



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 520**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00922182 .1**

96 Fecha de presentación : **14.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1175513**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.01.2002**

54

Título: **Genes relacionados con MinK, formación de canales de potasio y asociación con arritmias cardíacas.**

30

Prioridad: **15.04.1999 US 129404 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2010

73

Titular/es:
**The University of Utah Research Foundation
615 Arapeen Drive, Suite 310
Salt Lake City, Utah 84108, US
Yale University**

72

Inventor/es: **Abbott, Geoffrey W.;
Sesti, Federico;
Splawski, Igor;
Keating, Mark T. y
Goldstein, Steve A. N.**

74

Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 338 520 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes relacionados con MinK, formación de canales de potasio y asociación con arritmias cardíacas.

- 5 Esta solicitud se hizo con apoyo gubernamental conforme a las becas n° RO1 HL46401, RO1 GM51851 y P50-HL52338, financiadas por los Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, Maryland y la beca M01 RR00064 del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos. El gobierno federal puede tener ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

- 10 La presente invención está relacionada con genes y productos génicos relacionados con Min-K, que forma canales iónicos, y con un proceso para el diagnóstico de trastornos de canales iónicos, incluyendo el síndrome de QT largo (LQT). Por ejemplo, la proteína KCNE2 forma canales de potasio I_{Kr} junto con HERG y está asociada con el LQT. El LQT se diagnostica según la presente invención analizando la secuencia de ADN de *KCNE2* de un individuo a
15 ensayar y comparando la secuencia de ADN respectiva con la secuencia de ADN conocida de un gen *KCNE2* normal. Como alternativa, estos genes relacionados con MinK de un individuo a ensayar pueden explorarse con respecto a mutaciones que producen trastornos de canales iónicos, incluyendo el LQT. La predicción de trastornos de canales iónicos, incluyendo el LQT, permitirá a los expertos prevenir los trastornos usando la terapia médica existente. Esta invención está relacionada además con el descubrimiento de que las proteínas HERG y *KCNE2* (también conocidas
20 como MiRP1) se ensamblan para formar un canal de potasio I_{Kr} cardíaco. Este conocimiento puede usarse para coexpresar estas dos proteínas en una célula, y dicha célula transformada puede usarse para seleccionar fármacos que sean útiles en el tratamiento o prevención del LQT. La invención está relacionada además con mutaciones en el gen *KCNE2* humano que se han descubierto en familias con LQT.

- 25 Las publicaciones y otros materiales usados en el presente documento para aclarar los antecedentes de la invención o proporcionar detalles adicionales con respecto a la práctica se incorporan como referencia, y por comodidad se agrupan respectivamente en la Lista de Referencias adjunta.

- 30 Las arritmias cardíacas son una causa común de morbilidad y mortalidad, siendo responsables de aproximadamente el 11% de todas las muertes naturales (Kannel; 1987; Willich *et al.*, 1987). En general, el diagnóstico y el tratamiento presintomático de individuos con taquiarritmias ventriculares que ponen en peligro la vida es deficiente y en algunos casos el tratamiento médico realmente aumenta el riesgo de arritmia y muerte (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators, 1992). Estos factores hacen que la detección precoz de individuos con riesgo de arritmias cardíacas y la prevención de las arritmias sean altas prioridades.

- 35 Tanto los factores genéticos como los factores adquiridos contribuyen al riesgo de desarrollar arritmias cardíacas. El síndrome de QT largo (LQT) es una arritmia cardíaca hereditaria que produce una pérdida brusca de consciencia, síncope, ataques y muerte súbita por taquiarritmias ventriculares, específicamente *torsade de pointes* y fibrilación ventricular (Ward, 1964; Romano, 1965; Schwartz *et al.*, 1975; Moss *et al.*, 1991). Este trastorno normalmente se produce
40 en individuos jóvenes, por lo demás sanos (Ward, 1964; Romano 1965; Schwartz *et al.*, 1975). La mayoría de los portadores de genes del LQT manifiestan una prolongación del intervalo QT en un electrocardiograma, un signo de una repolarización cardíaca anómala (Vincent *et al.*, 1992). Las características clínicas del LQT se producen como resultado de arritmias cardíacas episódicas, específicamente taquiarritmias ventriculares relacionadas con la repolarización tales como *torsade de pointes*, denominada así por la naturaleza ondulante característica del electrocardiograma en
45 esta arritmia y fibrilación ventricular (Schwartz *et al.*, 1975; Moss and McDonald, 1971). La arritmia conocida como *torsade de pointes* puede degenerar en fibrilación ventricular, una arritmia particularmente letal. Aunque el LQT no es un diagnóstico común, las arritmias ventriculares son muy comunes; más de 300.000 ciudadanos de Estados Unidos mueren repentinamente cada año (Kannel, *et al.*, 1987; Willich *et al.*, 1987) y, en muchos casos, el mecanismo subyacente puede ser una repolarización cardíaca aberrante. Por lo tanto, el LQT proporciona una oportunidad única para
50 estudiar a nivel molecular las arritmias cardíacas que ponen en peligro la vida.

- Se han definido tanto formas hereditarias como formas adquiridas de LQT. El LQT adquirido y las arritmias secundarias pueden producirse por isquemia cardíaca, bradicardia y anomalías metabólicas tales como bajas concentraciones séricas de potasio o calcio (Zipes, 1987). El LQT también puede producirse por tratamiento con ciertas medicaciones,
55 incluyendo antibióticos, antihistamínicos, anestésicos generales y, la mayoría de las veces, medicaciones antiarrítmicas (Zipes, 1987). Las formas hereditarias de LQT pueden deberse a mutaciones en al menos cinco genes diferentes. En estudios previos se localizaron loci de LQT en el cromosoma 11p15.5 (*KVLQT1* o LQT1) (Keating *et al.*, 1991a; Keating *et al.*, 1991b), 7q35-36 (*HERG* o LQT2) y 3p21-24 (*SCN5A* o LQT3) (Jiang *et al.*, 1994). De éstos, la causa más común de LQT hereditario es *KVLQT1*. Los datos de los presentes solicitantes indican que las mutaciones en este gen
60 son responsables de más de un 50% del LQT hereditario. Recientemente se localizó un cuarto locus de LQT (*LQT4*) en 4q25-27 (Schott *et al.*, 1995). Además, *KCNE1* (LQT5) se ha asociado con el síndrome de QT largo (Splawski *et al.*, 1997b; Duggal *et al.*, 1998). Estos genes codifican canales iónicos implicados en la generación del potencial de acción cardíaco. Las mutaciones pueden ocasionar una disfunción de los canales y retrasar la repolarización mioce-
65 lular. Debido a la heterogeneidad regional de la expresión de los canales con el miocardio, la repolarización cardíaca aberrante crea un sustrato para la arritmia. *KVLQT1* y *KCNE1* también se expresan en el oído interno (Neyroud *et al.*, 1997; Vetter *et al.*, 1996). Los presentes solicitantes y otros investigadores demostraron que ciertas mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en cada uno de estos genes pueden producir sordera y el fenotipo cardíaco severo del síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (Neyroud *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997a; Schultze-Bahr *et al.*, 1997;

Tyson *et al.*, 1997). La pérdida de canales funcionales en el oído aparentemente altera la producción de endolinfa, produciendo sordera.

El diagnóstico presintomático del LQT actualmente se basa en la prolongación del intervalo QT en electrocardiogramas. Un valor de QTc (intervalo QT corregido para el ritmo cardíaco; Bazett, 1920) mayor de 0,44 segundos ha clasificado tradicionalmente a un individuo como afectado. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con LQT son individuos jóvenes, por lo demás sanos, que no se someten a electrocardiogramas. Además, los estudios genéticos han demostrado que el valor de QTc ni es sensible ni es específico (Vincent *et al.*, 1992). El espectro de intervalos QTc para portadores de genes y no portadores solapa, lo cual conduce a clasificaciones erróneas. Los no portadores pueden tener intervalos QTc prolongados y diagnosticarse como individuos afectados. Por el contrario, algunos portadores de genes de LQT tienen intervalos QTc $\leq 0,44$ segundos, pero siguen teniendo un mayor riesgo de arritmia. Un diagnóstico presintomático correcto es importante para un tratamiento eficaz y con especificidad génica del LQT.

Se ha informado sobre formas autosómicas dominantes y autosómicas recesivas de este trastorno. El LQT autosómico recesivo (también conocido como síndrome de Jervell y Lange-Nielsen) se ha asociado con una sordera neural congénita; esta forma de LQT es rara (Jervell y Lange-Nielsen, 1957). El LQT autosómico dominante (síndrome de Romano-Ward) es más común y no está asociado con otras anomalías fenotípicas (Romano *et al.*, 1963; Ward, 1964). Un trastorno muy similar al LQT hereditario también puede ser adquirido, normalmente como resultado de una terapia farmacológica (Schwartz *et al.*, 1975; Zipes, 1987).

Los datos tienen implicaciones para el mecanismo de las arritmias en el LQT. Previamente se han propuesto dos hipótesis para el LQT (Schwartz *et al.*, 1994). Una sugiere que una predominancia de la innervación autonómica izquierda produce una repolarización cardíaca anómala y arritmias. Esta hipótesis se respalda por el descubrimiento de que pueden inducirse arritmias en perros mediante la retirada del ganglio estrellado derecho. Además, ciertos indicios anecdóticos sugieren que algunos pacientes con LQT se tratan eficazmente por agentes bloqueantes β -adrenérgicos y por ganglionectomía del estrellado izquierdo (Schwartz *et al.*, 1994). La segunda hipótesis para las arritmias relacionadas con el LQT sugiere que ciertas mutaciones en genes de canales iónicos específicos del corazón, o genes que modulan canales iónicos cardíacos, producen una repolarización miocelular retardada. La repolarización miocelular retardada podría promover la reactivación de canales de calcio de tipo L dando como resultado despolarizaciones secundarias (January and Riddle, 1989). Probablemente, estas despolarizaciones secundarias son el mecanismo celular de las arritmias *torsade de pointes* (Surawicz, 1989). Esta hipótesis se confirma por la observación de que el bloqueo farmacológico de los canales de potasio puede inducir la prolongación de QT y las arritmias relacionadas con la repolarización en modelos humanos y animales (Antzelevitch and Sicouri, 1994). El descubrimiento de que una forma de LQT se produce como resultado de mutaciones en un gen de canal de potasio cardíaco confirma la hipótesis miocelular.

En teoría, las mutaciones en un gen de canal de sodio cardíaco producirían LQT. Los canales de sodio de apertura por voltaje median la despolarización rápida en los miocitos ventriculares y también conducen una pequeña corriente durante la fase de meseta del potencial de acción (Attwell *et al.*, 1979). Ligeras anomalías en la función de los canales de sodio (por ejemplo, una inactivación retardada de los canales de sodio o una alteración de la dependencia del voltaje de la inactivación de los canales) podrían retrasar la repolarización cardíaca, ocasionando una prolongación de QT y arritmias. En 1992, Gellens y sus colegas clonaron y caracterizaron un gen de un canal de sodio cardíaco, *SCN5A* (Gellens *et al.*, 1992). La estructura de este gen era similar a la de otros canales de sodio caracterizados previamente, codificando una proteína grande de 2016 aminoácidos. Estas proteínas de canales contienen cuatro dominios homólogos (DI-DIV), conteniendo cada uno de ellos seis supuestos segmentos transmembrana (S1-S6). *SCN5A* se localizó recientemente en el cromosoma 3p21, lo que hace que sea un excelente gen candidato de *LQT3* (George *et al.*, 1995), y después este gen resultó estar asociado con *LQT3* (Wang *et al.*, 1995a).

En 1994, Warmke y Ganetzky identificaron un nuevo ADNc humano, el gen relacionado con éter a-go-go humano (*HERG*, Warmke and Ganetzky, 1994). *HERG* se localizó en el cromosoma humano 7 por análisis de PCR de un panel híbrido de células somáticas (Warmke and Ganetzky, 1994), lo cual hizo que fuera un candidato para *LQT2*. Tiene una homología de la secuencia de aminoácidos prevista con los canales de potasio. *HERG* se aisló a partir de una biblioteca de ADNc de hipocampo por homología con el gen éter a-go-go de *Drosophila* (*eag*), que codifica un canal de potasio modulado por calcio (Bruggemann *et al.*, 1993). Sin embargo, *HERG* no es el homólogo humano de *eag*, compartiendo sólo aproximadamente el 50% de homología de secuencias de aminoácidos. Se ha demostrado que *HERG* está asociado con *LQT2* (Curran *et al.*, 1995).

Se descubrió que *LQT1* estaba asociado con el gen *KVLQT1* (Q. Wang *et al.*, 1996). Se identificaron y se caracterizaron dieciséis familias con mutaciones en *KVLQT1*, y se demostró que en las dieciséis familias había una asociación completa entre *LQT1* y *KVLQT1*. *KVLQT1* se localizó en el cromosoma 11p15.5, lo cual hizo que fuera un gen candidato para *LQT1*. *KVLQT1* codifica una proteína con características estructurales de canales de potasio, y la expresión del gen medida por análisis de transferencia de Northern demostró que *KVLQT1* se expresa más claramente en el corazón. En *KVLQT1* se identificaron una delección intragénica y diez mutaciones de sentido erróneo diferentes que producen *LQT*. Estos datos definen a *KVLQT1* como un nuevo gen de canales de potasio cardíacos y demuestra que las mutaciones en este gen producen susceptibilidad a taquiarritmias ventriculares y muerte súbita.

Se sabía que un componente del canal I_{Ks} es minK, una proteína de 130 aminoácidos con un solo supuesto dominio transmembrana (Takumi *et al.*, 1988; Goldstein and Miller, 1991; Hausdorff *et al.*, 1991; Takumi *et al.*, 1991; Busch

et al., 1992; Wang and Goldstein, 1995; KW Wang *et al.*, 1996). El tamaño y estructura de esta proteína hizo que fuera poco probable que minK sola formara canales funcionales (Attali *et al.*, 1993; Lesage *et al.*, 1993). Se presentaron pruebas de que KVLQT1 y minK se ensamblan para formar el canal de potasio I_{Ks} cardiaco (Sanguinetti *et al.*, 1996b). La disfunción de I_{Ks} es una causa de arritmia cardiaca. Posteriormente se demostró que mutaciones en *KCNE1* (que codifica minK) también pueden producir el LQT (Splawski *et al.*, 1997b).

Se desea identificar otros genes que estén implicados en el LQT y que puedan usarse para el diagnóstico del LQT.

Descripción resumida de la invención

10

La presente invención está relacionada con genes asociados con MinK, sus productos proteicos, su asociación para formar canales iónicos, tales como canales de potasio, y su asociación con trastornos de canales iónicos, tales como arritmia cardiaca.

15

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan las secuencias de ADN y proteínas para *KCNE2* humano. También se describen en el presente documento las secuencias de ADN y proteica para *KCNE2* de rata, *KCNE3* humano, *KCNE3* de ratón, *KCNE4* humano y *KCNE4* de ratón. Estos genes se denominan como alternativa *MiRP1*, *MiRP2* y *MiRP3*, respectivamente.

20

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el ensamblaje de HERG y *KCNE2* para formar un canal de potasio I_{Kr} .

25

En un tercer aspecto de la presente invención se proporciona la asociación de *KCNE2* con arritmias cardiacas. El conocimiento de que estas dos proteínas se ensamblan para formar el canal I_{Kr} es útil para desarrollar un ensayo para seleccionar fármacos que sean útiles en el tratamiento o prevención del LQT. Por medio de la coexpresión de los dos genes en una célula tal como un oocito, es posible seleccionar fármacos que tengan un efecto sobre el canal I_{Kr} , tanto en su forma de tipo salvaje como en su forma mutada. Este conocimiento también es útil para el análisis del gen *KCNE2* para un diagnóstico precoz de sujetos con LQT.

30

En un cuarto aspecto de la presente invención se proporcionan mutaciones en *KCNE2* que están asociadas con el LQT.

35

En un quinto aspecto de la presente invención se proporciona el análisis del gen *KCNE2* para un diagnóstico precoz de sujetos con LQT. El método de diagnóstico comprende analizar la secuencia de ADN del gen *KCNE2* de un individuo a ensayar y compararla con la secuencia de ADN del gen no variante nativo. En una segunda realización, se explora el gen *KCNE2* de un individuo a ensayar con respecto a mutaciones que producen LQT. La capacidad de predecir LQT permitirá a los médicos prevenir la enfermedad con terapia médica tal como agentes beta bloqueantes.

40

En un sexto aspecto de la presente invención se exploran candidatos de fármacos para identificar fármacos que sean útiles para tratar o prevenir el LQT.

45

En un séptimo aspecto de la presente invención se exploran fármacos útiles para tratar el LQT y otros trastornos relacionados o no relacionados con respecto a su riesgo de producir LQT o estos trastornos porque pueden interaccionar con, y bloquear, un canal iónico.

En un octavo aspecto de la presente invención se proporcionan la farmacogenómica del genotipo y reacciones de fármacos.

Breve descripción de las figuras

50

Las Figuras 1A-1C muestran que MiRP1 se expresa en el corazón y está relacionada con MinK. Fig. 1A: Distribución tisular de MiRP1 de rata. Transferencia de Northern de tejidos de rata indicados realizada con un fragmento de *rKCNE1* (nº de acceso D85797, 387 pb); 2 µg de ARNm poli(A)⁺ por tejido y por calle. Fig. 1B: La transferencia del panel a sondeada con respecto a la β-actina. Fig. 1C: Secuencias peptídicas previstas para MiRP1 y MinK de rata y humano. El supuesto segmento transmembrana está subrayado; los residuos idénticos están ligeramente sombreados; tres posiciones de hMiRP1 asociadas con arritmia están sombreadas en oscuro (Q9, M54, I57). MiRP1 contiene secuencias consenso para 2 sitios de N-glicosilación (N6, N29) y 2 sitios de fosforilación mediados por la proteína quinasa C (T71, S74). Los ADNc de *KCNE1* de rata y humano contienen codones de terminación en fase sin ATG intermedios en sus secuencias 5' cadena arriba y una A en la posición -3 con respecto a la metionina iniciadora prevista; los números de acceso para *KCNE1* humano y de rata son AF071002 y AF071003, respectivamente.

65

Las Figuras 2A-2F demuestran que rMiRP1 es una subunidad de canal iónico. Se evaluaron atributos de canales formados con subunidades HERG (■) o rMiRP1 y HERG (□) en solución de Ca^{2+} 0,3 mM, KCl 100 mM mediante los protocolos indicados, como se describe en los Ejemplos. Fig. 2A: Gráficos de corriente de partida por protocolo 1 (encarte); barras de escala 1 µA y 1 s. Fig. 2B: Gráficos de corriente por el protocolo 3 (encarte), por lo demás como en la Fig. 2A. Fig. 2C: Activación en estado estacionario por el protocolo 1; corrientes de cola medidas en la flecha, media ± s.e.m. para grupos de 10 oocitos, normalizado a I_{max} (40 mV). Líneas de acuerdo con la función de Boltzmann: $1/(1+\exp[(V_{1/2}-V)/V_s])$ donde $V_{1/2}$ es el voltaje semimáximo y V_s es el factor de pendiente; las barras

de error representan s.e.m. $V_{1/2}$ era -46 ± 1 y -37 ± 1 mV y V_s $11,4 \pm 0,2$ y $11,7 \pm 0,1$ para los canales de HERG y rMiRP1 + HERG, respectivamente. (2C, encarte), Velocidades de activación a diversos voltajes por el protocolo 2, grupos de 3 oocitos, normalizado a la velocidad a 60 mV. Fig. 2D: Corrientes de cola máximas por el protocolo 3; ajuste como en la Fig. 2C; media $\pm$ s.e.m. para grupos de 10 oocitos; el máximo a -150 mV para los canales de HERG y rMiRP1 + HERG fueron $-8,8 \pm 0,5$ y $-4,9 \pm 0,7$ μ A, respectivamente. Fig. 2E: Inactivación en estado estacionario por el protocolo 4 (encarte); media $\pm$ s.e.m. para grupos de 8 oocitos, normalizada con respecto al máximo (-140 mV). Fig. 2F: Velocidades de desactivación a diversos voltajes por el protocolo 3; la relajación de la corriente se ajustó con un solo exponencial ($I = Ae^{-t/\tau}$) con grupos de 8 oocitos; para canales de HERG y rMiRP1 + HERG a -120 mV, τ^{-1} fue $1,5 \pm 0,2$ y $0,21 \pm 0,01$ s y A fue $7,9 \pm 0,4$ y $4,2 \pm 0,5$ μ A, respectivamente.

