homogéneo, evitando de este modo la necesidad de purificar diversos alelos de hOAT, isoformas o productos de escisión de otro cualquiera. Si la célula huésped tiene capacidad de glicosilación, esencialmente todas las moléculas de hOAT deben glicosilarse. Además, las células huésped óptimamente no proteolizarán hOAT. Pueden seleccionarse células que no contengan proteasas, por ejemplo, en el periplasma, que escindirán hOAT. Por ejemplo, se conoce *E. coli* y otras cepas microbianas que tienen poca o ninguna actividad proteolítica extracelular o periplásmica (diferente a las peptidasas señal). La ausencia de proteasas nocivas ayuda a asegurar que el producto no se vuelva microheterogéneo en cuanto a la longitud de cadena por proteasas endógenas del huésped que funcionan sobre el producto de expresión hOAT. Además, o como alternativa, se sustituyen restos básicos de hOAT que definen sitios para la escisión proteolítica con restos diferentes a K o R.

Las células recombinantes hOAT se cultivan en condiciones convencionales usando medios de cultivo convencionales hasta ahora empleados con las células en cuestión. Estas condiciones y medios son ampliamente conocidos. Las células recién transfectadas solamente pueden expresar de forma transitoria los hOAT, pero se obtienen transformantes estables fácilmente de acuerdo con la práctica convencional usando cotransformación con un gen de selección tal como DHFR o glutamina sintetasa y cultivo en serie en presencia de un agente de selección tal como metotrexato o metionina sulfoximina, respectivamente. Los rendimientos de hOAT pueden diferir sustancialmente a pesar de diferencias minoritarias en el carácter de los sustituyentes o inserciones. En dichos casos, es deseable seleccionar un sistema de expresión que produzca una cantidad de hOAT que sea al menos aproximadamente un 75% de la obtenida con el hOAT de referencia en el mismo sistema de expresión.

El hOAT puede expresarse en bacterias en forma de cuerpos retráctiles, en cuya base se recupera hOAT insoluble y se vuelve a plegar usando procedimientos conocidos, por ejemplo disolución en un desnaturalizante tal como clorhidrato de guanidinio seguido de la retirada gradual del desnaturalizante. Los hOAT directamente expresados de esta invención pueden tener una metionina N-terminal extra o un resto de metionina bloqueado, aunque pueden emplearse células huésped que escindirán dichos restos de metionina N-terminales si son extraños a la proteína como se encuentra en la naturaleza. Para evitar las dificultades con productos de expresión insolubles es preferible expresar hOAT en células eucariotas, más preferiblemente de mamífero.

El hOAT se aísla o purifica del cultivo de células recombinantes por procedimientos hasta ahora empleados para otras proteínas, por ejemplo, electroforesis en gel SDS en condiciones reductoras o nativas, enfoque isoeléctrico, electroforesis en gradiente de pH inmovilizado, precipitación salina, fraccionamiento en disolvente (usando etanol por ejemplo) y cromatografía tal como filtración en gel, intercambio iónico (catiónico o aniónico), afinidad a ligando (azul cibacron F3GA o *p*-aminobenzamidina), inmunoafinidad, cromatofluore, cromatografía de fase inversa o de interacción hidrofóbica. Típicamente, el hOAT se aislará para que sea >95% puro en peso de la proteína, y preferiblemente mayor del 99% puro. Sin embargo, el término "aislado" como se usa en la referencia a la proteína o ácido nucleico de hOAT se refiere a la ausencia de uno o más de los polipéptidos o ácido nucleicos normales humanos encontrados en asociación con hOAT en su entorno natural, y no implica necesariamente que el hOAT se purifique a ningún grado libre de proteínas que no son hOAT. Como hOAT normalmente se encuentra en la membrana celular, es preferible recuperar hOAT recombinante como preparación de membrana; de otro modo la función de hOAT puede alterarse. En cualquier caso, muchas utilidades de hOAT no requieren la purificación de la proteína; los ensayos de exploración para agonistas o antagonistas se realizan mejor en células huésped intactas.

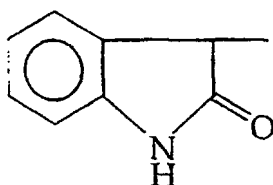
Los polipéptidos hOAT o sus fragmentos opcionalmente se preparan *in vitro*, especialmente si son relativamente pequeños, por ejemplo del orden de aproximadamente 30 restos o menos. Por ejemplo, los hOAT se preparan por síntesis usando procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida convencionales como se describe por Merrifield "J. Am. Chem. Soc." 85:2149 (1963). Éstos después se ligan juntos por el uso de la péptido ligasa (proteólisis inversa). También se usan procedimientos *in vitro* de síntesis de proteínas para preparar hOAT sin la necesidad de cultivo de células recombinantes. Dichos procedimientos son útiles para preparaciones a pequeña escala, y tienen la ventaja de reducir el posible efecto sobre los rendimientos de las proteasas de la célula huésped. La síntesis de la proteína hOAT *in vitro* tiene una ventaja adicional bastante sustancial porque permite la introducción específica de sitio en el hOAT de un resto aminoacídico de origen no natural. Por consiguiente, cuando se usa la expresión "resto aminoacídico" en este documento (en relación a la modificación de hOAT por sustitución o inserción, especialmente por un único aminoácido) se entenderá que el aminoácido no se limita a los restos de origen natural asociados con ARNt nativos.

El aminoacil ARNt se prepara de forma eficaz usando una diversidad de restos aminoacídicos de origen no natural ("origen no natural" significa no encontrado de forma natural en proteínas, aunque el aminoácido puede encontrarse en otro sitio en la naturaleza). Como el ARNt se selecciona para incorporarse a un codón no reconocido por ninguno de los ARNt habitualmente implicados en la síntesis de proteínas, el resto aminoacídico de origen no natural seleccionado se incorpora solamente en el sitio particular en la secuencia de hOAT elegida para el codón único. Por tanto, en estos casos el hOAT se codifica por un ácido nucleico que tiene un codón sin sentido, por ejemplo, UAG, en el sitio de inserción o sustitución único.

Los aminoácidos de origen no natural adecuados se describen por ejemplo en Greenstein y col., "Chemistry of the Amino Acids" Vols. 1-3, 1986. En general, se usarán L-aminoácidos farmacéuticamente inocuos que se encuentran en la naturaleza pero habitualmente no se incorporan en proteínas. Dichos aminoácidos típicamente estarán estructuralmente relacionados con un resto de origen natural que produce el efecto deseado en un sitio dado y se usará para resolver adicionalmente y optimizar la propiedad deseada del hOAT.

Los hOAT de esta invención también incluyen hOAT que se han sustituido por un resto no peptídico, para propósitos de preparar el hOAT para que comience con o como una modificación posterior del hOAT preparado por sustitución, inserción o delección de aminoácidos como se describe en otra parte de este documento. La modificación covalente puede conseguir esencialmente el mismo objetivo que el mutante dirigido al sitio en la misma localización usando un resto de origen natural.