Las Figuras 3A-3C muestran que los canales de rMiRP1/HERG individuales ($\square$) son similares en conductancia a los canales I_{Kr} nativos mientras que los canales HERG ($\blacksquare$) no lo son. Realizado en solución de Ca^{2+} 0,3 mM, KCl 100 mM por el protocolo 7, como se describe en los Ejemplos. Fig. 3A: Corrientes de un solo canal a diversos voltajes; barras de escala 0,5 pA y 0,2 s. Fig. 3B: Histogramas de todos los puntos calculados a -90 mV a partir de las zonas del panel a con aproximadamente 30.000 acontecimientos (150 transiciones) registrados antes de la desactivación y sin reflejar P_0 . Fig. 3C: Relaciones de corriente-voltaje para canales individuales HERG o rMiRP1 + HERG en zonas selladas (configuración "cell-attached patch") ($n = 5$) mantenidas a los voltajes indicados; se construyeron histogramas de todos los puntos con $1,3 \times 10^5$ acontecimientos a cada voltaje, ~ 400 transiciones. Las conductancias de pendiente fueron de $12,9 \pm 2,0$ y $8,2 \pm 1,4$ pS, para los canales de HERG y rMiRP1 + HERG, respectivamente. Filtrado a 0,5 kHz.

Las Figuras 4A-4B muestran que los canales individuales de rMiRP1/HERG se desactivan más rápidamente que los canales de HERG. Fig. 4A: Desactivación de canales individuales en zonas selladas como en la Figura 3; barras de escala 2 pA y 0,75 s. Fig. 4B: Conjunto de 50-70 ensayos realizados como en el panel a a -100 mV; las transiciones de capacitancia se neutralizaron por resta del gráfico nulo. Los histogramas se ajustaron con una sola función exponencial ($I = I_0 + Ie^{-t/\tau}$); $\tau^{-1} = 300$ ms, $I_0 = -8$ pA e $I = -20$ pA para canales de HERG; $\tau^{-1} = 131$ ms, $I_0 = -10$ pA e $I = -24$ pA para canales que contienen subunidades rMiRP1 y HERG. Barras de escala 10 pA y 0,5 s.

Las Figuras 5A-5F muestran que los canales de rMiRP1/HERG ($\square$) pero no los canales de HERG ($\blacksquare$) son similares a los canales I_{Kr} nativos en su regulación por K^+ y velocidad de desactivación. Realizado en solución de Ca^{2+} 1 mM, KCl 4 mM por los protocolos descritos en los Ejemplos. Fig. 5A: Gráficos de corriente de partida por el protocolo 6; barras de escala 0,1 μ A, 1 s. Fig. 5B: Relación de corriente-voltaje al final del pulso de activación (flecha); media $\pm$ s.e.m. para grupos de 7 oocitos; estudiado con la Fig. 5A. Fig. 5C: Variación de amplitud de corriente con KCl externo; media $\pm$ s.e.m. para grupos de 8 células estudiados como en el panel a a 0 mV. Las líneas continuas son ajustes lineales a los datos; para HERG, la relación da una pendiente = 46 ± 2 y una intersección = 377 ± 6 nA ($R = 0,998$); para rMiRP1/HERG, pendiente = $11,7 \pm 0,4$ e intersección = 155 ± 2 nA ($R = 0,999$). Fig. 5D: Gráficos de corriente de partida por el protocolo 3; duraciones de prepulso y pulso de ensayo de 1 s; barras de escala 1 μ A y 250 ms. Fig. 5E: Relación de corriente-voltaje en el máximo (flecha en la Fig. 5D); media $\pm$ s.e.m. para grupos de 5 oocitos; a -50 mV las corrientes fueron 1200 ± 100 y 300 ± 60 nA, mientras que a -120 mV fueron -2200 ± 100 y -900 ± 70 para los canales de HERG y rMiRP1/HERG respectivamente. Fig. 5F: Bloqueo en estado estacionario por diversas concentraciones de E-4031 en solución de KCl 20 evaluado por el protocolo 5 y representado como la fracción de corriente no bloqueada para grupos de 6 oocitos; en el texto se presentan las constantes de inhibición. Ningún tipo de canal mostró bloqueo con el pulso inicial.

Las Figuras 6A-6B muestran que las subunidades rMiRP1 y HERG forman complejos estables. Fig. 6A: Expresión en células COS de rMiRP1-HA (M1), HERG-cmyc (H) y conexina43-cmyc (C). Las calles contienen el lisado celular total (TL) o inmunoprecipitaciones (IP) realizadas con anticuerpo anti-cmyc. SDS-PAGE (10-16%) y visualización de transferencia de western con anticuerpo anti-HA. Las células se transfectaron con las siguientes subunidades: calles 1, 2: M1 + H; calle 3: H; calle 4: M1; calle 5: M1 + C; las barras marcan 32,7, 30,2 y 24 kDa. Fig. 6B: rMiRP1 forma complejos con HERG antes que con MinK *in vitro*. Las calles contienen inmunoprecipitados usando anticuerpo anti-cmyc de productos de traducción marcados con ^{35}S -metionina generados con lisado de reticulocito de conejo y se visualizaron por autorradiografía. Las mezclas de reacción contenían subunidades, rMiRP1 (M1), rMinK (m) y HERG-cmyc (H), como se indica a continuación: calle 1: M1 + H; calle 2: m + H; calle 3: M1 + m + H; barras 30,2 y 24 kDa.

Las Figuras 7A-7C muestran que los canales formados con hMiRP1 y HERG (pero no los formados con proteína HERG sola) se bloquean por E-4031 con cinéticas bifásicas. Se pasaron células CHO que expresaban subunidades de canales, como se indica, de -80 mV a +20 mV durante 1 s y después a -40 mV durante 2 s con un intervalo interciclo de 0,5 s. Las células se estudiaron durante 4 ciclos antes de la aplicación del fármaco, se mantuvieron próximas a -80 mV durante 1 minuto en presencia de E-4031 1 μ M (barra) y después se estudiaron durante 30-70 ciclos en presencia continuada del fármaco. Fig. 7A: Los primeros 20 gráficos de corriente para una célula que expresa canales de HERG; la fracción de corriente no bloqueada en el primer pulso para esta célula fue = 0,99. Fig. 7B: Los primeros 20 gráficos de corriente para una célula que expresa canales de hMiRP1/HERG; la fracción de corriente no bloqueada en el primer pulso para esta células fue = 0,64. Fig. 7C: Relajación hasta el bloqueo de equilibrio para las células en el panel a (canales de HERG, $\blacksquare$, $\tau = 38$ ciclos) y panel b (canales de hMiRP1/HERG, $\square$, $\tau = 4$ ciclos).

Las Figuras 8A-8D muestran la función de canales con subunidades hMiRP1 de tipo salvaje o asociadas con arritmia. Fig. 8A: Gráficos de corriente de partida con tipo salvaje (WT), T8A, Q9E o M54T-hMiRP1 y HERG en células

CHO por el protocolo 6 con solución de Ca^{2+} 1 mM, KCl 4 mM (Ejemplos); las barras de escala representan 15 pA para WT y 50 pA para T8A, Q9E y M54T-hMiRP1 y 0,5 s. Fig. 8B: Corrientes de cola inducidas por despolarización a 20 mV (no mostrado) y repolarización a voltajes de -20 a -120 mV, por lo demás como en la Fig. 8A; las barras de escala representan 50 pA para WT, 100 pA para T8A y M54T, 500 pA para Q9E-hMiRP1 y 0,1 s. Fig. 8C: Activación; curvas Po isócronas para WT($\square$), T8A (Δ), Q9E ($\bullet$) y M54T-hMiRP1 ($\blacktriangledown$); las curvas son media $\pm$ s.e.m. para grupos de 10-14 células y se ajustan como en la Fig. 2C; el voltaje de activación semimáximo y los factores de pendiente se presentan en la Tabla 1. Fig. 8D: Desactivación: componente rápido, para WT($\square$), T8A (Δ), Q9E ($\bullet$) y M54T-hMiRP1 ($\blacktriangledown$); los valores para las velocidades rápida y lenta y sus pesos se estimaron ajustando los gráficos de corriente de partida a una función doble exponencial (Tabla 1).

Las Figuras 9A-9C demuestran que Q9E-hMiRP1 está asociado con la arritmia inducida por claritromicina y a un aumento de la sensibilidad al fármaco. A menos que se indique, se usó solución de Ca^{2+} 1 mM, KCl 4 mM (Ejemplos). Fig. 9A: Gráficos de corriente de partida de Q9E-hMiRP1 expresado con HERG en células CHO por el protocolo 6; barras de escala 0,1 pA y 0,1 s. Fig. 9B: Variación de amplitud de corriente de cola máxima en el equilibrio con dosis variables de claritromicina después de la activación a +20 mV; las concentraciones de bloqueo semimáximas están en el texto, los coeficientes de Hill fueron $1,7 \pm 0,2$ y $1,7 \pm 0,1$ para WT ($\square$) y Q9E-hMiRP1 ($\circ$), respectivamente. Fig. 9C: Relación de corriente-voltaje como en el panel a, media $\pm$ s.e.m. para grupos de 6 células en ausencia ($\bullet$) o presencia ($\circ$) de claritromicina 0,5 mM. Los datos se ajustaron usando la ecuación de Boltzman en la Fig. 2C y se multiplicaron por la inversa de la fracción de la corriente no bloqueada; con claritromicina 0,5 mM, el valor de $V_{1/2}$ para el tipo salvaje fue -30 ± 8 mV (no mostrado), mientras que fue de -25 ± 5 mV para Q9E-hMiRP1 (mostrado); los factores de pendiente no cambiaron. En solución de Ca^{2+} 1 mM, KCl 1 mM y claritromicina 0,5 mM (no mostrado), el valor de $V_{1/2}$ para el tipo salvaje fue de -32 ± 6 mV y para Q9E-hMiRP1 fue de -29 ± 10 mV; de nuevo, los factores de pendiente no cambiaron.

Resumen de la lista de secuencias

La SEC ID N°:1 es la secuencia de ADN para *KCNE2* humano. La SEC ID N°: 2 es la secuencia proteica para *KCNE2* humano. La SEC ID N°: 3 es la secuencia de ADN para *KCNE2* de rata. La SEC ID N°: 4 es la secuencia proteica para *KCNE2* de rata. La SEC ID N°: 5 es la secuencia de ADN para *KCNE3* humano. La SEC ID N°: 6 es la secuencia proteica para *KCNE3* humano. La SEC ID N°:7 es la secuencia de ADN para *KCNE3* de ratón. La SEC ID N°: 8 es la secuencia proteica para *KCNE3* de ratón. La SEC ID N°:9 es la secuencia de ADN para *KCNE4* humano. La SEC ID N°: 10 es la secuencia proteica para *KCNE4* humano. La SEC ID N°: 11 es la secuencia de ADN para *KCNE4* de ratón. La SEC ID N°: 12 es la secuencia proteica para *KCNE4* de ratón. Las SEC ID N°: 13-18 son las secuencias de ADN para los cebadores de amplificación para la exploración de mutaciones. La SEC ID N°: 19 es la secuencia de aminoácidos de residuos HA usados para el marcaje de epítomos. La SEC ID N°: 20 es la secuencia de aminoácidos para los residuos cmyc usados para el marcaje de epítomos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está relacionada con la determinación de la secuencia de varios genes relacionados con MinK como se describe en este documento, su asociación para formar canales iónicos, tales como canales de potasio, y su asociación con trastornos de canales iónicos, tales como arritmias cardíacas. La presente invención también está relacionada con variantes moleculares de los genes relacionados con MinK, particularmente *KCNE2*, que producen o están implicadas en la patogénesis de LQT. Como alternativa, estos genes relacionados con MinK de un individuo a ensayar pueden explorarse con respecto a mutaciones que producen trastornos de canales iónicos, incluyendo LQT. La predicción de trastornos de canales iónicos, incluyendo LQT, permitirá a los expertos en la materia prevenir los trastornos usando la terapia médica existente. También está relacionada con la determinación de que HERG y MiRP1 (*KCNE2*) se ensamblan para formar canales de potasio I_{Kr} cardíacos.

Más específicamente, la presente invención está relacionada con mutaciones en gen *KCNE2* y con su uso en el diagnóstico de LQT. La presente invención está relacionada además con métodos para explorar en seres humanos la presencia de variantes del gen *KCNE2* que producen LQT. Como LQT ahora puede detectarse antes (es decir, antes de que aparezcan los síntomas) y de una manera más definitiva, los individuos que tienen LQT dispondrán de mejores opciones de tratamiento. La presente invención también está relacionada con métodos para explorar fármacos útiles en el tratamiento o prevención del LQT1. La presente invención está relacionada además con métodos para explorar fármacos con respecto a los efectos adversos sobre los canales iónicos. Finalmente, la presente invención está relacionada con la correlación de un genotipo con una interacción de fármaco, es decir con la farmacogenómica.

La presente invención proporciona métodos para explorar los genes relacionados con MinK, por ejemplo, el gen *KCNE2* para identificar mutaciones. Estos métodos pueden comprender además la etapa de amplificar una parte de los genes relacionados con MinK, por ejemplo, el gen *KCNE2*, y pueden incluir además una etapa de proporcionar una serie de polinucleótidos que son cebadores para la amplificación de dicha parte del gen *KCNE2*. El método es útil para identificar mutaciones para uso en el diagnóstico o pronóstico de trastornos de canales iónicos, tales como LQT, que está asociado con *KCNE2*.

La presente invención demuestra además que *KCNE2* (que codifica *KCNE2*) también está implicado en el LQT. La proteína *KCNE2* y HERG se ensamblan para formar un canal de K^+ . De esta manera, la presente invención proporciona métodos para explorar el gen *KCNE2* para identificar mutaciones. Estos métodos pueden comprender además la etapa

de amplificar una parte del gen *KCNE2*, y pueden incluir además la etapa de proporcionar una serie de polinucleótidos que son cebadores para la amplificación de dicha parte del gen *KCNE2*. El método es útil para identificar mutaciones para uso en el diagnóstico del LQT o el pronóstico de LQT.

5 La presente invención también está relacionada con un método para explorar candidatos de fármaco para identificar fármacos útiles para tratar o prevenir trastornos de canales iónicos, tales como el LQT. La exploración de fármacos para LQT se realiza por medio de la coexpresión de genes *HERG* y/o *KCNE2* mutantes en células, tales como oocitos, células de mamífero o animales transgénicos (por ejemplo, ratones knockout) y el ensayo del efecto de un candidato de fármaco sobre el canal I_{Kr} . El efecto se compara con la actividad del canal I_{Kr} de los genes *HERG* y *KCNE2* de tipo salvaje.

10 La presente invención está relacionada además con un método para explorar fármacos usados o contemplados para uso en el tratamiento o prevención del LQT u otros trastornos cardiovasculares o trastornos no cardiovasculares con respecto a efectos adversos sobre los canales iónicos, tales como el canal I_{Kr} . La exploración de fármacos se realiza por medio de la coexpresión de genes *HERG* y/o *KCNE2* en células, tales como oocitos o células de mamífero y el ensayo del efecto de un fármaco sobre el canal I_{Kr} . El efecto se compara con la actividad del canal I_{Kr} en ausencia del fármaco.

15 La invención finalmente está relacionada con un método para determinar el efecto de un genotipo en una reacción con un fármaco. Por ejemplo, el método puede correlacionar la presencia de un alelo particular con una reacción mejorada o adversa a un fármaco usado para tratar o prevenir un trastorno de canales iónicos, tal como el LQT.

20 La prueba de que el gen *KCNE2* está implicado en la aparición del LQT se obtiene encontrando secuencias en el ADN extraído de miembros emparentados afectados que crean productos del gen *KCNE2* anómalos o niveles anómalos de los productos génicos. Estos alelos de susceptibilidad a LQT se co-segregarán con la enfermedad en los parientes. También estarán presentes a una frecuencia mucho mayor en los individuos no emparentados con LQT que en los individuos de la población general. La clave es encontrar mutaciones que sean suficientemente graves como para producir una alteración evidente en la función normal del producto génico. Estas mutaciones pueden tomar varias formas. Las formas más severas serían mutaciones de desplazamiento de fase o deleciones grandes que harían que el gen codificara una proteína anómala o una que altere significativamente la expresión de la proteína. Las mutaciones de alteración menos graves incluirían pequeñas deleciones en fase y sustituciones de pares de bases no conservativas que tendrían un efecto significativo sobre la proteína producida, tales como cambios hacia o desde un residuo de cisteína, de un aminoácido básico a un aminoácido ácido o viceversa, de un aminoácido hidrófobo a un aminoácido hidrófilo o viceversa, u otras mutaciones que afectarían a la estructura secundaria o terciaria de la proteína. En general, no sería de esperar que las mutaciones silenciosas o las que producen sustituciones de aminoácidos conservativas alterasen la función de la proteína.

25 De acuerdo con el método de diagnóstico y pronóstico de la presente invención, se detecta la alteración del gen *KCNE2* de tipo salvaje. Además, el método puede realizarse detectando el gen *KCNE2* de tipo salvaje y confirmando la ausencia de una causa del LQT como resultado de este locus. La "alteración de un gen de tipo salvaje" incluye todas formas de mutaciones incluyendo deleciones, inserciones y mutaciones puntuales en las regiones codificante y no codificante. Las deleciones pueden ser del gen entero o sólo de una parte del gen. Las mutaciones puntuales pueden producir codones de terminación, mutaciones de desplazamiento de fase o sustituciones de aminoácidos. Son mutaciones somáticas las que se producen sólo en ciertos tejidos y no se heredan en la línea germinal. Pueden encontrarse mutaciones de la línea germinal en cualquiera de los tejidos corporales y son hereditarias. Los acontecimientos de mutaciones puntuales pueden producirse en regiones reguladoras, tales como en el promotor del gen, conduciendo a una pérdida o disminución de expresión del ARNm. Las mutaciones puntuales también pueden anular un procesamiento apropiado del ARN, ocasionando una pérdida de expresión del producto del gen *KCNE2*, o una reducción en la estabilidad del ARNm o la eficacia de traducción.

30 Las técnicas de diagnóstico útiles incluyen, pero sin limitación, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), secuenciación directa de ADN, análisis de PFGE, análisis de transferencia de Southern, análisis de conformación de una sola cadena (SSCA), ensayo de protección de RNasa, oligonucleótido con especificidad de alelo (ASO), análisis de transferencia puntual (dot blot) y PCR-SSCP, como se describe con detalle adicionalmente más adelante. También es útil la técnica desarrollada recientemente de la tecnología de microplacas de ADN.

35 La presencia de LQT puede averiguarse ensayando cualquier tejido de un ser humano con respecto a la existencia de mutaciones del gen *KCNE2*. Por ejemplo, una persona que ha heredado una mutación de *KCNE2* en la línea germinal sería propensa a desarrollar LQT. Esto puede determinarse ensayando el ADN de cualquier tejido del cuerpo de la persona. De forma más sencilla, puede extraerse sangre y extraerse el ADN de las células sanguíneas. Además, puede realizarse un diagnóstico prenatal ensayando células fetales, células placentarias o células amnióticas con respecto a mutaciones del gen *KCNE2*. La alteración de un alelo de *KCNE2* de tipo salvaje, por ejemplo, por mutación puntual o deleción, puede detectarse por cualquiera de los medios descritos en este documento.

40 Hay varios métodos que pueden usarse para detectar una variación de la secuencia de ADN. La secuenciación directa del ADN, la secuenciación manual o la secuenciación automática con fluorescencia pueden detectar una variación de la secuencia. Otra estrategia es el ensayo de polimorfismo de conformación de una sola cadena (SSCP) (Orita *et al.*, 1989). Este método no detecta todos los cambios de secuencia, especialmente si el tamaño del fragmento de

ADN es mayor de 200 pb, pero puede optimizarse para detectar la mayor parte de la variación de la secuencia de ADN. Un inconveniente es la reducida sensibilidad de la detección, pero el alto rendimiento posible con SSCP hace que sea una alternativa atractiva y viable a la secuenciación directa para la detección de mutaciones en una investigación. Los fragmentos que han cambiado la movilidad en geles de SSCP después se secuencian para determinar la naturaleza exacta de la variación de la secuencia de ADN. Otras estrategias basadas en la detección de desacoplamientos entre las dos cadenas de ADN complementarias incluyen la electroforesis en gel desnaturizante constante (CDGE) (Sheffield *et al.*, 1991), análisis de heterodúplex (HA) (White *et al.*, 1992) y escisión con desacoplamiento químico (CMC) (Grompe *et al.*, 1989). Ninguno de los métodos descritos anteriormente detectará grandes deleciones, duplicaciones o inserciones, ni detectará una mutación reguladora que afecte a la transcripción o traducción de la proteína. Otros métodos que podrían detectar estas clases de mutaciones, tales como un ensayo de truncamiento de proteínas o el ensayo asimétrico, detectan sólo tipos específicos de mutaciones y no detectarían mutaciones de sentido erróneo. En una revisión reciente de Grompe (1993) puede encontrarse una revisión de los métodos disponibles actualmente de detección de una variación de secuencia de ADN. Una vez conocida una mutación, puede utilizarse una estrategia de detección con especificidad de alelo, tal como una hibridación de oligonucleótidos con especificidad de alelo (ASO) para explorar rápidamente grandes números de otras muestras con respecto a esa misma mutación. Esta técnica puede utilizar sondas que están marcadas con nanopartículas de oro para producir un resultado de color visual (Elghanian *et al.*, 1997).