El triptófano es un aminoácido relativamente raro en hOAT. Por consiguiente, este resto es un sitio atractivo para la modificación covalente post-traducciona porque se espera que la sustitución en otros sitios sea menor que la que puede ser en el caso con restos más comunes. La reacción de trp con un oxidante tal como un donante halógeno, por ejemplo bromo, producirá la estructura de cadena lateral



Esta reacción debe realizarse en disolvente acuoso y a bajas concentraciones de halógeno.

Serán evidentes otras modificaciones covalentes de hOAT para los especialistas en la técnica. Las cadenas laterales sensibles se protegen enmascarándolas con anticuerpos dirigidos contra un epítipo que incluye el resto a proteger. Son bien conocidos los reactivos para conseguir dichas modificaciones y se han usado ampliamente en los campos de diagnóstico y preparativo. Véase T. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 1983.

Los hOAT se entrecruzan con una matriz insoluble en agua o se incorporan en un vehículo lipídico tal como un liposoma, habitualmente un ULV. El entrecruzamiento se consigue haciendo reaccionar el hOAT y la matriz con un agente bifuncional. Los ejemplos de agentes bifuncionales adecuados incluyen 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-destiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-*N*-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(*p*-azidofenil)ditio]propioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Como alternativa, el hOAT se inmoviliza en matrices insolubles en agua reactivas tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en los documentos U.S. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440.

Los hOAT también se modifican covalentemente uniendo los hOAT a diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, del modo expuesto, por ejemplo, en los documentos U.S. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. El PEG es un polímero no inmunogénico, lineal, no cargado con tres moléculas de agua por unidad de óxido de etileno. Véase Maxfield, y col., "Polymer" 16:505-509 (1975); Bailey, F. E. y col., en "Nonionic Surfactants", Schick, M. J., ed, pág. 794-821 (1967). Se han conjugado varias enzimas terapéuticas a PEG para aumentar su semi-vida *in vivo* (Abuchowski, A., y col., "J. Biol. Chem." 252:3582-3586 (1977); Abuchowski, A. y col., "Cancer Biochem. Biophys." 7:175-186 (1984). Se ha informado de un conjugado IL-2 (interleuquina-2)-PEG para aumentar la vida en circulación y la potencia (Katre, N.V. y col., "Proc. Natl. Acad. Sci." 84:1487-1491 (1987); Goodson, R. y col., "Bio/Technology" 8:343-346 (1990)). Véase también Abuchowski, A. y col., "J. Biol. Chem." 252:3578-3581 (1977). Cualquiera de los procedimientos para la conjugación de PEG usado en estas citas es aceptable para su uso con los hOAT de esta invención.

Usos para los hOAT de esta invención

Los hOAT de esta invención se usan en procedimientos terapéuticos, de diagnóstico y preparatorios. Su uso dependerá de las propiedades que tienen, como será evidente para los especialistas en la técnica. Para la mayor parte, todos

los hOAT retendrán epítopes inmunes de hOAT, de modo que son útiles en lugar de hOAT en inmunoensayos de hOAT tengan o no cualquier actividad de transporte de aniones.

Los hOAT de esta invención son útiles para identificar sustancias que se unan a hOAT (compañeros de unión a hOAT, o "TBP"). Son de particular interés las sustancias que son capaces de unirse a hOAT para inhibir sustancialmente la actividad de transporte de aniones de hOAT o, preferiblemente, para introducir selectividad favorable en la actividad de transporte de modo que fármacos nefrotóxicos tales como anfotericina o cidofovir no se capten con tanta avidez como en ausencia de la sustancia. La capacidad del TBP de unirse a hOAT también es útil en procedimientos para recuperar hOAT de mezclas contaminadas tales como sobrenadantes de cultivo celular de células que expresan hOAT recombinante (incluyendo los hOAT de la secuencia de aminoácidos de hOAT de este documento). Típicamente, los hOAT pueden usarse en lugar de patrones de hOAT en inmunoensayos para hOAT si tienen al menos un epítopo de hOAT reconocido por el anticuerpo usado en el inmunoensayo de hOAT en cuestión, mientras que los TBP se usan en lugar de anticuerpos para hOAT. Los hOAT también son útiles, según sea apropiado, en ensayos funcionales para ciertas propiedades individuales de hOAT.

Los TBP peptídicos se obtienen por el uso de procedimientos evolutivos dirigidos *in vitro* tales como los que emplean fagos filamentosos para presentar secuencias candidatas (conocido de otro modo como presentación de fagos) y procedimientos similares conocidos *per se* que dependen de la generación sistemática y exploración de péptidos para la actividad. Éstos típicamente son moléculas bastante pequeñas, que contienen del orden de aproximadamente 5 a 20 restos.

Los TBP de anticuerpo son inmunoglobulinas, habitualmente anticuerpos monoclonales, que (en realizaciones preferidas) son capaces de inhibir específicamente la función de transporte de hOAT. Los anticuerpos se crean de un modo convencional inmunizando un animal con un conjugado hOAT inmunogénico, por ejemplo, hOAT entrecruzado con hemocianina de lapa californiana.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir los anticuerpos individuales que comprende la población son esencialmente idénticos en especificidad y afinidad. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes (por ejemplo, anticuerpos "humanizados") independientemente de la especie de origen o la designación de la clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv). Por tanto, se producen anticuerpos "monoclonales" por cualquier procedimiento particular que produzca una población sustancialmente homogénea. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando los procedimientos descritos por Kohler y Milstein, "Nature" 256:495 (1975), Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (1986), Kozbor, "J. Immunol." 133: 3001 (1984), o Brodeur, y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (1987), o pueden prepararse por procedimientos de ADN recombinante. Cabilly, y col., Patente de Estados Unidos N° 4.816.567.

En una realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad por hOAT de secuencia de referencia de al menos aproximadamente 10⁹ moles/litro, como se determina, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, "Anal. Biochem." 107:220 (1980). Además, el anticuerpo monoclonal típicamente inhibirá la actividad de transporte de hOAT (usando un anión orgánico convencional tal como *para*-aminohipurato) en al menos aproximadamente un 50%, preferiblemente más del 80%, y más preferiblemente más del 90%, como se determina por procedimientos convencionales.

El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se introducen por transfección en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

El ADN opcionalmente puede modificarse para cambiar el carácter de la inmunoglobulina producida por su expresión. Por ejemplo, se producen formas humanizadas de anticuerpos murinos sustituyendo una región determinante de complementariedad (CDR) del dominio variable del anticuerpo murino por la región correspondiente de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, los restos aminoacídicos de la región flanqueante seleccionada (FR) del anticuerpo murino también se sustituyen por los restos aminoacídicos correspondientes en el anticuerpo humano. Las formas humanizadas de anticuerpos murinos también pueden producirse sustituyendo la secuencia codificante de los dominios de cadena constante pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas. Morrison, y col., "PNAS" 81:6851 (1984).

El TBP también incluye secuencias de ácido nucleico que se unen al hOAT. Se conocen bien procedimientos de selección evolutiva para oligonucleótidos que se unen a proteínas diana (documento WO 92/14843; Ellington y col., "Nature" 355:850 (1992); Bock y col., "Nature" 355:564 (1992); Ellington y col., "Nature" 346:818 (1990); Tuerk y col., "Science" 249:505 (1990)). Estos oligonucleótidos, habitualmente conocidos como aptámeros, generalmente contienen las bases habituales A, T, G, C o U o derivados de las mismas, y comprenden secuencias que se unen a un sitio predeterminado en la proteína diana. Un procedimiento de selección para TBP que inhiben la función de transpor-

te de hOAT comprende (a) preparar una combinación de candidatos (oligonucleótidos, péptidos, extractos, proteínas, etc.), (b) poner en contacto los candidatos con hOAT que tiene actividad de transporte de aniones (típicamente hOAT de secuencia de referencia) (c) aislar del hOAT los candidatos que son capaces de unirse a hOAT, (d) poner en contacto los candidatos de la etapa c) con un hOAT en el que la función de transporte de hOAT se ha mutado sustancialmente del hOAT, y (e) recuperar los candidatos que no se unen a la forma mutada.

Para aplicaciones de diagnóstico, los hOAT de esta invención opcionalmente se marcan con un resto detectable, *in vivo* o *in vitro*. El resto detectable puede ser cualquier sustituyente que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; un marcador isotópico radiactivo, tal como, ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , o ^3H , o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano rusticano.

Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica *per se* para conjugar el hOAT al resto detectable. Véanse los procedimientos descritos *supra* y Hunter, y col., "Nature" 144:945 (1962); David, y col., "Biochemistry" 13:1014(1974); Pain, y col., "J. Immunol. Meth." 40:219 (1981); y Nygren, J. "Histochem. and Cytochem." 30:407 (1982). Los TBP oligonucleotídicos se marcan del modo convencional hasta ahora empleado en la técnica de sondas de diagnóstico.

Los TBP o hOAT de la presente invención opcionalmente se emplean en técnicas de inmunoensayo conocidas, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág. 147-158 (1987).

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado (que puede ser hOAT, o una parte inmunológicamente reactiva del mismo tal como un hOAT marcado de esta invención) de competir con la muestra de ensayo hOAT por la unión con una cantidad limitada de TBP. La cantidad de hOAT en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que llega a unirse al TBP. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que llega a unirse, el TBP generalmente se insolubiliza antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que se unen al TBP se separan convenientemente del patrón y el analito que permanecen no unidos.

Los ensayos tipo sándwich implican el uso de dos TBP, cada uno capaz de unirse a una proteína diana diferente, o epítipo, de hOAT. En un ensayo tipo sándwich, la muestra de ensayo analito se une por un primer TBP que está inmovilizado en un soporte sólido, y después de ello un segundo TBP se une al analito, formando de este modo un complejo de tres partes insoluble. David y Greene, Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede por si mismo estar marcado con un resto detectable (ensayos tipo sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-TBP que está marcado con un resto detectable (ensayo tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo tipo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Los TBP de esta invención también son útiles para la formación de imágenes *in vivo*, donde un TBP marcado con un resto detectable se administra a un huésped, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y se ensaya la presencia y localización del TBP marcado en el huésped.

También pueden usarse ácido nucleicos de hOAT o TBP en un procedimiento para identificar isoformas o alelos de ácidos nucleicos o polipéptidos de hOAT que sitúan a un paciente en riesgo particular de nefrotoxicidad. Dichas variantes, alelos o isoformas mostrarán diferente selectividad hacia la captación de ciertos aniones. Si estos aniones son fármacos nefrotóxicos o metabolitos de fármacos, entonces un paciente puede estar en particular riesgo de lesión. El paciente puede ensayarse (por ejemplo, amplificando el ADN que codifica hOAT genómico a partir de una muestra sanguínea) para determinar si está presente la variante, isoforma o alelo en riesgo. Si lo está, entonces la dosificación del fármaco puede reducirse o se usa un fármaco alternativo. Este procedimiento comprende identificar una o más variaciones de secuencia de origen natural en la población humana y determinar la selectividad de dichas variaciones para el transporte de una sustancia nefrotóxica seleccionada. Entonces un paciente se ensaya para la variación asociada al transporte relativamente selectivo de la sustancia nefrotóxica.

Asimismo, puede analizarse una variación alélica en las regiones de control transcripcional del gen de hOAT para la correlación con la susceptibilidad a la captación y transporte de fármacos nefrotóxicos seleccionados; aquí la correlación será con la cantidad de expresión de hOAT en oposición a la selectividad de la proteína hOAT. Este procedimiento comprende identificar una o más variaciones de secuencia de origen natural en el dominio de control de expresión de hOAT en la población humana y determinar los niveles de expresión de hOAT en células que contienen dicha variante. Los pacientes que tienen niveles relativamente elevados de expresión de hOAT pueden no considerarse adecuados para el tratamiento con fármacos nefrotóxicos, o la dosificación de dichos fármacos puede reducirse.

El hOAT también es útil en procedimientos de exploración para compuestos que pueden funcionar suprimiendo o potenciando la captación y el transporte de aniones por hOAT. La supresión de la actividad hOAT (antagonismo) es útil para reducir la nefrotoxicidad de fármacos, es decir, para servir como agentes nefroprotectores, mientras que la potenciación de la actividad hOAT (agonismo) es útil en el tratamiento de la disfunción renal. Los procedimientos de exploración comprenden proporcionar un candidato agonista o antagonista de hOAT, poner en contacto el candidato con ácido nucleico o polipéptido de hOAT, determinar el efecto del candidato sobre la transcripción del ácido nucleico

de hOAT (o la expresión o actividad biológica del polipéptido hOAT), identificar un agonista o antagonista de hOAT, y opcionalmente preparar cantidades adicionales del agonista o antagonista que así se ha identificado. La actividad biológica de hOAT se ensaya usando la línea celular estable del Ejemplo 1 como se muestra en el Ejemplo 2.

- 5 El hOAT es útil en ensayos de exploración para formas modificadas de fármacos nefrotóxicos hasta ahora, o como parte de un programa de exploración de toxicología para determinar la nefrotoxicidad potencial de nuevos compuestos terapéuticos. La acumulación del candidato en transformantes hOAT en oposición a células de control es un indicio de nefrotoxicidad potencial. La determinación de las CC_{50} usando los transformantes hOAT produciría una medida directa de nefrotoxicidad potencial. Se pone en contacto una forma candidata de un compuesto sospechoso o un
- 10 fármaco nefrotóxico conocido, por ejemplo, un profármaco, con el hOAT y se determina su efecto sobre el transporte por hOAT de un anión de punto de referencia. También puede determinarse el transporte del propio compuesto de ensayo (habitualmente en una forma isotópicamente marcada). Como alternativa, puede ensayarse el transporte del compuesto en presencia de probenecid. Si el compuesto ya no se transporta, o el transporte del anión de punto de referencia no está afectado por el compuesto, o el probenecid no tiene influencia sobre si el compuesto se transporta o
- 15 no, entonces el candidato es adecuado para estudio adicional en animales como un fármaco no nefrotóxico potencial, por ejemplo, en el caso de un profármaco como una forma no nefrotóxica del fármaco precursor. Los profármacos de análogos fosfonato nucleotídicos tales como cidofovir, PMEA o PMPA adecuados para ensayo incluyen mono y di-ésteres y amidatos del grupo fosfonilo.