Puede realizarse un análisis preliminar rápido para detectar polimorfismos en secuencias de ADN examinando una serie de transferencias de Southern de ADN cortado con una o más enzimas de restricción, preferiblemente con un gran número de enzimas de restricción. Cada mancha de transferencia contiene una serie de individuos normales y una serie de casos de LQT. Las manchas de transferencia que presentan fragmentos de hibridación (diferentes en longitud del ADN de control cuando se sondean consecuencias próximas o que incluyen el locus de *KCNE2*) indican una posible mutación. Si se usan enzimas de restricción que producen fragmentos de restricción muy grandes, se emplea electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE).

La detección de mutaciones puntuales puede realizarse por clonación molecular de los alelos de *KCNE2* y secuenciación de los alelos usando técnicas bien conocidas en este campo. Además, los genes o porciones del gen pueden amplificarse, por ejemplo, por PCR u otra técnica de amplificación, y puede secuenciarse el gen amplificado o partes amplificadas del gen.

Hay seis métodos bien conocidos para un ensayo más completo, aunque todavía indirecto, para confirmar la presencia de un alelo de susceptibilidad: 1) análisis de conformación de una sola cadena (SSCP) (Orita *et al.*, 1989); 2) electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (DGGE) (Wartell *et al.*, 1990; Sheffield *et al.*, 1989); 3) ensayos de protección de RNasa (Pinkelstein *et al.*, 1990; Kinszler *et al.*, 1991); 4) oligonucleótidos con especificidad de alelo (ASO) (Conner *et al.*, 1983); 5) el uso de proteínas que reconocen desacoplamientos de nucleótidos tales como la proteína mutS de *E. coli* (Modrich, 1991); y 6) PCR con especificidad de alelo (Ruano and Kidd, 1989). En el caso de la PCR con especificidad de alelo, se usan cebadores que hibridan en sus extremos 3' con una mutación de *KCNE2* particular. Si no está presente la mutación particular, no se observa un producto de amplificación. También puede usarse la amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (ARMS) como se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente Europea N° 0332435 y en Newton *et al.*, 1989. También pueden detectarse inserciones y deleciones de genes por clonación, secuenciación y amplificación. Además, pueden usarse sondas de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el gen o genes marcadores circundantes para puntuar la alteración de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico. Este método es particularmente útil para explorar parientes de un individuo afectado con respecto a la presencia de la mutación encontrada en ese individuo. Pueden usarse otras técnicas para detectar inserciones y deleciones conocidas en este campo.

En los tres primeros métodos (SSCP, DGGE y ensayo de protección de RNasa), aparece una nueva banda electroforética. El SSCP detecta una banda que migra de forma diferente porque el cambio de secuencia produce una diferencia en el emparejamiento de bases intramolecular monocatenario. La protección de la ARNasa implica la escisión del polinucleótido mutante en dos o más fragmentos más pequeños. La DGGE detecta diferencias en las velocidades de migración de secuencias mutantes en comparación con secuencias de tipo salvaje, usando un gel en gradiente desnaturizante. En un ensayo de oligonucleótidos con especificidad de alelo se diseña un oligonucleótido que detecta una secuencia específica, y el ensayo se realiza detectando la presencia o ausencia de una señal de hibridación. En el ensayo de mutS, la proteína se une sólo a secuencias que contienen un desacoplamiento de nucleótido en un heterodúplex entre secuencias mutantes y de tipo salvaje.

Los desacoplamientos, de acuerdo con la presente invención, son dúplex de ácido nucleico hibridados en los que las dos cadenas no son complementarias al 100%. La falta de homología total puede deberse a deleciones, inserciones, inversiones o sustituciones. Puede usarse detección de desacoplamientos para detectar mutaciones puntuales en el gen o en su producto de ARNm. Aunque estas técnicas son menos sensibles que la secuenciación, son más fáciles de realizar en un gran número de muestras. Un ejemplo de una técnica de escisión de desacoplamientos es el método de protección de RNasa. En la práctica de la presente invención, el método implica el uso de una ribosonda marcada que es complementaria a la secuencia codificante del gen *KCNE2* de tipo salvaje humano. La ribosonda y el ARNm o ADN aislado a partir de la persona se templean (hibridan) entre sí y posteriormente se digieren con la enzima RNasa A que puede detectar algunos desacoplamientos en una estructura de ARN dúplex. Si se detecta un desacoplamiento por la RNasa A, lo escinde en el sitio de desacoplamiento. De esta manera, cuando la preparación de ARN templada se separa en un matriz de gel electroforético, si se ha detectado un desacoplamiento y se ha escindido por la RNasa

A, se verá un producto de ARN que es más pequeño que el ARN dúplex de longitud completa para la ribosonda y el ARNm o ADN. No es necesario que la ribosonda tenga la longitud completa del ARNm o el gen, sino que puede ser un segmento de cualquiera de ellos. Si la ribosonda comprende sólo un segmento del ARNm o del gen, será deseable usar varias de estas sondas para explorar la secuencia de ARNm entera con respecto a los desacoplamientos.

De una manera similar, pueden usarse sondas de ADN para detectar desacoplamientos por medio de escisión enzimática o química. Véase, por ejemplo, Cotton *et al.*, 1988; Shenk *et al.*, 1975; Novack *et al.*, 1986. Como alternativa, pueden detectarse desacoplamientos por cambios en la movilidad electroforética de dúplex desacoplados con respecto a dúplex acoplados. Véase, por ejemplo, Cariello, 1988. Con ribosondas o sondas de ADN, puede amplificarse el ARNm o ADN celular que podría contener una mutación usando PCR (véase más adelante) antes de la hibridación. También pueden detectarse cambios en el ADN del gen *KCNE2* usando hibridación de Southern, especialmente si los cambios son transposiciones toscas, tales como deleciones e inserciones.

También pueden explorarse secuencias de ADN del gen *KCNE2* que se han amplificado por medio del uso de PCR usando sondas con especificidad de alelo. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, conteniendo cada uno de ellos una región de la secuencia del gen que lleva una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede tener aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, correspondiendo a una parte de la secuencia del gen. Mediante el uso de una batería de estas sondas con especificidad de alelo, pueden explorarse productos de amplificación de PCR para identificar la presencia de una mutación identificada previamente en el gen. La hibridación de sondas con especificidad de alelo con secuencias de *KCNE2* amplificadas puede realizarse, por ejemplo, en un filtro de nailon. La hibridación con una sonda particular en condiciones de hibridación de alta rigurosidad indica la presencia de la misma mutación en el tejido que en la sonda con especificidad de alelo.

La técnica desarrollada recientemente de análisis de ácidos nucleicos por la tecnología de microplacas también es aplicable a la presente invención. En esta técnica, se crean literalmente miles de sondas oligonucleotídicas distintas en una matriz en una microplaca de silicio. El ácido nucleico a analizar se marca con fluorescencia y se hibrida con las sondas en la microplaca. También es posible estudiar interacciones de ácido nucleico-proteína usando estas microplacas de ácido nucleico. Usando esta técnica, se puede determinar la presencia de mutaciones o incluso la secuencia del ácido nucleico que se está analizando o se pueden medir los niveles de expresión de un gen de interés. El método es un método de procesamiento paralelo de muchas, incluso miles, de sondas de una vez y puede aumentar enormemente la velocidad de análisis. Se han publicado varios documentos que usan esta técnica. Algunos de éstos son Hacia *et al.*, 1996; Shoemaker *et al.*, 1996; Chee *et al.*, 1996; Lockhart *et al.*, 1996; DeRisi *et al.*, 1996; Lipshutz *et al.*, 1995. Este método ya se ha usado para explorar en personas mutaciones en el gen del cáncer de mama *BRCA1* (Hacia *et al.*, 1996). Esta nueva tecnología se ha revisado en un artículo nuevo en Chemical and Engineering News (Borman, 1996) y ha sido el objeto de una editorial (Editorial, Nature Genetics, 1996). Véase también Fodor (1997).

El ensayo más definitivo de mutaciones en un locus candidato es comparar directamente secuencias genómicas de *KCNE2* de pacientes con las de una población de control. Como alternativa, se podría secuenciar ARN mensajero después de la amplificación, por ejemplo, por PCR, eliminando de esta manera la necesidad de determinar la estructura de exónica del gen candidato.

Las mutaciones de pacientes que están fuera de la región codificante de *KCNE2* pueden detectarse examinando las regiones no codificantes, tales como intrones y secuencias reguladoras próximas o dentro de los genes. Se puede obtener una indicación precoz de que son importantes ciertas mutaciones en regiones no codificantes a partir de experimentos de transferencia de Northern que revelan moléculas de ARN mensajero de tamaño o abundancia anormal en pacientes en comparación con los individuos de control.

Puede detectarse una alteración de la expresión de ARNm de *KCNE2* por cualquier técnica conocida en este campo. Estas incluyen análisis de transferencia de Northern, amplificación por PCR y protección de RNasa. Una expresión disminuida del ARNm indica una alteración del gen de tipo salvaje. La alteración de genes de tipo salvaje también puede detectarse explorando con respecto a la alteración de la proteína *KCNE2* de tipo salvaje. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos inmunorreactivos con *KCNE2* para explorar un tejido. La falta de antígeno afín indicaría una mutación. También podrían usarse anticuerpos específicos para productos de alelos mutantes para detectar un producto génico mutante. Estos ensayos inmunológicos pueden realizarse en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Éstos incluyen transferencias de Western, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Puede usarse cualquier medio para detectar una proteína *KCNE2* alterada para detectar la alteración del gen *KCNE2* de tipo salvaje. Pueden usarse ensayos funcionales, tales como determinaciones de unión de proteínas. Además, pueden usarse ensayos que detectan la función bioquímica de *KCNE2*. El descubrimiento de un producto de un gen *KCNE2* mutante indica la alteración de un gen *KCNE2* de tipo salvaje.

También puede detectarse un gen o producto génico de *KCNE2* mutante en otras muestras corporales humanas, tales como suero, heces, orina y esputos. Las mismas técnicas descritas anteriormente para la detección de genes o productos génicos mutantes en tejidos pueden aplicarse a otras muestras corporales. Por medio de la exploración de estas muestras corporales, puede conseguirse un diagnóstico precoz sencillo para el LQT.

Los pares de cebadores de la presente invención son útiles para la determinación de la secuencia de nucleótidos de un alelo de *KCNE2* particular usando PCR. Los pares de cebadores de ADN monocatenarios para *KCNE2* pueden hibridarse con secuencias dentro o que rodean al gen *KCNE2* para cebar la síntesis de ADN de amplificación del

propio gen. Una serie completa de estos cebadores permite la síntesis de todos los nucleótidos de las secuencias codificantes del gen, es decir, los exones. La serie de cebadores preferiblemente permite la síntesis de secuencias de intrones y exones. También pueden usarse cebadores con especificidad de alelo. Estos cebadores hibridan sólo con alelos mutantes de *KCNE2* particulares, y por lo tanto sólo amplificarán un producto en presencia del alelo mutante como una plantilla.

Para facilitar la posterior clonación de secuencias amplificadas, los cebadores pueden tener secuencias de sitios de enzimas de restricción anexionadas a sus extremos 5'. De esta manera, todos los nucleótidos de los cebadores proceden de la secuencia de *KCNE2* o de secuencias adyacentes a *KCNE2*, excepto los pocos nucleótidos necesarios para formar un sitio de enzima de restricción. Estas enzimas y sitios son bien conocidos en la técnica. Los propios cebadores pueden sintetizarse usando técnicas que son bien conocidas en este campo. Generalmente, los cebadores pueden obtenerse usando máquinas de síntesis de oligonucleótidos que están disponibles en el mercado. Dada la secuencia de *KCNE2*, el diseño de cebadores particulares está dentro de la experiencia en la técnica. La presente invención mejora esto presentando datos sobre los límites intrón/exón permitiendo de esta manera diseñar cebadores para amplificar y secuenciar todas las regiones exónicas completamente.

Las sondas de ácidos nucleicos proporcionadas por la presente invención son útiles para varios fines. Pueden usarse en hibridación de Southern con ADN genómico y en el método de protección de RNasa para detectar mutaciones puntuales ya analizado anteriormente. Las sondas pueden usarse para detectar productos de amplificación de PCR. También pueden usarse para detectar desacoplamientos con el gen *KCNE2* o el ARNm usando otras técnicas.

Se ha descubierto que individuos con el gen *KCNE2* de tipo salvaje no tienen LQT. Sin embargo, ciertas mutaciones que interfieren con la función del producto del gen *KCNE2* están implicadas en la patogénesis del LQT. De esta manera, la presencia de un gen *KCNE2* alterado (o un mutante) que produce una proteína que tiene una pérdida de función, o una función alterada, produce directamente LQT que aumenta el riesgo de arritmias cardíacas. Para detectar una mutación del gen *KCNE2*, se prepara una muestra biológica y se analiza para determinar la diferencia entre la secuencia del alelo que se está analizando y la secuencia del alelo de tipo salvaje. Los alelos de *KCNE2* mutantes pueden identificarse inicialmente por cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. Los alelos mutantes después se secuencian para identificar la mutación específica del alelo mutante particular. Como alternativa, pueden identificarse inicialmente alelos mutantes identificando proteínas mutantes (alteradas), usando técnicas convencionales. Los alelos mutantes después se secuencian para identificar la mutación específica para cada alelo. Las mutaciones, especialmente las que conducen a una alteración de la función de la proteína, después se usan para los métodos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención.

También se ha descubierto que la proteína HERG se ensambla con la proteína MiRP1 (*KCNE2*). De esta manera, las mutaciones en *KCNE2* que interfieren en la función del producto del gen *KCNE2* están implicadas en la patogénesis del LQT. De esta manera, la presencia de un gen *KCNE2* alterado (o un mutante) que produce una proteína que tiene una pérdida de función, o una función alterada, produce directamente LQT, lo cual aumenta el riesgo de arritmias cardíacas. Para detectar una mutación del gen *KCNE2*, se prepara una muestra biológica y se analiza con respecto a una diferencia entre la secuencia del alelo que se está analizando y la secuencia del alelo de tipo salvaje. Los alelos de *KCNE2* mutantes pueden identificarse inicialmente por cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. Los alelos mutantes después se secuencian para identificar la mutación específica de las proteínas mutantes (alteradas) particulares, usando técnicas convencionales. Los alelos mutantes después se secuencian para identificar la mutación específica para cada alelo. Las mutaciones, especialmente las que conducen a una función alterada de la proteína, después se usan para los métodos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención.

Los Ejemplos describen varias características de la presente invención como las que se presentan a continuación. Los péptidos *KCNE* son una superfamilia emergente necesaria para el funcionamiento normal de los canales iónicos. La proteína MinK, codificada por *KCNE1*, tiene 129 aminoácidos, un solo segmento transmembrana y se expresa en numerosos tejidos (Takumi *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1993). Las mutaciones hereditarias de MinK están asociadas con LQTS y sordera congénita (Schulze-Bahr *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997; Tyson *et al.*, 1997; Duggal *et al.*, 1998). Se entiende la base molecular de estas alteraciones: los canales I_{Ks} , esenciales para el funcionamiento normal del corazón y el sistema auditivo, son conjuntos de MinK y KvLQT1, una subunidad formadora de poros (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Vetter *et al.*, 1996). Aunque los canales que contienen sólo subunidades KvLQT1 pueden funcionar en células experimentales, los canales I_{Ks} tienen cinéticas de activación y desactivación más lentas, una mayor conductancia en un solo canal, mayor afinidad por antiarrítmicos de Clase III y mayor sensibilidad a segundos mensajeros (Sanguinetti *et al.*, 1996; Busch *et al.*, 1997; Kaczmarek and Blumenthal, 1997; Sesti and Goldstein, 1998; Yang and Sigworth, 1998). Estas propiedades se deben a una asociación física íntima de MinK y subunidades KvLQT1 (Goldstein and Miller, 1991; Wang *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1997; Sesti and Goldstein, 1998; Tai and Goldstein, 1998). A pesar de su significado funcional y clínico, este tipo de complejo mixto se consideraba poco común ya que se desconocían homólogos de MinK, o subunidades que favorecieran una función similar.

En la presente memoria se ha delineado la localización cromosómica, la secuencia de ADNc y el producto previsto, el comportamiento de tipo salvaje y la asociación con arritmia del primer gen homólogo a *KCNE1* (MinK). MiRP1, codificada por *KCNE2*, tiene 123 aminoácidos, un solo segmento transmembrana previsto y se expresa en músculo cardíaco y esquelético. Al igual que MinK, MiRP1 se ensambla con una subunidad formadora de poros para crear complejos estables cuyos atributos funcionales se parecen a los de un canal de potasio cardíaco nativo. Aunque los complejos MinK/KvLQT1 recrean los comportamientos de los canales I_{Ks} , los complejos MiRP1/HERG recapitulan

los de los canales I_{Kr} . En comparación con los canales formados por subunidades HERG solas, los que contienen MiRP1 muestran alteraciones en la activación dependiente del voltaje alterada, cinéticas de desactivación, conductancia unitaria, sensibilidad a la regulación por K^+ externo y farmacología. En la forma mutante, MiRP1 está asociada con la arritmia cardíaca hereditaria y adquirida. Según se revela, MinK y MiRP1 son esenciales para la función normal de los canales iónicos cardíacos.

Los péptidos de *KCNE* se incorporan en una diversidad de conjuntos de ensamblaje que constituyen canales en las células nativas. La especificidad funcional se deduce de la ausencia de efectos cuando rMiRP1 se coexpresaba con siete subunidades diferentes de canales de K^+ en oocitos. La unión específica se indica por la asociación preferente de MiRP1 en lugar de MinK con HERG *in vitro* (Fig. 6), aunque se pueden formar conjuntos MinK/HERG (Fig. 6; McDonald *et al.*, 1997). Aunque parece probable un papel de los péptidos de *KCNE* en canales distintos de I_{Kr} e I_{Ks} , los estudios de MiRP2 humano y de ratón (*KCNE3*) y MiRP3 de ratón (*KCNE4*) han indicado únicamente que no alteran las corrientes de HERG o KvLQT1 ni activan subunidades de canales endógenas en los oocitos.

Los complejos MiRP1/HERG funcionan como los canales I_{Kr} cardíacos nativos. Se sabe que los canales formados únicamente con subunidades HERG difieren de los canales I_{Kr} nativos en la apertura, conductancia, regulación por K^+ y bloqueo por metanosulfonilidas (Sanguinetti *et al.*, 1995; Trudeau *et al.*, 1995; Spector *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998) y (Shibasaki, 1987; "Sanguinetti and Jurkiewicz", 1992; Yang *et al.*, 1994; Veldkamp *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1996; Howarth *et al.*, 1996). La idea de que los canales I_{Kr} nativos se forman por ensamblaje de subunidades MiRP1 y HERG es coherente con 6 observaciones presentadas en la presente memoria.