20 Ejemplo 1

Generación de una línea celular transformada de forma estable con el gen hOAT1

- Se preparó una línea celular que expresa de forma estable hOAT1 y se caracterizó para demostrar finalmente que
- 25 el ADNc aislado codifica la proteína hOAT1 funcional.

- La construcción de expresión que contiene el gen hOAT1 se preparó del siguiente modo. La secuencia codificante de hOAT1 se amplificó por PCR a partir de un plásmido aislado de una biblioteca de ADNc de riñón humano. La reacción de PCR se realizó en condiciones convencionales usando el sistema de PCR de Alta Fidelidad Expand (Boehringer Mannheim). Se usaron los oligonucleótidos 5'-ACCGTCTAGAATTCTTTTATTTTAAATTTCTTTCAAA
- 30 TACGTCCACCATGGCCTTAAATGACCTCCTGCAGCAGG-3' (SEC ID N° 3) y 5'-TACTCACGTGGATCCTGAT CAGACGTCTGTAGGACCTTCCCTCCCTTTAGG-3' (SEC ID N° 4) como cebador con sentido y antisentido para introducir el sitio de restricción EcoRI y BamHI, respectivamente. Además, el cebador con sentido contenía una secuencia 5' no traducida truncada del virus del mosaico de la alfalfa (subrayado) y la secuencia consenso Kozak favorable (CCACCATGG) (SEC ID N° 5) para maximizar el inicio de la traducción. El producto de PCR se digirió
- 35 con EcoRI/BamHI y se clonó en el vector de expresión pIRESneo (CLONTECH, Palo Alto, CA) usando los sitios de restricción correspondientes para producir el plásmido pIRES-hOAT. Después de la clonación, se verificó la secuencia de nucleótidos correcta del fragmento completo generado por PCR.

- 40 El plásmido pIRES-hOAT se introdujo por transfección en células CHO-K1 (ATCC CCL61) cultivándolas en mezcla nutritiva F-12 suplementada con suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, y 100 μ g/ml de estreptomycin. Unas 24 horas antes de la transfección, se sembraron aproximadamente 6×10^6 células CHO-K1 en una placa Petri de 100-mm. En el momento de la transfección, los medios se aspiraron y se añadieron 6 ml de medios recientes que contenían 12 μ g de pIRES-hOAT y 60 μ g de lípido catiónico Cytofectin GSV (Glen Research, Sterling, VA) a las células.
- 45 Después de incubación durante una noche, comenzó la selección de transformantes estables en mezcla nutritiva F-12 libre de rojo fenol que contiene suero bovino fetal, penicilina y estreptomycin como anteriormente, más 1 mg/ml de G418 (CLONTECH). Las colonias viables se aislaron después de 2 semanas de selección y se ensayaron para la captación de ácido *p*-aminohipúrico (PAH, un sustrato prototipo de sistemas de transporte de aniones orgánicos) en presencia y ausencia de probenecid (inhibidor del transporte de aniones orgánicos). Para el ensayo de captación de
- 50 PAH, las células se exploraron en placas de 12 pocillos a la densidad de 2×10^5 células/pocillo. Después de 48 horas, se aspiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). El ensayo de captación se realizó en tampón de transporte (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM, $MgSO_4$ 0,8 mM, glucosa 28 mM, y HEPES 13 mM pH 7,2) que contenía [3H]PAH 5 μ M (New England Nuclear, actividad espec. 1,2 Ci/mmol) $\pm$ probenecid 1 mM. Después de 90 min. de incubación a 37°C en el tampón de trans-
- 55 porte, las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado en hielo (2 ml/pocillo) y se lisaron directamente en la placa en presencia de Triton X-100 al 0,3% (0,5 ml/pocillo) durante 20 min. a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con 0,5 ml/pocillo adicionales de Triton X-100, el lisado y el lavado se combinaron, se añadió fluido de centelleo, y se contó la radiactividad. Como resultado de este ensayo, se identificó un clon transformado con un factor de aumento de 30 en la captación de PAH en comparación con células CHO-K1 parentales y se denominó CHO-hOAT.

60 Ejemplo 2

Caracterización funcional de hOAT1

- 65 Se caracterizó la cinética de la captación de PAH mediada por hOAT1 usando células CHO-hOAT. El ensayo de captación se realizó como se ha descrito anteriormente con diversas concentraciones de [3H]PAH que varían de 5 a 160 μ M. Para evaluar la captación específica de hOAT1 neta, se sustrajo la captación de fondo medida en células CHO-K1 parentales en cada concentración de sustrato de la determinada en células CHO-hOAT. Las constantes cinéticas se

calcularon usando el software Enzyme kinetics (ChemSW, Fairfield, CA). Como se esperaba, la captación de PAH en células CHO-hOAT era saturable con $K_m = 13 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 42 \text{ pmol}/10^6 \text{ células}$. En oposición a la captación de fondo de PAH en células CHO-K1, la captación en células CHO-hOAT era fuertemente sensible a probenecid con $\text{CI}_{50} = 6,2 \mu\text{M}$ cuando se media a una concentración de PAH igual a su K_m . Además, la acumulación de PAH en CHO-hOAT se estimuló aproximadamente 2,5 veces precargando las células con glutarato 10 mM lo que indica que la proteína hOAT funciona como un intercambiador de aniones orgánicos/dicarboxilato.

Ejemplo 3

10 Distribución tisular de hOAT1

Se usó una transferencia de Northern de múltiples tejidos humanos (CLONTECH) para la localización de la expresión de hOAT1 en tejidos humanos. Se generó una sonda marcada con [^{32}P]dATP específica para hOAT1 por cebado aleatorio del fragmento de ADN BsrGI/Bsu36I correspondiente a los nucleótidos 420-854 de la secuencia codificante de hOAT1. La membrana se hibridó durante 1 hora a 68°C en tampón de hibridación ExpressHyb (CLONTECH) y después se lavó dos veces en 2 X SSC con SDS al 0,05% durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de un único lavado en 0,1 X SSC con SDS al 0,1% a 50°C . Se detectó una fuerte señal en el riñón correspondiente a un transcrito de hOAT1 de 2,5 kb. No se encontró señal positiva en los demás tejidos ensayados (cerebro, corazón, músculo esquelético, colon, timo, bazo, intestino delgado, placenta, pulmón, o leucocitos de sangre periférica).

Además, se examinó la expresión de hOAT1 en diversos tejidos humanos por amplificación de RT-PCR más sensible. Para este propósito, se usaron los kits de ADNc de Múltiple Elección I y II que contienen ADNc específicos de tejido (Origene Technologies, Rockville, MD) y dos conjuntos de cebadores específicos para hOAT1 para la detección por PCR de la expresión de hOAT1. Se usaron los oligonucleótidos, 5'-CCCGCTGGCACTCCTCCTCCGGGAG-3' (SEC ID N° 6) (con sentido), y 5'-GTAGAGCTCGGCAGTCATGCTCACCA-3' (SEC ID N° 7) (antisentido), para amplificar un fragmento de 606 pb de la región codificante de hOAT1 (nucleótidos 815-1420). En el conjunto independiente de las reacciones de PCR, se amplificó un fragmento de hOAT1 de 295 pb (compuesto por los últimos 175 nucleótidos codificantes y 120 nucleótidos de 3'-UTR) usando los oligonucleótidos, 5'-CCAGCGCTGTCACTGTCCTCCTGC-3' (SEC ID N° 8) (con sentido), y 5'-AACCCCCACACTTGGGTCACCATTTCCTC-3' (SEC ID N° 9) (antisentido). Las reacciones de PCR se realizaron usando el sistema de PCR de Alta Fidelidad Expand (Boehringer Mannheim) en un volumen total de $25 \mu\text{l}$ que contenía $1 \mu\text{g}$ de ADNc específico de tejido. Se realizaron treinta y cinco ciclos de amplificación (95°C durante 40 s, 58°C durante 1 min., y 72°C durante 45 s). Se identificaron tejidos positivos después de la separación de las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1%. Como se esperaba, se detectó coherentemente una fuerte señal positiva en el riñón. En contraste con el análisis de Northern, el cerebro y el músculo esquelético también fueron positivos para la expresión de hOAT1 aunque a menor grado en comparación con el riñón.

Se verificó la presencia de la proteína hOAT en tejido de riñón humano por un análisis de inmunotransferencia con anticuerpo policlonal de conejo anti-hOAT1 preparado en AnaSpec (San Jose, CA) usando técnicas inmunológicas convencionales. En resumen, se conjugó un péptido inmunogénico, $\text{NH}_2\text{-TVQDLESRKQKQTR-COOH}$ (SEC ID N° 10), correspondiente a los aminoácidos 515-528 de hOAT1 con hemocianina de lapa californiana a través de un resto de cisteína añadido al extremo C-terminal del péptido. Se recogió suero animal después de 4 inmunizaciones en presencia de adyuvante completo de Freund y se purificó por afinidad frente al péptido inmunogénico inmovilizado en una resina de Sepharose. Para el análisis de inmunotransferencia, se extrajo corteza de riñón humano con un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato al 0,5%, y SDS al 0,1%. Después de homogeneización en presencia de cóctel inhibidor de proteinasa completo (Boehringer Mannheim) el extracto se aclaró por centrifugación a alta velocidad, se separó por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% y se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). La membrana se bloqueó en PBS/leche en polvo al 5% (PBS-M) durante 1 hora, se lavó 3 veces en PBS/Tween 20 al 0,05% (PBS-T), y se incubó durante una noche en PBS-M con el anticuerpo anti-hOAT. Después de lavar en PBS-T, la membrana se incubó en PBS-M con anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (Zymed, South San Francisco, CA). Después de un lavado adicional e incubación con un sustrato quimioluminiscente (Amersham, Arlington Heights, IL), la inmunotransferencia se expuso a una película de rayos X. El anticuerpo reconoció un producto heterogéneo con un peso molecular aparente de 80 a 90 kDa. Esto era significativamente mayor que el peso molecular predicho de la secuencia de aminoácidos de hOAT1 (60,3 kDa). Sin embargo, cuando el extracto de la corteza se trató con péptido:N-glicosidasa F, que escinde específicamente cadenas de oligosacáridos unidas a N, se detectó un producto homogéneo de 60 kDa en la inmunotransferencia.

Ejemplo 4

60 Determinación del Potencial Nefrotóxico por Ensayo de Cultivo Celular Usando Transformantes hOAT

El adefovir (ADV) es un análogo nucleotídico anti-VIH con un perfil de resistencia único que actualmente está experimentando evaluación clínica de Fase III. La toxicidad clínica más importante de ADV es la nefrotoxicidad asociada con cambios en marcadores de laboratorio de funciones renales. ADV es un sustrato para el transportador renal humano de aniones orgánicos 1 (hOAT) localizado en la membrana basolateral de los túbulos contorneados proximales. En este ejemplo, se investigó el papel de hOAT en el mecanismo de nefrotoxicidad de ADV.

ES 2 294 863 T3

Se transformaron de forma estable células de ovario de hámster chino (CHO), que muestran baja sensibilidad a citotoxicidad por ADV debido a su captación limitada, con ADNc de hOAT para generar células CHO-hOAT como se ha descrito anteriormente. Se comparó la captación y la citotoxicidad de ADV en las dos líneas celulares.

Las CHO-hOAT acumularon ADV a niveles >300 veces mayores en comparación con CHO. La captación de ADV por CHO-hOAT era saturable ($K_m = 23 \mu M$, $V_{max} = 390 \text{ pmol}/10^6 \text{ células}$) y sensible al inhibidor de hOAT probenecid (PBC; $CI_{50} = 6,5 \mu M$). Es importante observar que, ADV era 500 veces más citotóxico en CHO-hOAT en comparación con células CHO. Sin embargo, en presencia de PBC 1 mM, las CHO-hOAT eran solamente 3 veces más susceptibles a ADV que lo eran las CHO. Otro nucleótido antiviral, cidofovir (CDV), pero no su profármaco cíclico (cCDV), también se acumulaba de forma eficaz en CHO-hOAT ($K_m = 70 \mu M$, $V_{max} = 1.110 \text{ pmol}/10^6 \text{ células}$). Por consiguiente, CDV era >400 veces más tóxico en CHO-hOAT en comparación con CHO. En contraste, la citotoxicidad de cCDV aumentó a un grado mucho menor en células CHO-hOAT correspondiente con la ausencia de nefrotoxicidad por cCDV. Similar a ADV, la citotoxicidad de CDV también se redujo significativamente por PBC.

La expresión de hOAT potencia la citotoxicidad de ADV. Como la expresión de alto nivel de hOAT es específica de los túbulos renales, hOAT desempeña un papel crucial en el mecanismo de nefrotoxicidad de ADV. Por tanto, los inhibidores de hOAT (por ejemplo, PBC) pueden ser útiles para superar la nefrotoxicidad por ADV. Las observaciones con CDV y cCDV se correlacionan con su potencial nefrotóxico y proporcionan apoyo a la implicación de hOAT en este proceso.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de exploración que comprende proporcionar un candidato agonista o antagonista de hOAT, poner en contacto el candidato con un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2, o poner en contacto el candidato con una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido, determinar el efecto del candidato sobre la transcripción del ácido nucleico o la expresión o actividad biológica del polipéptido, identificar un agonista o antagonista de hOAT a partir de los candidatos, y opcionalmente preparar cantidades adicionales del agonista o antagonista así identificado.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia que codifica el polipéptido es la secuencia codificante de hOAT representada en la SEC ID N° 1.

3. Un procedimiento que comprende identificar uno o más alelos y/o isoformas de la secuencia de hOAT en seres humanos individuales y determinar si dichos alelos o isoformas se correlacionan o no con la nefrotoxicidad de un fármaco seleccionado en seres humanos individuales, en el que el hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

4. Un procedimiento que comprende identificar una variación de secuencia nucleica en la secuencia codificante de hOAT, dominios de control de la expresión de hOAT o secuencias de corte y empalme de ARN de hOAT en seres humanos individuales y determinar si dicha variación se correlaciona o no con la nefrotoxicidad de un fármaco seleccionado en seres humanos individuales, en el que el hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

5. Un procedimiento que comprende proporcionar una forma modificada covalentemente de un análogo fosfonato nucleotídico y determinar si el análogo se transporta o no por hOAT, en el que el hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el análogo fosfonato nucleotídico es un derivado de PMEAs, cidofovir o PMPA.