En primer lugar, la conductancia de un solo canal de canales que contienen MiRP1 es menor que la de canales de HERG, pero es igual que la de los canales I_{Kr} en cardiocitos humanos y de conejo aislados (Shibasaki, 1987; Veldkamp *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1997). En segundo lugar, los complejos MiRP1/HERG y los canales I_{Kr} en miocitos cardíacos murinos y humanos se desactivan 3 veces más rápido que los canales formados sólo de subunidades HERG (Yang *et al.*, 1994; Sanguinetti *et al.*, 1995; London *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). En tercer lugar, los complejos MiRP1/HERG, al igual que los canales I_{Kr} en miocitos ventriculares de cobaya y miocitos auriculares murinos, son menos sensibles a la regulación por K^+ externo que los canales de HERG (Shibasaki, 1987; Scamps and Carmeliet, 1989; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1992; Sanguinetti *et al.*, 1995; Yang and Roden, 1996; Yang *et al.*, 1997). En cuarto lugar, las subunidades MiRP1 y HERG se ensamblan de una forma estable. En quinto lugar, un rasgo característico de los canales I_{Kr} nativos es que el bloqueo por antiarrítmicos de Clase III de metanosulfonilida se realiza en dos fases, una fase rápida observada con el primer pulso de ensayo y una fase lenta (Carmeliet, 1992). Por el contrario, los canales de HERG requieren pulsos repetitivos hasta voltajes positivos para alcanzar el umbral de activación antes de que se desarrolle un bloqueo significativo (Spector *et al.*, 1996). Al igual que los canales I_{Kr} nativos en los miocitos cardíacos, los canales formados por el ensamblaje de hMiRP1 y HERG muestran un bloqueo de E-4031 bifásico - los complejos mixtos se inhiben significativamente con el primer pulso de ensayo y se relajan lentamente hasta el bloqueo de equilibrio (Fig. 7B, c) mientras que los canales formados sólo por subunidades HERG se inhiben únicamente después de pulsos de ensayo repetitivos (Fig. 7A). Finalmente, Q9E-hMiRP1 aumenta la sensibilidad a claritromicina de canales de MiRP1/HERG *in vitro* (Fig. 9). Se sabe que la claritromicina bloquea las corrientes de I_{Kr} en miocitos ventriculares caninos y de cobaya aislados y, a altas dosis, induce un intervalo QT prolongado y TdP en seres humanos (Daleau *et al.*, 1995; Antzelevitch *et al.*, 1996; Katapadi *et al.*, 1997). El hecho de que el mutante se aislara a partir de un paciente con Torsades de pointes (TdP) inducida por claritromicina y VF confirma la tesis de que los canales I_{Kr} cardíacos nativos se forman con hMiRP1.

hKCNE2 es un gen de susceptibilidad a arritmias. Los datos genéticos moleculares que confirman la hipótesis de que mutaciones en el gen de MiRP1 predisponen a arritmias incluye la identificación de 3 mutaciones de sentido erróneo asociadas con LQTS y/o VF. Se identificó Q9E-hMiRP1 en 1 de 20 individuos con arritmia inducida por fármaco. Se aislaron M54T-hMiRP1 e I57T-hMiRP1 independientemente en 1 de 230 individuos con arritmias hereditarias o esporádicas. Los datos no genéticos que confirman esta hipótesis incluyen las observaciones de que se sabe que la disfunción de I_{Kr} produce LQTS y susceptibilidad a arritmias, que MiRP1 y HERG se ensamblan para formar canales de tipo I_{Kr} y que las mutaciones asociadas con arritmias en *KCNE2* tienen efectos perjudiciales sobre los canales formados *in vitro*. Se ha rebatido la explicación alternativa de que estos son polimorfismos comunes.

Los mutantes de MinK y MiRP1 asociados con arritmias tienen efectos comunes. Cuatro mutantes de MinK se han asociado con LQTS hereditarios: T7I, D76N, S74L y TL58,59PP (Schulze-Bahr *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997; Tyson *et al.*, 1997; Duggal *et al.*, 1998). La formación de canales I_{Ks} con S74L y/o D76N-MinK reduce el flujo de K^+ (y prolonga el potencial de acción cardíaco) por desplazamiento de $V_{1/2}$ para la activación a voltajes más despolarizados, acelerando la desactivación (Splawski *et al.*, 1997; Sesti and Goldstein, 1998) y reduciendo la conductancia de un solo canal (Sesti and Goldstein, 1998). De una forma similar, los mutantes de MiRP1 asociados con la prolongación del intervalo QT reducen la corriente de K^+ aumentando la dependencia del voltaje de la activación y acelerando la desactivación. Las corrientes a través de los canales formados con Q9E-hMiRP1 se reducen adicionalmente en comparación con el tipo salvaje cuando se exponen a claritromicina, ya que son más sensibles al bloqueo por fármacos (Fig. 9).

Las mutaciones asociadas con arritmias en MiRP1, MinK, HERG y KvLQT1 producen cambios en la función de los canales de magnitud similar. Q9E-hMiRP1 impide la activación y aumenta la sensibilidad a antibióticos macrólidos (produciendo una reducción del 60% en la corriente con respecto al tipo salvaje a 0 mV con claritromicina 0,5 mM). M54T-hMiRP1 forma canales I_{Kr} que se desactivan dos veces más rápido que el tipo salvaje, mostrando una reducción

del 54% en $\tau_{\text{rápido}}$ (Tabla 1). De forma similar, mutaciones de pérdida de función en HERG y KvLQT1 produjeron una reducción del 50-80% en las corrientes máximas (Sanguinetti *et al.*, 1996; Wollnik *et al.*, 1997) mientras que otros mutantes de HERG asociados a LQT se aumentaron las velocidades de desactivación reduciendo el valor de $\tau_{\text{rápido}}$ del 49-84% (Chen *et al.*, 1999). Las mutaciones S74L y D76N-MiK asociadas con LQT forman canales I_{Ks} con una conductancia de un solo canal reducida un 40-70% y velocidades de desactivación que son un 33-75% más rápidas (Sesti and Goldstein, 1998). Por el contrario, T8A-hMiRP1 no estaba asociada con la enfermedad y funcionaba de forma parecida al tipo salvaje con la excepción de un cambio negativo de 8 mV en el $V_{1/2}$ para la activación. No es de esperar que produzca arritmia, ya que el alelo aumentaría la capacidad de los canales I_{Kr} para conseguir repolarización del miocardio.

La aparición de TdP durante el tratamiento con medicaciones que prolongan el potencial de acción cardiaca es impredecible. TdP es un riesgo reconocido del tratamiento con diversos agentes antiarrítmicos entre los que se incluyen quinidina (Roden *et al.*, 1986), sotalol (Hohnloser and Woosley, 1994) e ibutilida (Ellenbogen *et al.*, 1996), el anti-histamínico terfenadina (Woosley *et al.*, 1993), el agente procinético gastrointestinal cisaprida (Carlsson *et al.*, 1997) y los antibióticos macrólidos eritromicina (Daleau *et al.*, 1995; Antzelevitch *et al.*, 1996) y claritromicina (Kundu *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). En cada caso, los agentes disminuyen las corrientes de K^+ cardiacas, en algunos casos por inhibición de los canales I_{Kr} . Las características basales que identifican a los pacientes con riesgo de TdP inducida por fármaco incluyen una prolongación hereditaria del intervalo QT, hipocalemia, ser del sexo femenino y una velocidad cardiaca lenta, cada uno de los cuales prolonga la duración del potencial de acción; estas observaciones condujeron a Roden (1998) a desarrollar el concepto de una *reserva de repolarización*, es decir, un exceso de capacidad del miocardio de realizar una repolarización ordenada y rápida por mecanismos normales. Los factores de riesgo de TdP reducen esta reserva y hacen más probable la precipitación de arritmias por agentes de estrés adicionales.

De esta manera, un escenario verosímil para un intervalo QT prolongado inicialmente en el paciente portador de Q9E-hMiRP1 es la formación de canales que se activan menos fácilmente y, por lo tanto, pasan menos K^+ para realizar la repolarización de una forma oportuna. Tres factores adicionales que conducen a una reducción de la corriente de K^+ pueden haber predispuesto a este paciente a TdP y VF. En primer lugar, la claritromicina bloquea los canales I_{Kr} cardiacos; este efecto sería más pronunciado en los pacientes ya que los canales de Q9E-hMiRP1 son 3 veces más sensibles al fármaco. En segundo lugar, la hipocalemia conjunta disminuye la actividad del canal I_{Kr} y aumenta adicionalmente la inhibición por el antibiótico macrólido. En tercer lugar, el ser del sexo femenino es un factor de riesgo independiente, posiblemente debido a las diferencias específicas de sexo en la densidad de I_{Kr} , como se observa en miocitos ventriculares de conejo (Makkar *et al.*, 1993; Drici *et al.*, 1998; Ebert *et al.*, 1998). Los resultados de los presentes solicitantes confirman la idea de que la arritmia adquirida puede producirse como resultado de la herencia de una subunidad de canal mutante que reduce la capacidad de repolarización cardiaca pero se tolera bien hasta que los estímulos provocativos reducen adicionalmente la capacidad del miocardio de repolarizarse normalmente.

Definiciones

La presente invención emplea las siguientes definiciones y métodos de uso que, cuando es apropiado, hacen referencia a *KCNE2*. Sin embargo, estas definiciones y métodos de uso también son aplicables a *KCNE3* y *KCNE4*.

La “*Amplificación de Polinucleótidos*” utiliza métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de ligamiento (o reacción en cadena de la ligasa, LCR) y métodos de amplificación basados en el uso de la Q-beta replicasa. También son útiles la amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), la SDA termófila, y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (3SR o NASBA). Estos métodos son bien conocidos y se han puesto en práctica de forma generalizada en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202 e Innis *et al.*, 1990 (para PCR); Wu and Wallace, 1989 (para LCR); las Patentes de Estados Unidos 5.270.184 y 5.455.166 y Walker *et al.*, 1992 (para SDA); Spargo *et al.*, 1996 (para SDA termófila) y la Patente de Estados Unidos 5.409.818, Fahy *et al.*, 1991 y Compton, 1991 para 3SR y NASBA. Los reactivos y el hardware para realizar la PCR están disponibles en el mercado. Los cebadores útiles para amplificar secuencias de la región de *KCNE2* son preferiblemente complementarios e hibridan específicamente con secuencias de la región de *KCNE2* o en regiones que flanquean a una región diana. Las secuencias de *KCNE2* generadas por amplificación pueden secuenciarse directamente. Como alternativa, pero menos deseablemente, la secuencias o secuencias amplificadas pueden clonarse antes del análisis de secuencia. Scharf *et al.*, 1986, ha descrito un método para la clonación y el análisis de secuencia directos de segmentos genómicos amplificados enzimáticamente.

“*Polinucleótido de analito*” y “*cadena de analito*” se refieren a un polinucleótido mono- o bicatenario que se sospecha que contiene una secuencia diana y que puede estar presente en una diversidad de tipos de muestras, incluyendo muestras biológicas.

“*Anticuerpos*”. La presente invención también proporciona anticuerpos policlonales y/o monoclonales y fragmentos de los mismos, y equivalentes de unión inmunológicos de los mismos, que son capaces de unirse específicamente al polipéptido *KCNE2* y a fragmentos del mismo o a secuencias polinucleotídicas de la región de *KCNE2*. El término “*anticuerpo*” se usa para hacer referencia tanto a una entidad molecular homogénea como a una mezcla, tal como un producto sérico constituido por una pluralidad de entidades moleculares diferentes. Los polipéptidos pueden prepararse sintéticamente en un sintetizador de péptidos y acoplarse a una molécula portadora (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana) e inyectarse durante varios meses en conejos. El suero de conejo se ensaya con respecto a la inmunoreactividad con el polipéptido o fragmento de *KCNE2*. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inyectando

en ratones los polipéptidos proteicos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos monoclonales se explorarán por ELISA y se ensayarán con respecto a la inmunorreactividad específica con el polipéptido KCNE2 o fragmentos del mismo. Véase Harlow and Lane, 1988. Estos anticuerpos serán útiles en ensayos y como productos farmacéuticos.

Una vez que se ha obtenido una cantidad suficiente de polipéptido deseado, puede usarse para diversos fines. Un uso típico es la producción de anticuerpos específicos para la unión. Estos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden producirse por técnicas *in vitro* o *in vivo* bien conocidas en este campo. Para la producción de anticuerpos policlonales, se selecciona un sistema inmune diana apropiado, típicamente ratón o conejo. El antígeno sustancialmente purificado se presenta al sistema inmune de una forma determinada por métodos apropiados para el animal y por otros parámetros bien conocidos para los inmunólogos. Los sitios típicos de inyección son las almohadillas plantares, por vía intramuscular, intraperitoneal o intradérmica. Por supuesto, el ratón o el conejo pueden sustituirse por otras especies. Los anticuerpos policlonales después se purifican usando técnicas conocidas en este campo, ajustadas para la especificidad deseada.

Una respuesta inmunológica normalmente se ensaya con un inmunoensayo. Normalmente, estos inmunoensayos implican alguna purificación de una fuente de antígeno, por ejemplo, la producida por las mismas células y de la misma forma que el antígeno. En la técnica se conocen diversos métodos de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, 1988, o Goding, 1986.

Típicamente se obtendrán anticuerpos monoclonales con afinidades de 10^{-8} M⁻¹ o preferiblemente de 10^{-9} a 10^{-10} M⁻¹ o mayores por procedimientos convencionales como los descritos, por ejemplo, en Harlow and Lane, 1988 o Goding, 1986. En resumen, se seleccionarán los animales apropiados y se seguirá el protocolo de inmunización deseado. Después del periodo de tiempo apropiado, se escinden los bazo de estos animales y se fusionan células de bazo individuales, típicamente, con células de mieloma inmortalizadas en condiciones de selección apropiadas. Posteriormente, las células se separan clonalmente y los sobrenadantes de cada clon se ensayan con respecto a su producción de un anticuerpo apropiado específico para la región deseada del antígeno.

Otras técnicas adecuadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o, como alternativa, la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase Huse *et al.*, 1989. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán por unión, covalente o no covalente, a una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se presentan exhaustivamente tanto en la bibliografía científica como en la bibliografía de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de estos marcadores incluyen las patentes de Estados Unidos 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Además, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes (véase la Patente de Estados Unidos 4.816.567).

La expresión “*compañero de unión*” se refiere a una molécula capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, tal como por ejemplo un antígeno y un anticuerpo con especificidad de antígeno o una enzima y su inhibidor. En general, los compañeros de unión específicos deben unirse con una afinidad suficiente para inmovilizar el dúplex de copia de analito/cadena complementaria (en el caso de hibridación de polinucleótidos) en las condiciones de aislamiento. En la técnica se conocen compañeros de unión específicos e incluyen, por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas y cadenas polinucleotídicas complementarias. En el caso de compañeros de unión polinucleotídicos complementarios, los compañeros normalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente 15 bases y pueden tener una longitud de al menos 40 bases. Está bien reconocido por los expertos en la materia que también pueden usarse longitudes menores de 15 (por ejemplo, 8 bases), entre 15 y 40, y mayores de 40 bases. Los polinucleótidos pueden estar compuestos de ADN, ARN o análogos de nucleótidos sintéticos. Pueden identificarse otros compañeros de unión usando, por ejemplo, el ensayo de selección doble híbrido de levadura descrito en la presente memoria.

Una “*muestra biológica*” se refiere a una muestra de tejido o fluido que se sospecha que contiene un polinucleótido o polipéptido analito de un individuo, que incluye, pero sin limitación, por ejemplo, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, las secciones externas de la piel, tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, células sanguíneas, tumores, órganos, tejidos y muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*.

“*Codifica*”. Se dice que un polinucleótido “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, puede transcribirse y/o traducirse para producir el ARNm y/o el polipéptido o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico y la secuencia codificante puede deducirse a partir de la misma.

“*Aislado*” o “*sustancialmente puro*”. Un ácido nucleico “aislado” o “sustancialmente puro” (por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mixto) es uno que está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente a una secuencia o proteína humana nativa, por ejemplo ribosomas, polimerasas, y muchas otras secuencias y proteínas del genoma humano. La expresión incluye una secuencia de ácido nucleico o proteína que se ha retirado de su medio natural, e incluye aislados de ADN clonado o recombinante y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos.

“Alelo de *KCNE2*” se refiere, respectivamente, a alelos normales del locus de *KCNE2* así como a alelos de *KCNE2* que llevan variaciones que producen LQT.

“Locus de *KCNE2*”, “Gen *KCNE2*”, “Ácidos Nucleicos de *KCNE2*” o “Polinucleótido de *KCNE2*”, se refieren a polinucleótidos, estando todos ellos en la región de *KCNE2*, respectivamente, que probablemente se expresarán en tejido normal, produciendo ciertos alelos de los mismos LQT. Se entiende que el locus de *KCNE2* incluye secuencias codificantes, secuencias intermedias y elementos reguladores que controlan la transcripción y/o la traducción. Se entiende que el locus de *KCNE2* incluye todas las variaciones alélicas de la secuencia de ADN. Los términos “*KCNE2*” y “*MiRP1*” pueden usarse indistintamente. De forma similar, se entiende que el locus de *KCNE3* incluye secuencias codificantes, secuencias intermedias y elementos reguladores que controlan la transcripción y/o traducción. Se entiende que el locus *KCNE3* incluye todas las variaciones alélicas de la secuencia de ADN. Los términos “*KCNE3*” y “*MiRP2*” pueden usarse indistintamente. De forma similar, se entiende que el locus de *KCNE4* incluye secuencias codificantes, secuencias intermedias y elementos reguladores que controlan la transcripción y/o traducción. Se pretende que el locus de *KCNE4* incluya todas las variaciones alélicas de la secuencia de ADN. Los términos “*KCNE4*” y “*MiRP3*” pueden usarse indistintamente.

Estos términos, cuando se aplican a un ácido nucleico, se refieren a un ácido nucleico que codifica un polipéptido *KCNE2* humano, fragmento, homólogo o variante, incluyendo, por ejemplo, fusiones de proteínas o deleciones del mismo. Los ácidos nucleicos de la presente invención poseerán una secuencia que procede o es sustancialmente similar a un gen que codifica *KCNE2* natural o uno que tiene una homología sustancial con un gen que codifica *KCNE2* natural o una parte del mismo.

El gen *KCNE2* o el ácido nucleico de *KCNE2* incluye alelos normales del gen *KCNE2*, respectivamente, incluyendo alelos silenciosos que no tienen ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos del polipéptido *KCNE2* así como alelos que conducen a variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido *KCNE2* que no afectan sustancialmente a su función. Estos términos también incluyen alelos que tienen una o más mutaciones que afectan adversamente a la función del polipéptido *KCNE2*. Una mutación puede ser un cambio en la secuencia de ácido nucleico de *KCNE2* que produce un cambio perjudicial en la secuencia de aminoácidos del polipéptido *KCNE2*, dando como resultado una pérdida parcial o completa de la función de *KCNE2*, respectivamente, o puede ser un cambio en la secuencia de ácido nucleico que produce la pérdida de expresión de *KCNE2* eficaz o la producción de formas aberrantes del polipéptido *KCNE2*.

El ácido nucleico de *KCNE2* puede ser el mostrado en la SEC ID N°: 1 (humano) o en la SEC ID N°: 3 (rata) o puede ser un alelo como el descrito anteriormente o una variante o derivado que difiere del mostrado por un cambio que es uno o más de una adición, inserción, delección y sustitución de uno o más nucleótidos de la secuencia mostrada. Los cambios en la secuencia de nucleótidos pueden producir un cambio de aminoácidos a nivel de la proteína, o no, como se determina por el código genético. Se aplican consideraciones similares y un alcance similar a *KCNE3* humano (SEC ID N°: 5), *KCNE3* de ratón (SEC ID N°: 7), *KCNE4* humano (SEC ID N°: 9) y *KCNE4* de ratón (SEC ID N°: 11) como se describe en la presente memoria para *KCNE2*.

De esta manera, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o descrito en la presente memoria puede incluir una secuencia diferente de la secuencia mostrada en las SEC ID N°: 1 y 3 aunque codifique un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que se muestra en estas figuras. Es decir, los ácidos nucleicos de la presente invención incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético. Por otra parte, el polipéptido codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N°: 2 y 4. También se proporciona en la presente memoria el ácido nucleico que codifica un polipéptido que es una variante de secuencia de aminoácidos, derivado o alelo de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N°: 2 y 4.

El gen *KCNE2*, respectivamente, también se refiere a (a) cualquier secuencia de ADN que (i) hibrida con el complemento de las secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID N°: 1 (humana) o la SEC ID N°: 3 (rata) en condiciones muy rigurosas (Ausubel *et al.*, 1992) y (ii) codifica una funcionalidad de producto génico equivalente a *KCNE2* o (b) cualquier secuencia de ADN que (i) hibrida con el complemento de las secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos presentada en las SEC ID N°: 2 y 4 en condiciones menos rigurosas, tales como condiciones moderadamente rigurosas (Ausubel *et al.*, 1992) y (ii) codifica un producto génico funcionalmente equivalente a *KCNE2*. La invención también incluye moléculas de ácido nucleico que son los complementos de las secuencias descritas en la presente memoria.

Las composiciones de polinucleótidos de esta invención incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, y cadenas tanto con sentido como antisentido, y pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o modificadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo fosforotiotatos, fosforoditioatos, etc.), residuos colgantes (por ejemplo polipéptidos), intercalantes (por ejemplo acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquiladores y enlaces modificados (por ejemplo ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad de unirse a una secuencia designada por

la formación de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Estas moléculas son conocidas en este campo e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que enlaces fosfato en la cadena principal de la molécula se sustituyen por enlaces peptídicos.

5 La presente invención proporciona ácidos nucleicos recombinantes que constituyen todo o parte de la región de *KCNE2*. La construcción recombinante puede replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora. Como alternativa, la construcción recombinante puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula hospedadora. Dicho polinucleótido recombinante comprende un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que, gracias a su origen de manipulación, 1) no está asociado con todo o parte de un polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza; 2) está unido a un polinucleótido distinto de aquel con el que está asociado en la naturaleza; o 3) no se produce en la naturaleza. Cuando el ácido nucleico de acuerdo con la invención incluye ARN, la referencia a la secuencia mostrada debe considerarse la referencia al equivalente de ARN con la T sustituida por U.

15 Por lo tanto, en esta invención se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes que comprenden secuencias que no se producirían en la naturaleza. Aunque puede emplearse la secuencia de tipo salvaje, con frecuencia estará alterada, por ejemplo por delección, sustitución o inserción. Pueden explorarse bibliotecas de ADNc o genómicas de diversos tipos como fuentes naturales de los ácidos nucleicos de la presente invención, o estos ácidos nucleicos pueden proporcionarse por amplificación de secuencias residentes en el ADN genómico u otras fuentes naturales, por ejemplo por PCR. La elección de las bibliotecas de ADNc normalmente corresponde a una fuente de tejido que es abundante en 20 ARNm de las proteínas deseadas. Normalmente se prefieren bibliotecas de fagos, pero pueden usarse otros tipos de bibliotecas. Los clones de una biblioteca se extienden sobre placas, se transfieren a un sustrato para la exploración, se desnaturalizan y se tratan con sondas para determinar la presencia de secuencias deseadas.

Las secuencias de ADN usadas en esta invención normalmente comprenderán al menos aproximadamente cinco 25 codones (15 nucleótidos), más habitualmente al menos aproximadamente 7-15 codones y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 35 codones. También pueden estar presentes uno o más intrones. Este número de nucleótidos normalmente es aproximadamente la longitud mínima necesaria para una sonda satisfactoria que hibridaría específicamente con una secuencia codificante de *KCNE2*. En este contexto, pueden usarse oligómeros de tan solo 8 nucleótidos, más generalmente 8-17 nucleótidos para sondas, especialmente en relación con la tecnología de microplacas.

30 Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos se describen de forma general, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989 o Ausubel *et al.*, 1992. Los reactivos útiles para aplicar estas técnicas, tales como enzimas de restricción y similares, se conocen ampliamente en la técnica y están disponibles en el mercado en vendedores tales como New England BioLabs, Boehringer Mannheim, Amersham, Promega, U. S. Biochemicals, New England Nuclear, y varias 35 fuentes distintas. Las secuencias de ácido nucleico recombinantes usadas para producir proteínas de fusión de la presente invención pueden proceder de secuencias naturales o sintéticas. Muchas secuencias de genes naturales se pueden obtener a partir de diversos ADNc o de bibliotecas genómicas usando sondas apropiadas. Véase, GenBank, National Institutes of Health.

40 Como se usa en la presente memoria, una “parte” del locus o región o alelo de *KCNE2* se define como una zona que tiene un tamaño mínimo de al menos aproximadamente ocho nucleótidos, o preferiblemente de aproximadamente 15 nucleótidos, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, y puede tener un tamaño mínimo de al menos aproximadamente 40 nucleótidos. Esta definición incluye todos los tamaños en el intervalo de 8-40 45 nucleótidos así como un tamaño mayor de 40 nucleótidos. De esta manera, esta definición incluye ácidos nucleicos de 8, 12, 15, 20, 25, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500 nucleótidos, o ácidos nucleicos que tienen cualquier número de nucleótidos dentro de estos intervalos de valores (por ejemplo 9, 10, 11, 16, 23, 30, 38, 50, 72, 121, etc., nucleótidos), o ácidos nucleicos que tienen más de 500 nucleótidos. La presente invención incluye todos los nuevos ácidos nucleicos que tienen al menos 8 nucleótidos derivados de las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9 y 11, su complemento o secuencias de ácido nucleico funcionalmente equivalentes. La presente invención no incluye ácidos nucleicos que existen en la 50 técnica anterior. Es decir, la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que tienen al menos 8 nucleótidos derivados de las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 con la condición de que no incluya ácidos nucleicos que existen en la técnica anterior.

“Proteína *KCNE2*” o “polipéptido *KCNE2*” se refieren a una proteína o polipéptido codificado por el locus de 55 *KCNE2*, variantes o fragmentos del mismo. Los términos “*KCNE2*” y “*MiRP1*” se usan indistintamente. De forma similar, la proteína *KCNE3* se refiere a una proteína codificada por el locus de *KCNE3*, variantes y fragmentos del mismo. Los términos “*KCNE3*” y “*MiRP2*” se usan indistintamente. De forma similar, la proteína *KCNE4* se refiere a una proteína codificada por el locus de *KCNE3*, variantes y fragmentos del mismo. Los términos “*KCNE4*” y “*MiRP3*” se usan indistintamente. El término “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos y su equivalente y no se 60 refiere a una longitud específica del producto; de esta manera, dentro de la definición de polipéptido se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas. Este término tampoco se refiere o excluye modificaciones del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Dentro de la definición se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como 65 no naturales. Normalmente, estos polipéptidos tendrán una homología de al menos aproximadamente un 50% con la secuencia de *KCNE2* nativa, preferiblemente superior a aproximadamente un 90% y más preferiblemente tendrán una homología de al menos aproximadamente un 95%. También se incluyen proteínas codificadas por ADN que hibridan

en condiciones de rigurosidad alta o baja con ácidos nucleicos que codifican KCNE2 y polipéptidos o proteínas muy relacionadas recuperadas por antisueros contra proteínas KCNE2.

El polipéptido KCNE2 puede ser el mostrado en las SEC ID N°: 2 (humana) y 4 (rata) que puede estar en forma aislada y/o purificada, sin o sustancialmente sin material con el que está asociado de forma natural. El polipéptido, si se produce por expresión en una célula procariota o se produce sintéticamente, puede carecer del procesamiento postraducciona l nativo, tal como glicosilación. Como alternativa, la presente invención también está relacionada con polipéptidos que son variantes de secuencia, alelos o derivados del polipéptido KCNE2. Estos polipéptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos que difiere de la presentada en las SEC ID N°: 2 ó 4 por una o más de adiciones, sustituciones, deleciones o inserciones de uno o más aminoácidos. Estos polipéptidos preferidos tienen función de KCNE2. A KCNE3 humana (SEC ID N°: 6), KCNE3 de ratón (SEC ID N°: 8), KCNE4 humana (SEC ID N°: 10) y KCNE4 de ratón (SEC ID N°: 12) se les aplican consideraciones y alcances similares a los descritos en este documento para KCNE2.

Las variantes de sustitución típicamente contienen el cambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, tales como la estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o naturaleza anfipática de los residuos implicados. Son sustituciones preferidas las que son conservativas, es decir, un aminoácido se reemplaza por otro de forma y carga similar. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en este campo y típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y tirosina, fenilalanina.

Ciertos aminoácidos pueden sustituir a otros aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato o sitios de unión en proteínas que interaccionan con el polipéptido KCNE2. Como es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína la que define la actividad biológica funcional de esa proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica, y en su secuencia de ADN codificante subyacente, y sin embargo puede obtenerse una proteína con propiedades similares. Al realizar estos cambios puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Generalmente se entiende en la técnica la importancia del índice de aminoácidos hidrófobos para conferir una función biológica interactiva en una proteína (Kyte and Doolittle, 1982). Como alternativa, la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofilia. Generalmente se entiende en la técnica la importancia de la hidrofilia para conferir una función biológica interactiva de una proteína (Patente de Estados Unidos 4.554.101). El uso del índice hidrófobo o la hidrofilia para diseñar polipéptidos se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos 5.691.198.

La longitud de secuencias polipeptídicas comparadas para determinar la homología generalmente será de al menos aproximadamente 16 aminoácidos, normalmente de al menos aproximadamente 20 residuos, más habitualmente de al menos aproximadamente 24 residuos, típicamente al menos de aproximadamente 28 residuos y preferiblemente mayor de aproximadamente 35 residuos.

“Unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a su transcripción o expresión.

La expresión *peptidomimético* o *mimético* pretende hacer referencia a una sustancia que tiene la actividad biológica esencial del polipéptidos KCNE2. Un peptidomimético puede ser una molécula que contiene péptido que imita elementos de la estructura secundaria de la proteína (Johnson *et al.*, 1993). El fundamento subyacente al uso de peptidomiméticos es que el esqueleto peptídico de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de los aminoácidos de tal forma que se faciliten las interacciones moleculares, tales como las de anticuerpo y antígeno, enzima y sustrato o proteínas de andamiaje (“scaffolding”). Un peptidomimético se diseña para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural. Es posible que un mimético no sea un péptido, pero retendrá la actividad biológica esencial del polipéptido KCNE2 natural.

“Sondas”. Los polimorfismos de polinucleótidos asociados con alelos de *KCNE2* que predisponen a LQT se detectan por hibridación con una sonda polinucleotídica que forma un híbrido estable con la de la secuencia diana, en condiciones de hibridación y lavado de rigurosas a moderadamente rigurosas. Si se espera que las sondas sean perfectamente complementarias a la secuencia diana, se usarán condiciones de alta rigurosidad. Puede reducirse la rigurosidad de la hibridación si se espera algún desacoplamiento, por ejemplo, si se esperan variantes con el resultado de que la sonda no sea completamente complementaria. Se eligen condiciones que descarten uniones no específicas/adventicias, es decir que minimicen las interferencias. (Debe indicarse que a lo largo de esta descripción, si simplemente se dice que se usan condiciones “rigurosas” se entiende que se usan condiciones “muy rigurosas”). Como estas indicaciones identifican polimorfismos de ADN neutros así como mutaciones, estas indicaciones necesitan un análisis adicional para demostrar la detección de un alelo de susceptibilidad de *KCNE1*.

Las sondas para los alelos de *KCNE2* pueden proceder de secuencias de la región de *KCNE2*, su ADNc, secuencias funcionalmente equivalentes o sus secuencias complementarias. Las sondas pueden tener cualquier longitud adecuada, que incluya todo o una parte de la región de *KCNE2* y que permita hibridación específica con la región. Si la secuencia

diana contiene una secuencia idéntica a la de la sonda, las sondas pueden ser cortas, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 8-30 pares de bases, ya que el híbrido será relativamente estable incluso en condiciones rigurosas. Si se espera algún grado de desacoplamiento con la sonda, es decir, si se sospecha que la sonda hibridará con una región variante, puede emplearse una sonda de mayor tamaño que hibride con la secuencia diana con la especificidad requerida.

Las sondas incluirán un polinucleótido aislado unido a un marcador o molécula indicadora y puede usarse para aislar otras secuencias polinucleotídicas que tienen similitud de secuencia por métodos convencionales. En relación con las técnicas para preparar y marcar sondas, véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989 o Ausubel *et al.*, 1992. Pueden seleccionarse otros polinucleótidos similares usando polinucleótidos homólogos. Como alternativa, pueden sintetizarse o seleccionarse polinucleótidos que codifican estos polipéptidos o polipéptidos similares por medio del uso de la redundancia del código genético. Pueden introducirse diversas sustituciones de codones, por ejemplo, por cambios silenciosos (produciendo de esta manera diversos sitios de restricción) o para optimizar la expresión en un sistema particular. Pueden introducirse mutaciones para modificar las propiedades del polipéptido, quizás para cambiar la velocidad de degradación o renovación del polipéptido.

Las sondas que comprenden oligonucleótidos sintéticos u otros polinucleótidos de la presente invención pueden proceder de polinucleótidos mono- o bicatenarios recombinantes o naturales o pueden sintetizarse químicamente. Las sondas también pueden marcarse por traslación de mellas, reacción de relleno de Klenow u otros métodos conocidos en la técnica.

Se prefieren como sondas partes de la secuencia polinucleotídica que tienen al menos aproximadamente ocho nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 15 nucleótidos y menos de aproximadamente 9 kb, normalmente menos de aproximadamente 1,0 kb, de una secuencia polinucleotídica que codifica *KCNE2*. Esta definición, por lo tanto, incluye sondas con tamaños de 8 nucleótidos a 9000 nucleótidos. De esta manera, esta definición incluye sondas de 8, 12, 15, 20, 25, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 ó 500 nucleótidos o sondas que tienen cualquier número de nucleótidos dentro de estos intervalos de valores (por ejemplo, 9, 10, 11, 16, 23, 30, 38, 50, 72, 121, etc., nucleótidos), o sondas que tienen más de 500 nucleótidos. Las sondas también pueden usarse para determinar si un ARNm que codifica *KCNE2* está presente en una célula o tejido. La presente invención incluye todas las nuevas sondas que tienen al menos 8 nucleótidos procedentes de las SEC ID N°: 3, 5, 7, 9 y 11, sus complementarias o secuencias de ácido nucleico funcionalmente equivalentes. La presente invención no incluye sondas que existen en la técnica anterior. Es decir, la presente invención incluye todas las sondas que tienen al menos 8 nucleótidos procedentes de las SEC ID N°: 3, 5, 7, 9 y 11, con la condición de que no incluyan sondas que existen en la técnica anterior.

También son aplicables consideraciones y longitudes de nucleótidos similares a cebadores que pueden usarse para la amplificación de todo o parte del gen *KCNE2*. De esta manera, una definición de cebadores incluye cebadores de 8, 12, 15, 20, 25, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500 nucleótidos, o cebadores que tienen cualquier número de nucleótidos dentro de estos intervalos de valores (por ejemplo, 9, 10, 11, 16, 23, 30, 38, 50, 72, 121, etc. nucleótidos), o cebadores que tienen más de 500 nucleótidos, o cualquier número de nucleótidos entre 500 y 9000. Los cebadores también pueden usarse para determinar si el ARNm que codifica *KCNE2* está presente en una célula o tejido. La presente invención incluye todos los nuevos cebadores que tienen al menos 8 nucleótidos derivados del locus de *KCNE2* para amplificar el gen *KCNE2*, su complemento o secuencias de ácido nucleico funcionalmente equivalentes. La presente invención no incluye cebadores que existen en la técnica anterior. Es decir, la presente invención incluye todos los cebadores que tienen al menos 8 nucleótidos con la condición de que no incluya cebadores que existen en la técnica anterior.

Las expresiones “*modificaciones o fragmentos de proteína*” se proporcionan por la presente invención para polipéptidos *KCNE2* o fragmentos de los mismos que son sustancialmente homólogos a la secuencia estructural primaria pero que incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas *in vivo* o *in vitro* o que incorporan aminoácidos no habituales. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, marcaje, por ejemplo, con radionúclidos y diversas modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. En la técnica se conocen diversos métodos para marcar polipéptidos y sustituyentes o marcadores útiles para estos fines, e incluyen isótopos radioactivos tales como ³²P, ligandos que se unen a antilíngandos marcados (por ejemplo, anticuerpos), fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y antilíngandos que pueden servir como miembros de pares de unión específicos para un ligando marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el cebador, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible. En la técnica son bien conocidos métodos para marcar polipéptidos. Véase Sambrook *et al.*, 1989 o Ausubel *et al.*, 1992.

Aparte de polipéptidos con una longitud sustancialmente completa, la presente invención proporciona fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos. Las actividades biológicas significativas incluyen unión al ligando, actividad inmunológica y otras actividades biológicas características de los polipéptidos *KCNE2*. Las actividades inmunológicas incluyen tanto la función inmunogénica en un sistema inmune diana como la compartición de epítopos inmunológicos para la unión, sirviendo como un antígeno competidor o sustituto de un epítipo de la proteína *KCNE2*. Como se usa en la presente memoria, “epítipo” se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítipo podría comprender tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítipo. En general, un epítipo consiste en al menos cinco de estos aminoácidos, y más habitualmente consiste en al menos 8-10 de estos aminoácidos. En la técnica se conocen métodos para determinar la conformación espacial de estos aminoácidos.

Con fines inmunológicos, pueden usarse segmentos de polipéptidos con repeticiones en tándem como inmunógenos, produciendo de esta manera proteínas muy antigénicas. Como alternativa, estos polipéptidos servirán como competidores de alta eficacia para la unión específica. Más adelante se describe la producción de anticuerpos específicos para polipéptidos KCNE2 o fragmentos de los mismos.

La presente invención también proporciona polipéptidos de fusión, que comprenden polipéptidos KCNE2 y fragmentos. Los polipéptidos homólogos pueden ser fusiones entre dos o más secuencias polipeptídicas de KCNE2 o entre las secuencias de KCNE2 y una proteína relacionada. De forma similar, pueden construirse fusiones heterólogas que presentarían una combinación de propiedades o actividades de las proteínas derivadas. Por ejemplo, pueden “cambiarse” dominios de unión a ligando u otros dominios entre diferentes polipéptidos de fusión nuevos o fragmentos. Estos polipéptidos de fusión homólogos o heterólogos pueden presentar, por ejemplo, una fuerza o especificidad de unión alterada. Los compañeros de fusión incluyen inmunoglobulinas, β -galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A, β -lactamasa, alfa amilasa, alcohol deshidrogenasa y el factor de acoplamiento alfa de levaduras. Véase Godowski *et al.*, 1988.

Las proteínas de fusión típicamente se obtendrán por métodos de ácido nucleico recombinante, como se describe más adelante, o pueden sintetizarse químicamente. Se describen técnicas para la síntesis de polipéptidos, por ejemplo, en Merrifield (1963).

“*Purificación de proteínas*” se refiere a diversos métodos para el aislamiento de los polipéptidos KCNE2 a partir de otro material biológico, tales como células transformadas con ácidos nucleicos recombinantes que codifican KCNE2, y se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, estos polipéptidos pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad empleando, por ejemplo, los anticuerpos proporcionados por la presente invención. En la técnica son bien conocidos diversos métodos de purificación de proteínas e incluyen los descritos en Deutscher, 1990 y Scopes, 1982.

Las expresiones “*aislado*”, “*sustancialmente puro*” y “*sustancialmente homogéneo*” se usan indistintamente para describir una proteína o polipéptido que se ha separado de componentes que lo acompañan en su estado natural. Una proteína monomérica es sustancialmente pura cuando de al menos aproximadamente un 60 a un 75% de una muestra presenta una sola secuencia polipeptídica. Una proteína sustancialmente pura típicamente comprenderá de aproximadamente un 60 a un 90% P/P de una muestra de proteína, más habitualmente aproximadamente un 95% y preferiblemente tendrá una pureza mayor de aproximadamente un 99%. La pureza u homogeneidad de la proteína puede indicarse por varios medios bien conocidos en la técnica tales como electroforesis en gel de poliácridamida de una muestra de proteína, seguida de visualización de una sola banda de polipéptido tras la tinción del gel. Para ciertos fines, puede proporcionarse una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica que se utilizan para la purificación.

Una proteína KCNE2 carece sustancialmente de componentes con los que está asociada naturalmente cuando se separa de los contaminantes nativos que la acompañan en su estado natural. De esta manera, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que procede de forma natural carecerá sustancialmente de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede convertirse en una proteína sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en este campo.

Un polipéptido producido como un producto de expresión de una secuencia genética aislada y manipulada es un “polipéptido aislado” como se usa en la presente memoria, aunque se exprese en un tipo celular homólogo. Las formas obtenidas sintéticamente o moléculas expresadas por células heterólogas son intrínsecamente moléculas aisladas.

“*Ácido nucleico recombinante*” es un ácido nucleico que no se produce de forma natural o que se produce por la combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra manera. Esta combinación artificial con frecuencia se realiza por medios de síntesis química o por manipulación artificial de segmentos de ácidos nucleicos aislados, por ejemplo, por técnicas de ingeniería genética. Esto normalmente se hace para reemplazar un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservativo, mientras que típicamente introduce o elimina un sitio de reconocimiento de secuencia. Como alternativa, se realiza para unir entre sí segmentos de ácido nucleico de funciones deseadas para generar una combinación de funciones deseada.

“*Secuencias reguladoras*” se refiere a las secuencias que normalmente están dentro de 100 kb de la región codificante de un locus, pero también pueden estar más distantes de la región codificante, lo cual afecta a la expresión del gen (incluyendo la transcripción del gen y la traducción, corte y empalme, estabilidad o similar del ARN mensajero).

“*Homología o similitud sustancial*”. Un ácido nucleico o fragmento del mismo es “sustancialmente homólogo” (“o sustancialmente similar”) a otro si, cuando se alinea óptimamente (con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas) con el otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay una identidad de secuencias de nucleótidos de al menos aproximadamente un 60% de las bases nucleotídicas, normalmente de al menos aproximadamente un 70%, más habitualmente de al menos aproximadamente un 80%, preferiblemente de al menos aproximadamente un 90% y más preferiblemente de al menos aproximadamente un 95-98% de las bases nucleotídicas.