7. Un procedimiento que comprende identificar una interacción fármaco-fármaco poniendo en contacto un fármaco candidato con hOAT y al menos un segundo fármaco cuyo efecto sobre el transporte mediado por hOAT del fármaco candidato tiene que determinarse, y analizar el efecto del segundo o más fármacos sobre el transporte mediado por hOAT del fármaco candidato, en el que el hOAT es un polipéptido aislado que es capaz de transportar aniones orgánicos y comprende la secuencia de hOAT de la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la SEC ID N° 2.

ES 2 294 863 T3

TTCTGCGCTGACCCCAAGTGAGGAGAAGCTGCAAGGGAAAAGGGAGGGACAGATCAG 60
 GGAGACCGGGGAAGAAGGAGGACGAGCCAAGGAGGCTGCTGTCCCCCACAGAGCAGCTC 120
 GGACTCAGCTCCCGGGAAGCAACCCAGCTGCGGAGGCAACGGCAGTGCTGCTCCTCCAGC 180
 GAAGGACAGCAGGCAGGCAGACAGACAGAGGTCTGGGACTGGAAGGCCTCAGCCCCCAG 240
 CCACTGGGCTGGGCTGGCCCAATGGCCTTTAATGACCTCCTGCAGCAGGTGGGGGGTGT 300
 M A F N D L L O O V G G V
 CGGCCGCTTCCAGCAGATCCAGGTCACCCTGGTGGTCTCTCCCCTGCTCCTGATGGCTTC 360
 G R F O O I O V T L V V L P L L L M A S
 TCACAACACCTGCAGAACTTCACTGCTGCCATCCCTACCCACCACTGCCGCCCGCTGC 420
 H N T L O N F T A A I P T H H C R P P A
 CGATGCCAACCTCAGCAAGAACGGGGGGCTGGAGGTCTGGCTGCCCCGGGACAGGCAGGG 480
 D A N L S K N G G L E V W L P R D R O G
 GCAGCCTGAGTCTGCTCGCTTCACCTCCCCGCAGTGGGGACTGCCCTTTCTCAATGG 540
 O P E S C L R F T S P Q W G L P F L N G
 CACAGAAGCCAATGGCACAGGGGCCACAGAGCCTGCACCGATGGCTGGATCTATGACAA 600
 T E A N G T G A T E P C T D G W I Y D N
 CAGCACCTTCCCATCTACCATCGTGACTGAGTGGGACCTTGTGTGCTCTCACAGGGCCCT 660
 S T F P S T I V T E W D L V C S H R A L
 ACGCCAGCTGGCCAGTCTTGTACATGGTGGGGGTGCTGCTCGGAGCCATGGTGTTCGG 720
 R O L A O S L Y M V G V L L G A M V F G
 CTACCTTGCAGACAGGCTAGGCCGCCGGAAGGTACTCATCTTGAACCTACCTGCAGACAGC 780
 Y L A D R L G R R K V L I L N Y L O T A

FIG. 1-1

ES 2 294 863 T3

TGTGTCAGGGACCTGCGCAGCCTTCGGCACCCAACTTCCCCATCTACTGGGCTTCCGGCT	840
V S G T C A A F A P N F P I F C A F R L	
CCTCTCGGGCATGGCTCTGGCTGGCATCTCCCTCAACTGCATGACACTGAATGTGGAGTG	900
L S G M A L A G I S L N C M T L N V E W	
GATGCCCATTCACACACGGGCCTGCGTGGGCACCTTGATTGGCTATGTCTACAGCCTGGG	960
M P I H T R A C V G T L I G Y V Y S L G	
CCAGTTCTCTCTGGCTGGTGTGGCTACGCTGTGCCCCACTGGCGCCACCTGCAGCTACT	1020
O F L L A G V A Y A V P H W R H L D L L	
GGTCTCTGGCCCTTTTTTGCCTTCTTCATCTACTCTGGTTCTTCATTGAGTCGGCCCG	1080
V S A P F F A F F I Y S W F F I E S A R	
CTGGCACTCCTCCTCCGGGAGGCTGGACCTCACCTGAGGGCCCTGCAGAGAGTCGCCCCG	1140
W H S S S G R L D L T L R A L O R V A R	
GATCAATGGGAAGCGGGAAGAAGGAGCCAAATTGAGTATGGAGGTACTCCGGGCCAGTCT	1200
I N G K R E E G A K L S M E V L R A S L	
GCAGAAGGAGCTGACCATGGGCAAAGGCCAGGCATCGGCCATGGAGCTGCTGCGGTGCCC	1260
O K E L T M G K G O A S A M E L L R C P	
CACCTCCGCCACCTCTTCCTCTGCCTCTCCATGCTGTGGTTTGCCACTAGCTTTGCATA	1320
T L R H L F L C L S M L W F A T S F A Y	
CTATGGGCTGGTCATGGACCTGCAGGGCTTTGGAGTCAGCATCTACCTAATCCAGGTGAT	1380
Y G L V M D L O G F G V S I Y L I O V I	
CTTTGGTGCTGTGGACCTGCCTGCCAAGCTTGTGGGCTTCTTGTCATCAACTCCCTGGG	1440
F G A V D L P A K L V G F L V I N S L G	
TCGCCGGCCTGCCAGATGGCTGCACTGCTGCTGGCAGGCATCTGCATCCTGCTCAATGG	1500
R R P A Q M A A L L L A G I C I L L N G	
GGTGATACCCAGGACCAGTCCATTGTCCGAACCTCTCTTGCTGTGCTGGGGAAGGGTTG	1560
V I P Q D Q S I V R T S L A V L G K G C	

FIG. 1-2

ES 2 294 863 T3

TCTGGCTGCCTCCTTCAACTGCATCTTCCTGTATACTGGGGAACGTGTATCCCAATGAT
 L A A S F N C I F L Y T G E L Y P T M I 1620
 CCGGCAGACAGGCATGGGAATGGGCAGCACCATGGCCCGAGTGGGCAGCATCGTGAGCCC
 R O T G M G M G S T M A R V G S I V S P 1680
 ACTGGTGAGCATGACTGCCGAGCTCTACCCCTCCATGCCTCTCTTCATCTACGGTGCTGT
 L V S M T A E L Y P S M P L F I Y G A V 1740
 TCCTGTGGCCGCCAGCGCTGTCACTGTCTCCTGCCAGAGACCCTGGGCCAGCCACTGCC
 P V A A S A V T V L L P E T L G O P L P 1800
 AGACACGGTGCAGGACCTGGAGAGCAGGAAAGGGAAACAGACGCGACAGCAACAAGAGCA
 D T V Q D L E S R K G K O T R O O O E H 1860
 CCAGAAGTATATGGTCCCCTGCGAGGCCTCAGCACAAGAGAAGAATGGACTCTGAGGACT
 Q K Y M V P L Q A S A O E K N G L 1920
 GAGAAGGGGCCTTACAGAACCTAAAGGGAGGGAAGGTCCTACAGGTCTCCGGCCACCCA
 1980
 CACAAGGAGGAGGAAGAGGAAATGGTGACCCAAGTGTGGGGGTTGTGGTTCAGGAAAGCA
 2040
 TCTTCCCAGGGGTCCACCTCCCTTTATAAACCCACCAGAACCACATCATTAAAAGGTTT
 2100
 GACTGCGAAAAAAAAAAAAAAAAA
 → 2123

FIG. 1-3

ES 2 294 863 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GILEAD SCIENCES, INC. y col.

5 <120> NUEVO GEN QUE CODIFICA TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS

<130> 240.1FPCT

10 <140> PCT/US99/13172

<141> 10-06-1999

15 <150> 60/088.864

<151> 11-06-1998

<150> 60/132.267

20 <151> 03-05-1999

<160> 10

25 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2123

30 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

35 <223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.

<220>

<221> CDS

40 <222>(263)..(1912)

<400> 1

45 ttcctgccct gacccccaaa gtgaggagaa gctgcaaggg aaaagggagg gacagatcag 60

 ggagaccggg gaagaaggag gacgagccaa ggaggctgct gtccccccac agagcagctc 120

50 ggactcagct cccgggaagc aaccagctg cggaggcaac ggagtgctg ctctccagc 180

55 gaaggacagc aggcaggcag acagacagag gtcctgggac tggaaggcct cagccccag 240

 ccactgggct gggcctggcc ca atg gcc ttt aat gac ctc ctg cag cag gtg 292

60 Met Ala Phe Asn Asp Leu Leu Gln Gln Val
 1 5 10

 ggg ggt gtc ggc cgc ttc cag cag atc cag gtc acc ctg gtg gtc ctc 340

65

ES 2 294 863 T3

	Gly	Gly	Val	Gly	Arg	Phe	Gln	Gln	Ile	Gln	Val	Thr	Leu	Val	Val	Leu	
					15					20					25		
5	ccc	ctg	ctc	ctg	atg	gct	tct	cac	aac	acc	ctg	cag	aac	ttc	act	gct	388
	Pro	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	His	Asn	Thr	Leu	Gln	Asn	Phe	Thr	Ala	
					30				35					40			
10	gcc	atc	cct	acc	cac	cac	tgc	cgc	ccg	cct	gcc	gat	gcc	aac	ctc	agc	436
	Ala	Ile	Pro	Thr	His	His	Cys	Arg	Pro	Pro	Ala	Asp	Ala	Asn	Leu	Ser	
					45			50					55				
15	aag	aac	ggg	ggg	ctg	gag	gtc	tgg	ctg	ccc	cgg	gac	agg	cag	ggg	cag	484
	Lys	Asn	Gly	Gly	Leu	Glu	Val	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Arg	Gln	Gly	Gln	
		60					65					70					
20	cct	gag	tcc	tgc	ctc	cgc	ttc	acc	tcc	ccg	cag	tgg	gga	ctg	ccc	ttt	532
	Pro	Glu	Ser	Cys	Leu	Arg	Phe	Thr	Ser	Pro	Gln	Trp	Gly	Leu	Pro	Phe	
		75				80					85				90		
25	ctc	aat	ggc	aca	gaa	gcc	aat	ggc	aca	ggg	gcc	aca	gag	ccc	tgc	acc	580
	Leu	Asn	Gly	Thr	Glu	Ala	Asn	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Glu	Pro	Cys	Thr	
					95					100					105		
30	gat	ggc	tgg	atc	tat	gac	aac	agc	acc	ttc	cca	tct	acc	atc	gtg	act	628
	Asp	Gly	Trp	Ile	Tyr	Asp	Asn	Ser	Thr	Phe	Pro	Ser	Thr	Ile	Val	Thr	
				110					115					120			
35	gag	tgg	gac	ctt	gtg	tgc	tct	cac	agg	gcc	cta	cgc	cag	ctg	gcc	cag	676
	Glu	Trp	Asp	Leu	Val	Cys	Ser	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Ala	Gln	
			125					130					135				
40	tcc	ttg	tac	atg	gtg	ggg	gtg	ctg	ctc	gga	gcc	atg	gtg	ttc	ggc	tac	724
	Ser	Leu	Tyr	Met	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Val	Phe	Gly	Tyr	
		140					145					150					
45	ctt	gca	gac	agg	cta	ggc	cgc	cgg	aag	gta	ctc	atc	ttg	aac	tac	ctg	772
	Leu	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys	Val	Leu	Ile	Leu	Asn	Tyr	Leu	
		155				160					165				170		
50	cag	aca	gct	gtg	tca	ggg	acc	tgc	gca	gcc	ttc	gca	ccc	aac	ttc	ccc	820
	Gln	Thr	Ala	Val	Ser	Gly	Thr	Cys	Ala	Ala	Phe	Ala	Pro	Asn	Phe	Pro	
					175				180						185		

ES 2 294 863 T3

atc tac tgc gcc ttc cgg ctc ctc tcg ggc atg gct ctg gct ggc atc 868
 Ile Tyr Cys Ala Phe Arg Leu Leu Ser Gly Met Ala Leu Ala Gly Ile
 190 195 200
 tcc ctc aac tgc atg aca ctg aat gtg gag tgg atg ccc att cac aca 916
 Ser Leu Asn Cys Met Thr Leu Asn Val Glu Trp Met Pro Ile His Thr
 205 210 215
 cgg gcc tgc gtg ggc acc ttg att ggc tat gtc tac agc ctg ggc cag 964
 Arg Ala Cys Val Gly Thr Leu Ile Gly Tyr Val Tyr Ser Leu Gly Gln
 220 225 230
 ttc ctc ctg gct ggt gtg gcc tac gct gtg ccc cac tgg cgc cac ctg 1012
 Phe Leu Leu Ala Gly Val Ala Tyr Ala Val Pro His Trp Arg His Leu
 235 240 245 250
 cag cta ctg gtc tct gcg cct ttt ttt gcc ttc ttc atc tac tcc tgg 1060
 Gln Leu Leu Val Ser Ala Pro Phe Phe Ala Phe Phe Ile Tyr Ser Trp
 255 260 265
 ttc ttc att gag tcg gcc cgc tgg cac tcc tcc tcc ggg agg ctg gac 1108
 Phe Phe Ile Glu Ser Ala Arg Trp His Ser Ser Ser Gly Arg Leu Asp
 270 275 280
 ctc acc ctg agg gcc ctg cag aga gtc gcc cgg atc aat ggg aag cgg 1156
 Leu Thr Leu Arg Ala Leu Gln Arg Val Ala Arg Ile Asn Gly Lys Arg
 285 290 295
 gaa gaa gga gcc aaa ttg agt atg gag gta ctc cgg gcc agt ctg cag 1204
 Glu Glu Gly Ala Lys Leu Ser Met Glu Val Leu Arg Ala Ser Leu Gln
 300 305 310
 aag gag ctg acc atg ggc aaa ggc cag gca tcg gcc atg gag ctg ctg 1252
 Lys Glu Leu Thr Met Gly Lys Gly Gln Ala Ser Ala Met Glu Leu Leu
 315 320 325 330
 cgc tgc ccc acc ctc cgc cac ctc ttc ctc tgc ctc tcc atg ctg tgg 1300
 Arg Cys Pro Thr Leu Arg His Leu Phe Leu Cys Leu Ser Met Leu Trp
 335 340 345
 ttt gcc act agc ttt gca tac tat ggg ctg gtc atg gac ctg cag ggc 1348