Identidad significa el grado de relación de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias polinucleotídicas determinado por la identidad del acoplamiento entre dos cadenas de dichas secuencias. La identidad puede calcularse fácilmente. Aunque existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, el término “identidad” es bien conocido para los expertos en la materia (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, los descritos en *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipman, D. (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar el mayor acoplamiento entre las dos secuencias ensayadas. Estos métodos están codificados en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete informático GCG (Devereux *et al.* (1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul *et al.* (1990); Altschul *et al.* (1997)).

Como alternativa, existe una homología (o similitud) sustancial cuando un ácido nucleico o fragmento del mismo hibrida con otro ácido nucleico (o una cadena complementaria del mismo) en condiciones de hibridación selectivas, con un cadena o su complementaria. Existe selectividad de hibridación cuando se produce hibridación que es sustancialmente más selectiva que la ausencia total de especificidad. Típicamente se producirá hibridación selectiva cuando haya una homología de al menos aproximadamente un 55% sobre un tramo de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de al menos aproximadamente un 65%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 75% y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente un 90%. Véase Kanehisa, 1984. La longitud de comparación de homología, como se describe, puede ser sobre tramos más largos y, en ciertas realizaciones, con frecuencia será sobre un tramo de al menos aproximadamente 9 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos y preferiblemente al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos.

La hibridación de ácidos nucleicos se verá afectada por condiciones tales como la concentración de sal, la temperatura o disolventes orgánicos, además de la composición de bases, la longitud de las cadenas complementarias y el número de desacoplamientos de bases nucleotídicas entre los ácidos nucleicos que hibridan, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Las condiciones de temperatura rigurosas generalmente incluirán temperaturas superiores a 30°C, típicamente superiores a 37°C y preferiblemente superiores a 45°C. Las condiciones de sal rigurosas normalmente serán concentraciones menores de 1000 mM, típicamente menores de 500 mM y preferiblemente menores de 200 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. Las condiciones de rigurosidad dependen de la longitud del ácido nucleico y de la composición de bases del ácido nucleico, y pueden determinarse por técnicas bien conocidas en este campo. Véase, por ejemplo, Wetmur y Davidson, 1968.

Las secuencias de sonda también pueden hibridar específicamente con ADN dúplex en ciertas condiciones para formar tríplex u otros complejos de ADN de mayor orden. La preparación de estas sondas y las condiciones de hibridación adecuadas son bien conocidas en este campo.

Las expresiones “homología sustancial” o “identidad sustancial”, cuando se hace referencia a polipéptidos, indican que el polipéptido o proteína en cuestión presenta una identidad de al menos aproximadamente un 30% con una proteína natural entera o una parte de la misma, normalmente una identidad de al menos aproximadamente un 70%, más habitualmente una identidad de al menos aproximadamente un 80%, preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente un 90% y más preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente un 95%.

La homología, en el caso de los polipéptidos, típicamente se mide usando un software de análisis de secuencia. Véase, por ejemplo, el Paquete de Software de Análisis de Secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares usando medidas de homología asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones. Las sustituciones conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

“Función sustancialmente similar” se refiere a la función de un ácido nucleico modificado o una proteína modificada, con referencia al ácido nucleico KCNE2 de tipo salvaje o el polipéptido KCNE2 de tipo salvaje. El polipéptido modificado será sustancialmente homólogo al polipéptido KCNE2 de tipo salvaje y tendrá sustancialmente la misma función. El polipéptido modificado puede tener una secuencia de aminoácidos alterada y/o puede contener aminoácidos modificados. Además de la similitud de la función, el polipéptido modificado puede tener otras propiedades útiles, tales como una mayor semivida. La similitud de la función (actividad) del polipéptido modificado puede ser sustancialmente igual que la actividad del polipéptido KCNE2 de tipo salvaje. Como alternativa, la similitud de la función (actividad) del polipéptido modificado puede ser mayor que la actividad del polipéptido KCNE2 de tipo salvaje. El polipéptido modificado se sintetiza usando técnicas convencionales o se codifica por un ácido nucleico modificado y se produce usando técnicas convencionales. El ácido nucleico modificado se prepara por técnicas convencionales.

Un ácido nucleico con una función sustancialmente similar a la función del gen KCNE2 de tipo salvaje produce la proteína modificada descrita anteriormente.

Un “fragmento”, “parte” o “segmento” de polipéptido es un tramo de residuos aminoacídicos de al menos aproximadamente 5 a 7 aminoácidos contiguos, con frecuencia de al menos aproximadamente 7 a 9 aminoácidos contiguos, típicamente de al menos aproximadamente 9 a 13 aminoácidos contiguos y, más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 a 30 o más aminoácidos contiguos.

Los polipéptidos de la presente invención, si son solubles, pueden acoplarse a un soporte en fase sólida, por ejemplo nitrocelulosa, nailon, materiales de relleno de columnas (por ejemplo perlas de Sepharose), perlas magnéticas, lana de vidrio, plástico, metal, geles poliméricos, células u otros sustratos. Estos soportes pueden tomar la forma, por ejemplo, de perlas, pocillos, tiras reactivas o membranas.

“Región diana” se refiere a una región del ácido nucleico que se amplifica y/o detecta. La expresión “secuencia diana” se refiere a una secuencia con la que una sonda o cebador formará un híbrido estable en condiciones deseadas.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética e inmunología. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1982; Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992; Glover, 1985; Anand, 1992; Guthrie y Fink, 1991. Se proporciona una descripción general de técnicas y materiales para la localización de genes humanos, incluyendo la localización del cromosoma 1 humano, por ejemplo, en White y Lalouel, 1988.

Preparación de ácidos nucleicos recombinantes o sintetizados químicamente; vectores, transformación, células hospedadoras

Grandes cantidades de los polinucleótidos de la presente invención pueden producirse por replicación en una célula hospedadora adecuada. Se incorporarán fragmentos polinucleotídicos naturales o sintéticos que codifican un fragmento deseado en construcciones de polinucleótidos recombinantes, normalmente construcciones de ADN, capaces de introducirse y replicarse en una célula procariota o eucariota. Normalmente, las construcciones polinucleotídicas serán adecuadas para la replicación en un hospedador unicelular, tal como una levadura o bacteria, pero también pueden destinarse a la introducción (con y sin integración dentro del genoma) en líneas de células cultivadas de mamífero, de células vegetales u otras líneas celulares eucariotas. La purificación de ácidos nucleicos producidos por los métodos de la presente invención se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989 o Ausubel *et al.*, 1992.

Los polinucleótidos de la presente invención también pueden producirse por síntesis química, por ejemplo, por el método de fosoramidita descrito por Beaucage and Caruthers (1981) o el método triéster de acuerdo con Matteucci and Caruthers (1981) y pueden realizarse en sintetizadores de oligonucleótidos automáticos comerciales. Puede obtenerse un fragmento bicatenario a partir del producto monocatenario de síntesis química por síntesis de la cadena complementaria e hibridación de las cadenas entre sí en condiciones apropiadas o por la adición de la cadena complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

Las construcciones polinucleotídicas preparadas para la introducción en un hospedador procariota o eucariota pueden comprender un sistema de replicación reconocido por el hospedador, incluyendo el fragmento polinucleotídico deseado que codifica el polipéptido deseado, y preferiblemente también incluirá secuencias reguladoras de la iniciación de la transcripción y traducción unidas operativamente al segmento codificante del polipéptido. Los vectores de expresión pueden incluir, por ejemplo, un origen de replicación o secuencias de replicación autónoma (ARS) y secuencias de control de la expresión, un promotor, un potenciador y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminadoras de la transcripción y secuencias estabilizadoras del ARNm. Estos vectores puede prepararse por medio de técnicas recombinantes convencionales bien conocidas en este campo y descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989 o Ausubel *et al.*, 1992.

Se seleccionará un promotor apropiado y otras secuencias de vectores necesarias para que sean funcionales en el hospedador y pueden incluir, cuando sea apropiado, las asociadas de forma natural con el gen KCNE2. Se describen ejemplos de combinaciones aceptables de líneas celulares y vectores de expresión en Sambrook *et al.*, 1989 o Ausubel *et al.*, 1992; véase también, por ejemplo, Metzger *et al.*, 1988. En la técnica se conocen muchos vectores útiles y pueden obtenerse a partir de vendedores tales como Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, y otros. En hospedadores procariotas pueden usarse promotores tales como los promotores de trp, lac y promotores de fagos, promotores de ARNt y promotores de enzimas glicolíticas. Los promotores útiles de levaduras incluyen regiones promotoras para la metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas tales como enolasa o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa, y otras. También se describen vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levaduras en Hitzeman *et al.*, documento EP 73.675A. Los promotores de mamífero no nativos apropiados podrían incluir los promotores tardío y temprano de SV10 (Fiers *et al.*, 1978) o promotores derivados del virus de la leucemia murina de Molony, virus de tumores de ratón, virus de sarcoma aviar, adenovirus II, virus del papiloma bovino o polioma. Los promotores de insecto pueden proceder de baculovirus. Además, la construcción puede unirse a un gen amplificable (por ejemplo, DHFR) de forma que puedan realizarse múltiples copias del gen. En relación con secuencias potenciadoras y otras secuencias de control de la expresión apropiadas, véase también *Enhancers and Eukaryotic Gene Expression*, Cold Spring Harbor Press,

Cold Spring Harbor, New York (1983). Véanse también, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.691.198; 5.735.500; 5.747.469 y 5.436.146.

Aunque estos vectores de expresión pueden replicar de forma autónoma, también pueden replicar al insertarse en el genoma de la célula hospedadora, por métodos bien conocidos en la técnica.

Los vectores de expresión y clonación probablemente contendrán un marcador de selección, un gen que codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de una célula hospedadora transformada con el vector. La presencia de este gen asegura el crecimiento sólo de las células hospedadoras que expresan los insertos. Los genes de selección típicos codifican proteínas que a) confieren resistencia a antibióticos u otras sustancias tóxicas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato, etc., b) complementan deficiencias auxotróficas, o c) suministran nutrientes clínicos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa en el caso de bacilos. La elección del marcador de selección apropiado dependerá de la célula hospedadora, y en la técnica se conocen bien marcadores apropiados para diferentes hospedadores.

Los vectores que contienen los ácidos nucleicos de interés pueden transcribirse *in vitro* y el ARN resultante puede introducirse en la célula hospedadora por métodos bien conocidos, por ejemplo por inyección (véase, Kubo *et al.*, 1988), o los vectores pueden introducirse directamente en células hospedadoras por métodos bien conocidos en la técnica, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular, incluyendo electroporación; transfección empleando cloruro cálcico, cloruro de rubidio y fosfato cálcico, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; infección (cuando el vector es un agente infeccioso, tal como un genoma retroviral); y otros métodos. Véase, en general, Sambrook *et al.*, 1989 and Ausubel *et al.*, 1992. La introducción de los polinucleótidos en la célula hospedadora por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, los descritos anteriormente, se denominará en la presente memoria "transformación". Se entiende que las células en las que se han introducido los ácidos nucleicos descritos anteriormente también incluyen la descendencia de dichas células.

Pueden prepararse grandes cantidades de los ácidos nucleicos y polipéptidos de la presente invención expresando el ácido nucleico de *KCNE2* o partes del mismo en vectores u otros vehículos de expresión en células hospedadoras procariotas o eucariotas compatibles. Los hospedadores procariotas usados más comúnmente son cepas de *Escherichia coli*, aunque también pueden usarse otros procariotas tales como *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas*.

También pueden ser útiles células hospedadoras de mamífero u otras células hospedadoras eucariotas, tales como las de levadura, hongos filamentosos, plantas, insectos o especies de anfibios o aves, para la producción de las proteínas de la presente invención. La propagación de células de mamífero en cultivo es bien conocida *per se*. Véase Jakoby and Pastan (eds.) (1979). Son ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero usadas comúnmente las células VERO y HeLa, células de ovario de hámster Chino (CHO) y líneas celulares WI38, BHK y COS, aunque el experto en la materia apreciará que pueden ser apropiadas otras líneas celulares, por ejemplo, para proporcionar una mayor expresión, patrones de glicosilación deseables u otras características. Un ejemplo de una línea celular de insectos usada comúnmente es SF9.

Los clones se seleccionan usando marcadores que dependen del modo de la construcción del vector. El marcador puede estar en la misma molécula de ADN o en una molécula de ADN diferente, preferiblemente en la misma molécula de ADN. En hospedadores procariotas, el transformante puede seleccionarse, por ejemplo, por resistencia a ampicilina, tetraciclina u otros antibióticos. La producción de un producto particular basándose en la sensibilidad a la temperatura también puede servir como un marcador apropiado.

Las células procariotas o eucariotas transformadas con los polinucleótidos de la presente invención serán útiles no sólo para la producción de los ácidos nucleicos y polipéptidos de la presente invención, sino también, por ejemplo, para estudiar las características de polipéptidos *KCNE2*.

Las sondas y cebadores basados en la secuencia del gen *KCNE2* descrito en la presente memoria se usan para identificar proteínas y secuencias del gen *KCNE2* homólogas en otras especies. Estas secuencias génicas y proteínas se usan en los métodos de diagnóstico/pronóstico, terapéuticos y de selección de fármacos descritos en la presente memoria para la especie a partir de la cual se han aislado.

Métodos de Uso: Exploración de Fármacos

La invención es particularmente útil para explorar compuestos por medio del uso de proteínas *KCNE2*, *KCNE3* o *KCNE4* en células transformadas, oocitos transfectados o animales transgénicos. Como mutaciones en la proteína *KCNE2* pueden alterar el funcionamiento del canal de potasio I_{Ks} cardíaco, se exploran fármacos candidatos para comprobar los efectos sobre el canal usando oocitos o usando células que contienen una proteína *KCNE2* normal y una proteína *HERG* mutante, respectivamente, o una proteína *HERG* mutante y una proteína *KCNE2* mutante. El fármaco se añade a las células en cultivo, por ejemplo, células transformadas de forma estable, o se administra a un animal transgénico, por ejemplo, un ratón knockout, y se compara el efecto sobre la corriente inducida del canal de potasio I_{Ks} con la corriente inducida de una célula o animal que contiene la proteína *HERG* y *KCNE2* de tipo salvaje. Los candidatos de fármaco que alteran la corriente inducida a un nivel más normal son útiles para tratar o prevenir el LQT. En los ejemplos se describen métodos electrofisiológicos adecuados que pueden usarse para la exploración de fármacos. Estos métodos pueden aplicarse a oocitos o células transformadas establemente. De esta manera, puede

determinarse el efecto de los fármacos sobre los canales iónicos dependientes de voltaje que incluyen KCNE2, KCNE3 o KCNE4.

Esta invención es particularmente útil para explorar compuestos usando el polipéptido KCNE2 o un fragmento de unión del mismo en cualquiera de una diversidad de técnicas de exploración de fármacos.

El polipéptido KCNE2 o fragmento empleado en dicho ensayo puede estar libre en solución, estar fijado a un soporte sólido o llevarse sobre una superficie celular. Un método de exploración de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman de forma estable con polinucleótidos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento, preferiblemente en ensayos de unión competitiva. Dichas células, en forma viable o fijada, pueden usarse para ensayos de unión convencionales. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre un polipéptido KCNE2 o un fragmento y el agente que se va a ensayar, o examinar el grado en el que se interfiere en la formación de un complejo entre un polipéptido KCNE2 o un fragmento y un ligando conocido por el agente que se está ensayando.

De esta manera, la presente invención proporciona métodos de exploración de fármacos que comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido KCNE2 o un fragmento del mismo y ensayar (i) con respecto a la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido KCNE2 o el fragmento, o (ii) con respecto a la presencia de un complejo entre el polipéptido KCNE2 o el fragmento y un ligando, por métodos bien conocidos en la técnica. En estos ensayos de unión competitiva, el polipéptido KCNE2 o el fragmento típicamente está marcado. El polipéptido KCNE2 o fragmento libre se separa del que está presente en un complejo proteína:proteína, y la cantidad de marcador libre (es decir no complejo) es una medida de la unión del agente que se está ensayando a KCNE2 o su interferencia con la unión de KCNE2:ligando, respectivamente. También se puede medir la cantidad de KCNE2 unido, en lugar de libre. También es posible marcar el ligando en lugar del KCNE2 y medir la cantidad de ligando que se une a KCNE2 en presencia y en ausencia del fármaco que se está ensayando.

Otra técnica para la exploración de fármacos proporciona una exploración de alto rendimiento de compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada por los polipéptidos KCNE2 y se describe con detalle en Geysen (publicación de la solicitud de patente PCT WO 84/03564). En resumen, se sintetizan grandes números de compuestos de ensayo peptídicos pequeños diferentes en un sustrato sólido, tal como pasadores de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con polipéptido KCNE2 y se lavan. Después se detecta el polipéptido KCNE2 unido por métodos bien conocidos en la técnica.

El KCNE2 purificado puede aplicarse directamente como un recubrimiento sobre placas para uso en las técnicas de exploración de fármacos mencionadas anteriormente. Sin embargo, pueden usarse anticuerpos no neutralizadores contra el polipéptido para capturar anticuerpos para inmovilizar el polipéptido KCNE2 sobre la fase sólida.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de exploración de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizadores capaces de unirse específicamente al polipéptido KCNE2 compiten con un compuesto de ensayo por la unión al polipéptido KCNE2 o fragmentos del mismo. De esta manera, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos del polipéptido KCNE2.

Los métodos de exploración anteriores no se limitan a ensayos que emplean sólo KCNE2, sino que también son aplicables al estudio de complejos KCNE2-proteína. Se analiza el efecto de los fármacos sobre la actividad de este complejo.

De acuerdo con estos métodos, los siguientes ensayos son ejemplos de ensayos que pueden usarse para explorar candidatos de fármacos.

Un KCNE2 mutante (*per se* o como parte de una proteína de fusión) se mezcla con una proteína de tipo salvaje (*per se* o como parte de una proteína de fusión) a la que se une KCNE2 de tipo salvaje. Esta mezcla se realiza tanto en presencia de un fármaco como en ausencia del fármaco, y se mide la cantidad de unión del KCNE2 mutante con la proteína de tipo salvaje. Si la cantidad de la unión es mayor en presencia de dicho fármaco que en ausencia de dicho fármaco, el fármaco es un candidato de fármaco para tratar el LQT debido a una mutación en *KCNE2*.

Un KCNE2 de tipo salvaje (*per se* o como parte de una proteína de fusión) se mezcla con una proteína de tipo salvaje (*per se* o como parte de una proteína de fusión) a la que se une KCNE2 de tipo salvaje. Esta mezcla se realiza tanto en presencia de un fármaco como en ausencia del fármaco, y se mide la cantidad de unión del KCNE2 de tipo salvaje con la proteína de tipo salvaje. Si la cantidad de unión es mayor en presencia de dicho fármaco que en ausencia de dicho fármaco, el fármaco es un candidato de fármaco para tratar el LQT debido a una mutación en *KCNE2*.

Una proteína mutante, que como proteína de tipo salvaje se une a KCNE2 (*per se* o como parte de una proteína de fusión) se mezcla con un KCNE2 de tipo salvaje (*per se* o como parte de una proteína de fusión). Esta mezcla se realiza tanto en presencia de un fármaco como en ausencia del fármaco, y se mide la cantidad de unión de la proteína mutante con el KCNE2 de tipo salvaje. Si la cantidad de unión es mayor en presencia de dicho fármaco que en ausencia de dicho fármaco, el fármaco es un candidato de fármaco para el tratamiento del LQT debido a una mutación en el gen que codifica la proteína.

Métodos de Uso: Farmacogenómica

Las moléculas de KCNE2 (así como las moléculas de KCNE3 y KCNE4) de la presente invención, así como agentes o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad de KCNE2 (por ejemplo, expresión del gen de KCNE2) identificados por un ensayo de exploración descrito en la presente memoria, pueden administrarse a individuos para tratar (profiláctica o terapéuticamente) trastornos asociados con una actividad aberrante de KCNE2. Junto con dicho tratamiento, puede considerarse la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto o fármaco extraño). Las diferencias en el metabolismo de los agentes terapéuticos puede conducir a una toxicidad severa o fallo terapéutico por medio de la alteración de la relación entre la dosis y la concentración sanguínea del fármaco farmacológicamente activo. De esta manera, un médico o clínico puede considerar la aplicación del conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes para determinar si se administra una molécula de KCNE2 o un modulador de KCNE2, así como la adaptación de la dosificación y/o régimen terapéutico de tratamiento con una molécula de KCNE2 o un modulador de KCNE2.

La farmacogenómica aborda variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a fármacos debido a una alteración de la eliminación del fármaco y una acción anómala del fármaco en personas afectadas. Véase, por ejemplo, Eichelbaum *et al.* (1996) and Linder *et al.* (1997). En general, pueden diferenciarse dos tipos de condiciones farmacogenéticas. Condiciones genéticas transmitidas como un solo factor que alteran la manera en la que los fármacos actúan sobre el cuerpo (acción alterada del fármaco) o condiciones genéticas transmitidas como factores individuales que alteran la manera en la que actúa el cuerpo sobre los fármacos (metabolismo alterado del fármaco). Estas condiciones farmacogenéticas pueden producirse como defectos genéticos raros o como polimorfismos que se producen comúnmente. Por ejemplo, la deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía hereditaria común en la que la complicación clínica principal es la hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (antimaláricos, sulfonamidas, analgésicos, nifuranos) y el consumo de habas.

Una estrategia farmacogenómica para identificar genes que predicen la respuesta a fármacos, conocida como “asociación a nivel del genoma”, se basa principalmente en un mapa de alta resolución del genoma humano que consiste en marcadores relacionados con genes ya conocidos (por ejemplo, un mapa de marcadores genéticos “bialélicos” que consiste en 60.000-100.000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, teniendo cada uno de ellos dos variantes). Dicho mapa genético de alta resolución puede compararse con un mapa del genoma de cada uno de un número estadísticamente significativo de pacientes que participan en un ensayo de fármacos de Fase II/III para identificar marcadores asociados con una respuesta al fármaco o efecto secundario observado particular. Como alternativa, dicho mapa de alta resolución puede generarse a partir de una combinación de unos diez millones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) conocidos en el genoma humano. Como se usa en la presente memoria, un “SNP” es una alteración común que se produce en una sola base nucleotídica en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP puede aparecer una vez cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar implicado en un proceso de enfermedad, sin embargo, la inmensa mayoría pueden no estar asociados con ninguna enfermedad. Dado un mapa genético basado en la aparición de dichos SNP, los individuos pueden agruparse en categorías genéticas dependiendo de un patrón particular de SNP en su genoma individual. De esta manera, pueden adaptarse los regímenes de tratamiento a grupos de individuos genéticamente similares, teniendo en cuenta rasgos que pueden ser comunes entre estos individuos genéticamente similares.

Como alternativa, puede utilizarse un método denominado “estrategia de gen candidato” para identificar genes que predicen una respuesta a un fármaco. De acuerdo con este método, si se conoce un gen que codifica un fármaco diana (por ejemplo, una proteína KCNE2 o un receptor de KCNE2 de la presente invención), todas las variantes comunes de ese gen pueden identificarse de una forma bastante fácil en la población y puede determinarse si tener una versión del gen frente a otra está asociado con una respuesta particular al fármaco.

Como realización ilustrativa, la actividad de enzimas que metabolizan fármacos es un determinante principal tanto de la intensidad como de la duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan fármacos (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y las enzimas del citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos del fármaco esperados o muestran una respuesta exagerada al fármaco y toxicidad grave después de tomar una dosis convencional y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador rápido (EM, del inglés “extensive metabolizer”) y el metabolizador lento (PM, del inglés “poor metabolizer”). La prevalencia de PM es diferente entre las diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica CYP2D6 es muy polimórfico y se han identificado varias mutaciones en PM, conduciendo todas ellas a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores lentos de PYP2D6 y CYP2C19 experimentan con bastante frecuencia una respuesta exagerada al fármaco y efectos secundarios cuando reciben dosis convencionales. Si un metabolito es el residuo terapéutico activo, el PM no muestra respuesta terapéutica, como se demuestra para el efecto analgésico de la codeína mediado por su metabolito formado por CYP2D6 morfina. El otro extremo son los denominados metabolizadores ultrarrápidos que no responden a las dosis convencionales. Recientemente, se ha identificado que la base molecular del metabolismo ultrarrápido se debe a la amplificación del gen de CYP2D6. Ciertos análisis similares con los péptidos relacionados con MinK correlacionan el genotipo y los efectos del fármaco.

Como alternativa, puede utilizarse un método denominado “perfilado de expresión génica” para identificar genes que predicen la respuesta a un fármaco. Por ejemplo, la expresión génica de un animal al que se le ha dosificado

un fármaco (por ejemplo, una molécula de KCNE2 o un modulador de KCNE2 de la presente invención) puede proporcionar una indicación de si se han activado rutas génicas relacionadas con la toxicidad.

Puede usarse la información generada a partir de más de una de las estrategias farmacogenómicas anteriores para determinar los regímenes de dosificación y tratamiento apropiados para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o fallo terapéutico y por lo tanto mejorar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata un sujeto con una molécula de KCNE2 o un modulador de KCNE2, tal como un modulador identificado por uno de los ensayos de exploración ilustrativos descritos en la presente memoria.

Métodos de Uso: Diseño Racional de Fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés o de moléculas pequeñas con las que interactúan (por ejemplo agonistas, antagonistas, antagonistas, inhibidores) para crear fármacos que, por ejemplo, sean formas más activas o estables del polipéptido o que, por ejemplo, mejoren o interfieran con la función de un polipéptido *in vivo*. Varias estrategias para uso en el diseño racional de fármacos incluyen el análisis de la estructura tridimensional, exploraciones de alanina, creación de modelos moleculares y uso de anticuerpos anti-id. Estas técnicas son bien conocidas para los expertos en la material, incluyendo las descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.837.492; 5.800.998 y 5.891.628, incorporadas cada una de ellas en la presente memoria como referencia.

De esta manera, se pueden diseñar fármacos que tengan, por ejemplo, mejor actividad o estabilidad del polipéptido KCNE2 o que actúen como inhibidores, agonistas, antagonistas, etc. de la actividad del polipéptido KCNE2. Gracias a la disponibilidad de secuencias de *KCNE2* clonadas, pueden proporcionarse cantidades suficientes del polipéptido KCNE2 para realizar estudios analíticos tales como cristalografía de rayos x. Además, el conocimiento de las secuencias de la proteína KCNE2 proporcionadas en la presente memoria guiará a los que emplean técnicas informáticas de creación de modelos en lugar de, o además de, la cristalografía de rayos x.

El polipéptido de la invención también puede usarse para explorar compuestos desarrollados como resultado de la tecnología de bibliotecas combinatorias. La tecnología de bibliotecas combinatorias proporciona una forma eficaz de ensayar un amplio número potencial de diferentes sustancias con respecto a la capacidad de modular la actividad de un polipéptido. Estas bibliotecas y su uso se conocen en la técnica. Se prefiere el uso de bibliotecas de péptidos. Véase, por ejemplo, el documento WO 97/02048.

En resumen, un método para explorar una sustancia que modula la actividad de un polipéptido puede incluir poner en contacto una o más sustancias de ensayo con el polipéptido en un medio de reacción adecuado, ensayar la actividad del polipéptido tratado y comparar esa actividad con la actividad del polipéptido en un medio de reacción comparable sin tratar con la sustancia o sustancias de ensayo. Una diferencia en actividad entre los polipéptidos tratados y no tratados indica un efecto modulador de la sustancia o sustancias de ensayo relevantes.

Antes de o además de explorar la modulación de la actividad, las sustancias de ensayo pueden explorarse con respecto a la capacidad de interactuar con el polipéptido, por ejemplo en un sistema doble híbrido de levadura (por ejemplo Bartel *et al.*, 1993; Fields and Song, 1989; Chevray and Nathans, 1992; Lee *et al.*, 1995). Este sistema puede usarse como una exploración generalizada antes de ensayar una sustancia con respecto a la capacidad real de modular la actividad del polipéptido. Como alternativa, la exploración podría usarse para explorar sustancias de ensayo con respecto a la unión a una molécula de unión específica a KCNE2, o para encontrar miméticos del polipéptido KCNE2.

Después de la identificación de una sustancia que modula o afecta a la actividad del polipéptido, la sustancia puede investigarse adicionalmente. Además, puede fabricarse y/o usarse en la preparación, es decir, la fabricación o formulación, o en una composición tal como un medicamento, composición farmacéutica o fármaco. Éstos pueden administrarse a los individuos.

De esta manera, la presente invención incluye en diversos aspectos no sólo una sustancia identificada usando una molécula de ácido nucleico como modulador de la actividad del polipéptido, de acuerdo con lo que se describe en la presente memoria, sino también una composición farmacéutica, medicamento, fármaco u otra composición que comprende dicha sustancia, un método que comprende la administración de dicha composición que comprende dicha sustancia, un método que comprende la administración de dicha composición a un paciente, por ejemplo, para tratamiento (que puede incluir el tratamiento preventivo) del LQT, el uso de dicha sustancia en la fabricación de una composición para administración, por ejemplo, para el tratamiento del LQT, y un método para fabricar una composición farmacéutica que comprende mezclar dicha sustancia con un excipiente, vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente otros ingredientes.

Una sustancia identificada como un modulador de la función del polipéptido puede ser de naturaleza peptídica o no peptídica. Con frecuencia se prefieren "moléculas pequeñas" no peptídicas para muchos usos farmacéuticos *in vivo*. Por consiguiente, puede diseñarse un mimético o imitador de la sustancia (particularmente si es un péptido) para uso farmacéutico.

El diseño de miméticos para un compuesto farmacéuticamente activo conocido es una estrategia conocida para el desarrollo de agentes farmacéuticos basados en un compuesto “guía”. Esto podría ser deseable cuando es difícil o caro sintetizar el compuesto activo o cuando es poco adecuado para un método de administración particular, por ejemplo, los péptidos puros son agentes activos poco adecuados para composiciones orales ya que tienden a degradarse rápidamente por proteasas en el canal alimentario. Generalmente se usa el diseño, síntesis y ensayo de miméticos para evitar la exploración aleatoria de grandes números de moléculas en relación con una propiedad diana.

Comúnmente se realizan varias etapas en el diseño de un mimético a partir de un compuesto que tiene una propiedad diana dada. En primer lugar, se determinan las partes particulares del compuesto que son críticas y/o importantes para determinar la propiedad diana. En el caso de un péptido, esto puede realizarse variando sistemáticamente los residuos aminoácidos del péptido, por ejemplo, sustituyendo cada residuo por turnos. Comúnmente se usan exploraciones de alanina en péptidos para refinar dichos motivos peptídicos. Estas partes o residuos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como su “farmacóforo”.

Una vez que se ha encontrado el farmacóforo, su estructura se modela de acuerdo con sus propiedades físicas, por ejemplo estereoquímica, unión, tamaño y/o carga, usando datos de una serie de fuentes, por ejemplo técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos x y RMN. En este procedimiento de modelado pueden usarse análisis computacionales, mapeo de similitud (que modela la carga y/o volumen de un farmacóforo, en lugar de la unión entre átomos) y otras técnicas.

En una variante de esta estrategia, se modela la estructura tridimensional del ligando y su compañero de unión. Esto puede ser especialmente útil cuando el ligando y/o el compañero de unión cambian la conformación tras la unión, permitiendo que el modelo tenga en cuenta esto en el diseño del mimético.

Después se selecciona una molécula de plantilla sobre la cual pueden injertarse grupos químicos que imitan al farmacóforo. La molécula de plantilla y los grupos químicos injertados sobre la misma pueden seleccionarse convenientemente de forma que el mimético sea fácil de sintetizar, sea probablemente aceptable desde el punto de vista farmacológico y no se degrade *in vivo*, mientras que retiene la actividad biológica del compuesto guía. Como alternativa, cuando el mimético está basado en péptidos, puede conseguirse una estabilidad adicional ciclando el péptido, lo cual aumenta su rigidez. El mimético o miméticos encontrados por esta estrategia después puede explorarse para ver si tienen la propiedad diana o en qué medida la presentan. Después puede realizarse una optimización o modificación adicional para llegar a uno o más miméticos finales para el ensayo clínico o *in vivo*.

Métodos de Uso: Diagnóstico del Ácido Nucleico y Kits de Diagnóstico

Para detectar la presencia de un alelo de *KCNE2* que predispone a un individuo al LQT, se prepara una muestra biológica tal como sangre y se analiza con respecto a la presencia o ausencia de alelos de susceptibilidad de *KCNE2*. Para detectar la presencia de LQT o como un indicador de pronóstico, se prepara una muestra biológica y se analiza con respecto a la presencia o ausencia de alelos mutantes de *KCNE2*. Los resultados de estos ensayos y la información interpretativa se devuelven al profesional sanitario para que se lo comunique al individuo de ensayo. Estos diagnósticos pueden realizarse por laboratorios de diagnóstico o, como alternativa, se fabrican kits de diagnóstico y se venden a los profesionales sanitarios o a los propios individuos para el autodiagnóstico.

Inicialmente, el método de exploración implica la amplificación de las secuencias de *KCNE2* relevantes. En otra realización preferida de la invención, el método de exploración implica una estrategia no basada en PCR. Estos métodos de exploración incluyen metodologías de amplificación de marcadores de dos etapas que son bien conocidas en la técnica. Tanto las estrategias de exploración basadas en PCR como las no basadas en PCR pueden detectar secuencias diana con un alto nivel de sensibilidad.

El método más popular usado hoy en día es la amplificación de dianas. En este caso, la secuencia de ácido nucleico diana se amplifica con polimerasas. Un método particularmente preferido que usa la amplificación dirigida por polimerasas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa y otros ensayos de amplificación dirigidos por polimerasas pueden conseguir un aumento de más de un millón de veces en el número de copias por medio del uso de ciclos de amplificación dirigidos por polimerasa. Una vez amplificado, el ácido nucleico resultante puede secuenciarse o usarse como un sustrato para sondas de ADN.

Cuando las sondas se usan para detectar la presencia de las secuencias diana, la muestra biológica a analizar, tal como sangre o suero, puede tratarse, si se desea, para extraer los ácidos nucleicos. El ácido nucleico de la muestra puede prepararse de diversas maneras para facilitar la detección de la secuencia diana, por ejemplo desnaturalización, digestión de restricción, electroforesis o transferencia puntual. La región diana del ácido nucleico del analito normalmente debe ser al menos parcialmente monocatenaria para formar híbridos con la secuencia de dirección de la sonda. Si la secuencia es monocatenaria de forma natural, la desnaturalización no será necesaria. Sin embargo, si la secuencia es bicatenaria, probablemente será necesario desnaturalizar la secuencia. La desnaturalización puede realizarse por diversas técnicas conocidas en este campo.

El ácido nucleico que constituye el analito y la sonda se incuban en condiciones que promueven una formación de híbridos estables de la secuencia diana en la sonda con la supuesta secuencia dirigida en el analito. La región de

las sondas que se usa para unirse al analito puede realizarse de manera que sea completamente complementaria a la región diana de *KCNE2*. Por lo tanto, son deseables condiciones de alta rigurosidad para impedir falsos positivos. Sin embargo, se usan condiciones de alta rigurosidad únicamente si las sondas son complementarias a regiones del cromosoma que son únicas en el genoma. La rigurosidad de la hibridación se determina por varios factores durante la hibridación y durante el procedimiento de lavado, incluyendo la temperatura, fuerza iónica, composición de bases, longitud de la sonda y concentración de formamida. Estos factores se perfilan, por ejemplo, en Maniatis *et al.*, 1982 and Sambrook *et al.*, 1989. En ciertas circunstancias, puede desearse la formación de híbridos de orden superior, tales como triplex, cuádruplex, etc., para proporcionar la manera para detectar secuencias diana.

La detección, si la hay, del híbrido resultante normalmente se realiza por medio del uso de sondas marcadas. Como alternativa, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable por unión específica a un ligando que está marcado, directa o indirectamente. En la técnica se conocen marcadores adecuados y métodos para marcar sondas y ligandos, e incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos que pueden incorporarse por métodos conocidos (por ejemplo, traslación de mellas, cebado aleatorio o tratamiento con quinasas), biotina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, particularmente dioxetanos inducidos), enzimas, anticuerpos, nanopartículas de oro y similares. En la técnica se conocen variaciones de este esquema básico e incluyen las variaciones que facilitan la separación de los híbridos a detectar de materiales extraños y/o que amplifican la señal procedente del residuo marcado. Se revisan varias de estas variaciones, por ejemplo, en Matthews and Kricka, 1988; Landegren *et al.*, 1988; Mifflin, 1989; Patente de Estados Unidos 4.868.105; y en la Publicación EPO N° 225.807.

Como se ha indicado anteriormente, en esta invención también se contemplan ensayos de exploración no basados en PCR. Este procedimiento hibrida una sonda de ácido nucleico (o un análogo tal como un esqueleto de metilfosfonato que reemplaza el fosfodiéster normal) a la diana de ADN de bajo nivel. Esta sonda puede tener una enzima unida covalentemente a la sonda, de tal forma que el enlace covalente no interfiera con la especificidad de la hibridación. Este complejo de enzima-sonda-conjugado-ácido nucleico diana después puede aislarse del conjugado de sonda libre y enzima y se añade un sustrato para la detección de la enzima. La actividad enzimática se observa como un cambio en el desarrollo de color o en la producción de luminiscencia que tiene como resultado un aumento de sensibilidad de 10^3 - 10^6 . Como ejemplo en relación con la preparación de conjugados de oligodesoxinucleótido-fosfatasa alcalina y su uso como sondas de hibridación, véase Jablonski *et al.* (1986).

En la técnica se conocen metodologías de amplificación de marcadores de dos etapas. Estos ensayos funcionan sobre el principio de que un pequeño ligando (tal como digoxigenina, biotina o similar) se une a una sonda de ácido nucleico capaz de unirse específicamente a *KCNE2*. También se contemplan dentro del alcance de este ejemplo sondas con especificidad de alelo y las sondas específicas de alelo ilustrativas incluyen sondas que comprenden las mutaciones de predisposición de esta solicitud de patente.

En un ejemplo, el pequeño ligando unido a la sonda de ácido nucleico se reconoce específicamente por un conjugado de anticuerpo-enzima. En una realización de este ejemplo, se une digoxigenina a la sonda de ácido nucleico. La hibridación se detecta por un conjugado de anticuerpo-fosfatasa alcalina que actúa sobre un sustrato quimioluminiscente. En relación con los métodos para marcar sondas de ácido nucleico de acuerdo con esta realización, véase Martin *et al.*, 1990. En un segundo ejemplo, el ligando pequeño se reconoce por un conjugado de segundo ligando-enzima que puede formar un complejo específico con el primer ligando. Una realización bien conocida de este ejemplo es el tipo de interacciones biotina-avidina. En relación con los métodos para marcar sondas de ácido nucleico y su uso en ensayos basados en biotina-avidina, véase Rigby *et al.*, 1977 and Nguyen *et al.*, 1992.

Dentro del alcance de esta invención también se contempla que los ensayos de sondas de ácido nucleico de esta invención emplearán un cóctel de sondas de ácido nucleico capaces de detectar *KCNE2*. De esta manera, en un ejemplo para detectar la presencia de *KCNE2* en una muestra celular, se emplea más de una sonda complementaria al gen y, en particular, el número de diferentes sondas es alternativamente dos, tres o cinco secuencias de sonda de ácido nucleico diferentes. En otro ejemplo, para detectar la presencia de mutaciones en la secuencia del gen *KCNE2* en un paciente, se emplea más de una sonda complementaria a esos genes donde el cóctel incluye sondas capaces de unirse a las mutaciones específicas de alelo identificadas en poblaciones de pacientes con alteraciones en *KCNE2*. En esta realización, puede usarse cualquier número de sondas y preferiblemente se incluirán sondas correspondientes a las mutaciones génicas principales identificadas como las que predisponen a un individuo al LQT.

Métodos de Uso: Diagnóstico del Péptido y Kits de Diagnóstico

La presencia de LQT también puede detectarse basándose en la alteración del polipéptido *KCNE2* de tipo salvaje. Estas alteraciones pueden determinarse por análisis de la secuencia de acuerdo con técnicas convencionales. Más preferiblemente, se usan anticuerpos (policlonales o monoclonales) para detectar diferencias en péptidos *KCNE2* o la ausencia de dichos péptidos. En este campo son bien conocidas técnicas para inducir y purificar anticuerpos, y puede elegirse cualquiera de estas técnicas para conseguir las preparaciones reivindicadas en esta invención. En una realización preferida de la invención, los anticuerpos inmunoprecipitarán proteínas de *KCNE2* en la solución además de reaccionar con estas proteínas en transferencias de Western o inmunotransferencias de geles de poli(acrilamida). En otra realización preferida, los anticuerpos detectarán proteínas de *KCNE2* en secciones de parafina o de tejido congelado usando técnicas inmunocitoquímicas.