ES 2 294 863 T3

	Phe	Ala	Thr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Val	Met	Asp	Leu	Gln	Gly	
				350					355					360			
5	ttt	gga	gtc	agc	atc	tac	cta	atc	cag	gtg	atc	ttt	ggt	gct	gtg	gac	1396
	Phe	Gly	Val	Ser	Ile	Tyr	Leu	Ile	Gln	Val	Ile	Phe	Gly	Ala	Val	Asp	
			365					370					375				
10	ctg	cct	gcc	aag	ctt	gtg	ggc	ttc	ctt	gtc	atc	aac	tcc	ctg	ggt	cgc	1444
	Leu	Pro	Ala	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Leu	Val	Ile	Asn	Ser	Leu	Gly	Arg	
		380					385					390					
15	cgg	cct	gcc	cag	atg	gct	gca	ctg	ctg	ctg	gca	ggc	atc	tgc	atc	ctg	1492
	Arg	Pro	Ala	Gln	Met	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Cys	Ile	Leu	
	395					400					405					410	
20	ctc	aat	ggg	gtg	ata	ccc	cag	gac	cag	tcc	att	gtc	cga	acc	tct	ctt	1540
	Leu	Asn	Gly	Val	Ile	Pro	Gln	Asp	Gln	Ser	Ile	Val	Arg	Thr	Ser	Leu	
					415					420					425		
25	gct	gtg	ctg	ggg	aag	ggt	tgt	ctg	gct	gcc	tcc	ttc	aac	tgc	atc	ttc	1588
	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Ser	Phe	Asn	Cys	Ile	Phe	
				430					435					440			
30	ctg	tat	act	ggg	gaa	ctg	tat	ccc	aca	atg	atc	cgg	cag	aca	ggc	atg	1636
	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Leu	Tyr	Pro	Thr	Met	Ile	Arg	Gln	Thr	Gly	Met	
			445					450					455				
35	gga	atg	ggc	agc	acc	atg	gcc	cga	gtg	ggc	agc	atc	gtg	agc	cca	ctg	1684
	Gly	Met	Gly	Ser	Thr	Met	Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Ile	Val	Ser	Pro	Leu	
		460					465					470					
40	gtg	agc	atg	act	gcc	gag	ctc	tac	ccc	tcc	atg	cct	ctc	ttc	atc	tac	1732
	Val	Ser	Met	Thr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Pro	Ser	Met	Pro	Leu	Phe	Ile	Tyr	
	475					480					485				490		
45	ggt	gct	gtt	cct	gtg	gcc	gcc	agc	gct	gtc	act	gtc	ctc	ctg	cca	gag	1780
	Gly	Ala	Val	Pro	Val	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Thr	Val	Leu	Leu	Pro	Glu	
					495					500					505		
50	acc	ctg	ggc	cag	cca	ctg	cca	gac	acg	gtg	cag	gac	ctg	gag	agc	agg	1828
	Thr	Leu	Gly	Gln	Pro	Leu	Pro	Asp	Thr	Val	Gln	Asp	Leu	Glu	Ser	Arg	
				510				515					520				

ES 2 294 863 T3

	aaa ggg aaa cag acg cga cag caa caa gag cac cag aag tat atg gtc	1876
5	Lys Gly Lys Gln Thr Arg Gln Gln Gln Glu His Gln Lys Tyr Met Val 525 530 535	
	cca ctg cag gcc tca gca caa gag aag aat gga ctc tgaggactcga	1922
10	Pro Leu Gln Ala Ser Ala Gln Glu Lys Asn Gly Leu 540 545 550	
	gaaggggcct tacagaacct taaagggagg gaaggtccta caggtctccg gccacccaca	1982
15	caaggaggag gaagaggaaa tggtgaccca agtgtggggg ttgtgggttca ggaaagcatc	2042
	ttcccagggg tccacctccc ttataaaacc ccaccagaac cacatcatta aaagggtttga	2102
20	ctgcgaaaaa aaaaaaaaaa a	2123

<210> 2

 $_{25} \quad \langle 211 \rangle \quad 550$

<212> PRT

<213> Desconocido

30 <400> 2

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

ES 2 294 863 T3

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

ES 2 294 863 T3

405 410 415
 5 Gln Asp Gln Ser Ile Val Arg Thr Ser Leu Ala Val Leu Gly Lys Gly
 420 425 430
 Cys Leu Ala Ala Ser Phe Asn Cys Ile Phe Leu Tyr Thr Gly Glu Leu
 435 440 445
 10 Tyr Pro Thr Met Ile Arg Gln Thr Gly Met Gly Met Gly Ser Thr Met
 450 455 460
 15 Ala Arg Val Gly Ser Ile Val Ser Pro Leu Val Ser Met Thr Ala Glu
 465 470 475 480
 Leu Tyr Pro Ser Met Pro Leu Phe Ile Tyr Gly Ala Val Pro Val Ala
 485 490 495
 20 Ala Ser Ala Val Thr Val Leu Leu Pro Glu Thr Leu Gly Gln Pro Leu
 500 505 510
 Pro Asp Thr Val Gln Asp Leu Glu Ser Arg Lys Gly Lys Gln Thr Arg
 515 520 525
 25 Gln Gln Gln Glu His Gln Lys Tyr Met Val Pro Leu Gln Ala Ser Ala
 530 535 540
 30 Gln Glu Lys Asn Gly Leu
 545 550

<210> 3

<211> 77

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.

<400> 3

accgtctaga attcttttta tttttaattt tctttcaa at acgtccacca tggccttta 60

tgacctctg cagcagg

77

<210> 4

<211> 51

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.

<400> 4

tactcacgtg gatccgatc agacgtctgt aggaccttcc ctcccttag g

51

<210> 5

<211> 9

ES 2 294 863 T3

	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
5	<220>	
	<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.	
	<400> 5	
10	ccaccatgg	9
	<210> 6	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
20	<220>	
	<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.	
	<400> 6	
25	cccgtggca ctctctctcc gggag	25
	<210> 7	
30	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
35	<220>	
	<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.	
	<400> 7	
40	gtagagctcg gcagtcatgc tcacca	26
	<210> 8	
45	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
50	<220>	
	<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.	
	<400> 8	
55	ccagcgctgt cactgtcttc ctgc	24
	<210> 9	
60	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
65	<220>	
	<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.	

ES 2 294 863 T3

<400> 9

aacccccaca cttgggtcac catttcctc

29

5

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de Organismo Desconocido: Esta información no está disponible.

15

<400> 10

Thr	Val	Gln	Asp	Leu	Glu	Ser	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Thr	Arg
1				5					10				

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65