Las realizaciones preferidas relacionadas con los métodos para detectar *KCNE2* o sus mutaciones incluyen ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA), incluyendo ensayos de tipo sándwich que usan anticuerpos monoclonales y/o policlonales. Se describen ensayos de tipo sándwich ilustrativos por David *et al.*, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.376.110 y 4.486.530, incorporadas en la presente memoria como referencia.

Métodos de Uso: Terapia Génica

En la presente memoria también se proporciona un método para suministrar la función de *KCNE2* de tipo salvaje a una célula que lleva un alelo mutante de *KCNE2*, respectivamente. El suministro de dicha función permitiría el funcionamiento normal de las células receptoras. El gen de tipo salvaje o una parte del gen puede introducirse en la célula en un vector tal que el gen se mantenga extracromosómico. En dicha situación, el gen se expresará por la célula desde la localización extracromosómica. Es más preferida la situación en la que el gen de tipo salvaje o una parte del mismo se introduce en la célula mutante de tal forma que se recombine con el gen mutante endógeno presente en la célula. Esta recombinación requiere un doble acontecimiento de recombinación que tiene como resultado la corrección de la mutación del gen. En la técnica se conocen vectores para la introducción de genes tanto para la recombinación como para el mantenimiento extracromosómico, y puede usarse cualquier vector adecuado. En la técnica se conocen métodos para introducir ADN en células tales como electroporación, coprecipitación con fosfato cálcico y transducción viral, y la elección del método está dentro de la competencia del experto en la materia.

Como se ha descrito en términos generales anteriormente, el gen *KCNE2* o el fragmento del mismo, cuando sea aplicable, puede emplearse en métodos de terapia génica para aumentar la cantidad de los productos de expresión de dicho gen en las células. También puede ser útil aumentar el nivel de expresión de un gen de LQT dado incluso en las células cardíacas en las que se expresa el gen mutante a un nivel "normal", pero el producto génico no es completamente funcional.

La terapia génica se realizaría de acuerdo con métodos aceptados generalmente, por ejemplo, como se describe por Friedman (1991) o Culver (1996). Primero se analizarían las células de un paciente por los métodos de diagnóstico descritos anteriormente para determinar la producción del polipéptido de *KCNE2* en las células. Se prepara un virus o vector plasmídico (véanse los detalles adicionales más adelante), que contiene una copia del gen *KCNE2* unido a elementos de control de la expresión y capaz de replicarse dentro de las células. El vector puede ser capaz de replicarse dentro de las células. Como alternativa, el vector puede ser deficiente en la replicación y se replica en células auxiliares para uso en terapia génica. Se conocen vectores adecuados, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos 5.252.479 y en la publicación de solicitud PCT WO 93/07282 y en las Patentes de Estados Unidos N° 5.691.198; 5.747.469; 5.436.146 y 5.753.500. El vector después se inyecta en el paciente. Si el gen transfectado no se incorpora permanentemente en el genoma de cada una de las células diana, el tratamiento puede tener que repetirse periódicamente.

Los sistemas de transferencia génica conocidos en este campo pueden ser útiles en la práctica de los métodos de terapia génica descritos en la presente memoria. Estos incluyen métodos de transferencia virales y no virales. Se han usado varios virus como vectores de transferencia génica o como base para reparar los vectores de transferencia génica, incluyendo papovavirus (por ejemplo, SV40, Madzak *et al.*, 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner *et al.*, 1988; Gorziglia and Kapikian, 1992; Quantin *et al.*, 1992; Rosenfeld *et al.*, 1992; Wilkinson and AKrigg, 1992; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1998), virus vaccinia (Moss, 1992; Moss, 1996), virus adenoasociados (Muzyczka, 1992; Ohi *et al.*, 1990; Russell and Hirata, 1998), herpesvirus incluyendo HSV y EBV (Margolskee, 1992; Johnson *et al.*, 1992; Fink *et al.*, 1992; Breakefield and Geller, 1987; Freese *et al.*, 1990; Fink *et al.*, 1996), lentivirus (Naldini *et al.*, 1996), virus Sindbis y Semliki Forest (Berglund *et al.*, 1993), y retrovirus de origen aviar (Bandyopadhyay and Temin, 1984; Petropoulos *et al.*, 1992), murino (Miller, 1992; Miller *et al.*, 1985; Sorge *et al.*, 1984; Mann and Baltimore, 1985; Miller *et al.*, 1988) y humano (Shimada *et al.*, 1991; Helseth *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1990; Buchschacher and Panganiban, 1992). La mayoría de los protocolos de terapia génica humanos se han basado en retrovirus murinos incapacitados, aunque también se están usando adenovirus y virus adenoasociados.

Los métodos de transferencia génica no virales conocidos en este campo incluyen técnicas químicas tales como coprecipitación con fosfato cálcico (Graham and van der Eb, 1973; Pellicer *et al.*, 1980); técnicas mecánicas, por ejemplo microinyección (Anderson *et al.*, 1980; Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981; Costantini and Lacy, 1981); transferencia mediada por fusión de membranas por medio de liposomas (Felgner *et al.*, 1987; Wang and Huang, 1989; Kaneda *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1992; Nabel *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 1991); y captación directa de ADN y transferencia de ADN mediada por receptores (Wolff *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991; Zenke *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1989; Wolff *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1991; Cotten *et al.*, 1990; Curiel *et al.*, 1992; Curiel *et al.*, 1991). La transferencia génica mediada por virus puede combinarse con transferencia génica *in vivo* directa usando la administración de liposomas, que permite dirigir los vectores virales a las células tumorales y no a las células circundantes que no se están dividiendo. Como alternativa, la línea celular productora del vector retroviral puede inyectarse en tumores (Culver *et al.*, 1992). Entonces la inyección de las células productoras proporcionaría una fuente continua de partículas de vector. Esta técnica se ha aprobado para uso en seres humanos con tumores cerebrales inoperables.

En una estrategia que combina los métodos de transferencia génica biológicos y físicos, se combina ADN plasmídico de cualquier tamaño con un anticuerpo conjugado con polilisina específico para la proteína del hexón de adenovirus,

y el complejo resultante se une a un vector de adenovirus. El complejo trimolecular después se usa para infectar a las células. El vector de adenovirus permite una unión eficaz, internalización y degradación del endosoma antes de que se dañe el ADN acoplado. En relación con otras técnicas para la administración de vectores basados en adenovirus, véase Schneider *et al.* (1998) y las Patentes de Estados Unidos N° 5.691.198; 5.747.469; 5.436.146 y 5.753.500.

Se ha demostrado que los complejos de liposoma/ADN pueden intervenir en la transferencia génica directa *in vivo*. Aunque en las preparaciones de liposomas convencionales el proceso de transferencia génica no es específico, se ha informado sobre una captación y expresión localizada *in vivo* en depósitos de tumor, por ejemplo, después de la administración directa *in situ* (Nabel, 1992).

Se entiende que los vectores de expresión, en el contexto de la terapia génica, incluyen las construcciones que contienen secuencias suficientes para expresar un polinucleótido que se ha clonado en su interior. En los vectores de expresión viral, la construcción contiene secuencias virales suficientes para soportar el empaquetamiento de la construcción. Si el polinucleótido codifica *KCNE2*, la expresión producirá *KCNE2*. Si el polinucleótido codifica un polinucleótido antisentido o una ribozima, la expresión producirá el polinucleótido antisentido o la ribozima. De esta manera, en este contexto, la expresión no requiere que se sintetice un producto proteico. Además del polinucleótido clonado en el vector de expresión, el vector también contiene un promotor funcional en células eucariotas. La secuencia polinucleotídica clonada está bajo el control de este promotor. Los promotores eucariotas adecuados incluyen los descritos anteriormente. El vector de expresión también puede incluir secuencias, tales como marcadores de selección y otras secuencias descritas en la presente memoria.

Se prefieren técnicas de transferencia de genes que dirigen el ADN directamente al tejido cardíaco. La transferencia génica mediada por receptores, por ejemplo, se realiza por la conjugación de ADN (normalmente en forma de plásmido superenrollado cerrado covalentemente) a un ligando proteico a través de polilisina. Los ligandos se eligen basándose en la presencia de los receptores de ligandos correspondientes en la superficie celular de la célula/tipo tisular diana. Estos conjugados de ligando-ADN pueden inyectarse directamente en la sangre si se desea y se dirigen al tejido diana donde se produce la unión al receptor y la internalización del complejo de ADN-proteína. Para solucionar el problema de la destrucción intracelular del ADN, puede incluirse la coinfección con adenovirus para alterar la función de endosomas.

La terapia es como sigue: pacientes que llevan un alelo de susceptibilidad de *KCNE2* se tratan con un vehículo de administración de genes de tal forma que algunas o todas las células precursoras cardíacas reciben al menos una copia adicional de un alelo de *KCNE2* normal funcional. En esta etapa, los individuos tratados tienen menor riesgo de LQT en la medida en que el efecto del alelo susceptible se ha contrarrestado por la presencia del alelo normal.

Métodos de Uso: Terapia Peptídica

Pueden suministrarse péptidos que tienen actividad *KCNE2* a células que llevan un mutante o que carecen del alelo de *KCNE2*. La proteína puede producirse por expresión de la secuencia de ADNc en bacterias, por ejemplo, usando vectores de expresión conocidos. Como alternativa, puede extraerse el polipéptido *KCNE2* de células de mamífero que producen *KCNE2*. Además, pueden emplearse las técnicas de química sintética para sintetizar la proteína *KCNE2*. Cualquiera de estas técnicas puede proporcionar la preparación de la presente invención que comprende la proteína *KCNE2*. La preparación carece sustancialmente de otras proteínas humanas. Esto se consigue de la manera más fácil por síntesis en un microorganismo o *in vitro*.

Las moléculas de *KCNE2* activas pueden introducirse en las células por microinyección o por medio del uso de liposomas, por ejemplo. Como alternativa, algunas moléculas activas pueden absorberse por las células, activamente o por difusión. El suministro de moléculas con actividad *KCNE2* debe conducir a una inversión parcial del LQT. También pueden usarse otras moléculas con actividad *KCNE2* (por ejemplo péptidos, fármacos o compuestos orgánicos) para realizar tal inversión. También se usan polipéptidos modificados que tienen una función sustancialmente similar para la terapia peptídica.

Métodos de Uso: Hospedadores Transformados

Pueden seleccionarse animales para el ensayo de agentes terapéuticos después de mutagénesis de animales enteros o después del tratamiento de células de la línea germinal o cigotos. Estos tratamientos incluyen la inserción de alelos de *KCNE2* mutantes, normalmente de una segunda especie animal, así como la inserción de genes homólogos alterados. Como alternativa, el gen *KCNE2* endógeno de los animales puede alterarse por mutación de inserción o delección u otras alteraciones genéticas usando técnicas convencionales (Capecchi, 1989; Valancius and Smithies, 1991; Hasty *et al.*, 1991; Shinkai *et al.*, 1992; Mombaerts *et al.*, 1992; Philpott *et al.*, 1992; Snouwaert *et al.*, 1992; Donehower *et al.*, 1992). Estos animales transgénicos, de transposición (transplacement) y knock-out, particularmente los ratones knockout, también pueden usarse para explorar fármacos que pueden ser útiles para tratar o prevenir el LQT u otros trastornos de canales iónicos o para explorar fármacos con respecto a su efecto sobre la actividad de canales iónicos. También pueden obtenerse líneas celulares a partir de estos animales para uso como modelos celulares, o en la exploración de fármacos. Después de haber administrado las sustancias de ensayo a los animales, debe evaluarse la presencia de LQT. Si la sustancia de ensayo previene o suprime la aparición de LQT, entonces la sustancia de ensayo es un agente terapéutico candidato para el tratamiento del LQT. Estos modelos animales proporcionan un vehículo de ensayo extremadamente importante para posibles productos terapéuticos. Se emplean métodos convencionales, inclu-

yendo los descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.837.492; 5.800.998 y 5.891.628, cada uno incorporado en la presente memoria como referencia.

El diagnóstico presintomático del LQT ha dependido de la identificación de la prolongación de QT en electrocardiogramas. Desafortunadamente, rara vez se realizan electrocardiogramas en individuos jóvenes y sanos. Además, muchos portadores del gen del LQT tienen intervalos QT relativamente normales, y el primer síntoma de enfermedad puede ser una arritmia cardíaca fatal (Vincent *et al.*, 1992). Ahora que se han identificado más genes de LQT y se han asociado con LQT, puede contemplarse el ensayo genético de este trastorno. Esto requerirá análisis mutacionales continuados y la identificación de genes de LQT adicionales. Con análisis fenotípicos más detallados, pueden descubrirse diferencias fenotípicas entre las formas variadas de LQT. Estas diferencias pueden ser útiles para el diagnóstico y tratamiento.

La identificación de la asociación entre las mutaciones del gen *KCNE2* y LQT permite una exploración presintomática temprana de individuos para identificar los que tienen riesgo de desarrollar LQT. Para identificar estos individuos, se exploran los alelos de *KCNE2* con respecto a mutaciones directamente o después de la clonación de los alelos. Los alelos se ensayan con respecto a la presencia de diferencias de secuencias de ácido nucleico del alelo normal usando cualquier técnica adecuada, incluyendo pero sin limitación uno de los siguientes métodos: hibridación fluorescente *in situ* (FISH), secuenciación de ADN directa, análisis de PFGE, análisis de transferencia de Southern, análisis de conformación de una sola cadena (SSCP), análisis de ligamiento, ensayo de protección frente a RNasa, oligonucleótido con especificidad de alelo (ASO), análisis de transferencia puntual y análisis de PCR-SSCP. También es útil la técnica desarrollada recientemente de tecnología de microchip de ADN. Por ejemplo, (1) se determinan las secuencias de nucleótidos de los alelos clonados y del gen *KCNE2* normal o el fragmento apropiado (secuencia codificante o secuencia genómica) y después se comparan, o (2) se hibridan los transcritos de ARN del gen *KCNE2* o el fragmento génico con un ADN genómico entero monocatenario de un individuo a ensayar, y el heterodúplex resultante se trata con ribonucleasa A (RNasa A) y se procesa en un gel de desnaturalización para detectar la localización de cualquier desacoplamiento. Dos de estos métodos pueden realizarse de acuerdo con los siguientes procedimientos.

Los alelos del gen *KCNE2* en un individuo a ensayar se clonan usando técnicas convencionales. Por ejemplo, se obtiene una muestra de sangre del individuo. El ADN genómico aislado de las células en esta muestra se digiere parcialmente a un tamaño medio de fragmentos de aproximadamente 20 kb. Se aíslan fragmentos en el intervalo de 18-21 kb. Los fragmentos resultantes se ligan en un vector apropiado. Las secuencias de los clones después se determinan y se comparan con el gen *KCNE2* normal.

Como alternativa, se realizan reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con pares de cebadores para la región 5' o los exones del gen *KCNE2*. También pueden realizarse PCR con pares de cebadores basados en cualquier secuencia del gen *KCNE2* normal. Por ejemplo, pueden prepararse y utilizarse pares de cebadores para uno de los intrones. Finalmente, también puede realizarse RT-PCR sobre el ARNm. Los productos amplificados después se analizan por polimorfismos de conformación de una sola cadena (SSCP) usando técnicas convencionales para identificar cualquier diferencia y después se secuencian y se comparan con la secuencia génica normal.

Los individuos pueden explorarse rápidamente con respecto a las variantes comunes del gen *KCNE2* amplificando el ADN del individuo usando pares de cebadores adecuados y analizando el producto amplificado, por ejemplo, por hibridación de transferencia puntual (dot-blot) usando sondas oligonucleotídicas con especificidad de alelo.

El segundo método emplea RNasa A para ayudar a la detección de diferencias entre el gen *KCNE2* normal y genes defectuosos. Esta comparación se realiza en etapas usando fragmentos de restricción pequeños (~500 pb) del gen *KCNE2* como sonda. En primer lugar, el gen *KCNE2* se digiere con una o más enzimas de restricción que cortan la secuencia del gen en fragmentos de aproximadamente 500 pb. Estos fragmentos se separan en un gel de electroforesis, se purifican del gel y se clonan individualmente, en las dos orientaciones, en un vector SP6 (por ejemplo, pSP64 o pSP65). Los plásmidos basados en SP6 que contienen insertos de los fragmentos del gen *KCNE2* se transcriben *in vitro* usando el sistema de transcripción SP6, bien conocido en la técnica, en presencia de [α -³²P]GTP, generando transcritos de ARN radiomarcados de las dos cadenas del gen.

Individualmente, estos transcritos de ARN se usan para formar heterodúplex con el ADN alélico usando técnicas convencionales. Los desacoplamientos que se producen en el heterodúplex de ARN:ADN, debido a las diferencias de secuencia entre el fragmento de *KCNE2* y el subclón de alelo de *KCNE2* del individuo, producen la escisión en la cadena de ARN cuando se trata con RNasa A. Estos desacoplamientos pueden ser el resultado de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones en el alelo del individuo. La escisión de la cadena de ARN produce dos o más fragmentos de ARN pequeños, que se desplazan más rápido en el gel de desnaturalización que la propia sonda de ARN.

Cualquier diferencia que se encuentre, identificará a un individuo como un individuo que tiene una variante molecular del gen *KCNE2* y la consiguiente presencia del síndrome de QT largo. Estas variantes pueden tomar varias formas. Las formas más severas serían mutaciones de desplazamiento de fase o grandes deleciones que harían que el gen codificara una proteína anómala o una que alterara significativamente la expresión de la proteína. Las mutaciones disruptivas menos severas incluirían deleciones en fase pequeñas y sustituciones de pares de bases no conservativas que tendrían un efecto significativo sobre la proteína producida, tales como cambios hacia o desde un residuo de cisteína, de un aminoácido básico a uno ácido o viceversa, desde un aminoácido hidrófobo a uno hidrófilo o viceversa, u otras mutaciones que afecten a la estructura secundaria o terciaria de la proteína. Generalmente no sería de esperar

que las mutaciones silenciosas o las resultantes de sustituciones de aminoácidos conservativas alteraran la función de las proteínas.

El ensayo genético permitirá a los expertos en la materia identificar individuos con riesgo de LQT en, o incluso antes del nacimiento. El diagnóstico presintomático del LQT permitirá la prevención de estos trastornos. Las terapias médicas existentes, incluyendo los agentes bloqueantes beta adrenérgicos, pueden prevenir y retrasar la aparición de problemas asociados con la enfermedad. Finalmente, esta invención cambia nuestra comprensión de la causa y tratamiento de enfermedades cardíacas comunes tales como arritmias cardíacas que son responsables del 100% de todas las muertes naturales. El diagnóstico existente se ha centrado en la medición del intervalo QT en electrocardiogramas. Este método no es un indicador completamente preciso de la presencia del síndrome de QT largo. La presente invención es un indicador más preciso de la presencia de la enfermedad. El ensayo genético y la comprensión mecánica mejorada del LQT proporciona la oportunidad de prevenir arritmias que ponen en riesgo la vida por medio de terapias racionales. Es posible, por ejemplo, que los agentes de apertura de canales de potasio reduzcan el riesgo de arritmias en pacientes con mutaciones de KCNE2; por el contrario, los agentes bloqueantes de los canales de sodio, pueden ser un tratamiento más eficaz para pacientes con mutaciones que alteran la función de SCN5A. Finalmente, estos estudios pueden proporcionar una perspectiva de mecanismos subyacentes a las arritmias comunes, ya que estas arritmias con frecuencia están asociadas con una repolarización cardíaca anómala y pueden deberse a una combinación de factores hereditarios y adquiridos.

20 Composiciones Farmacéuticas y Vías de Administración

Los polipéptidos, anticuerpos, péptidos y ácidos nucleicos de KCNE2 de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas, que se preparan de acuerdo con técnicas de composiciones farmacéuticas convencionales. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA). La composición puede contener el agente activo o sales farmacéuticamente aceptables del agente activo. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las sustancias activas, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otro material farmacéuticamente aceptable bien conocido en este campo. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. El vehículo puede tomar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de la preparación deseada para la administración, por ejemplo, intravenosa, oral, intratecal, epineural o parenteral.

Para la administración oral, los compuestos pueden formularse en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, grageas, materiales fundidos, polvos, suspensiones o emulsiones. Para preparar las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, agentes de suspensión y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones); o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos). Debido a su facilidad en la administración, los comprimidos y cápsulas representan la forma de unidad de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso evidentemente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con azúcar o recubrirse con un revestimiento entérico por técnicas convencionales. El agente activo puede encapsularse de forma que sea adecuado para el paso a través del tracto gastrointestinal mientras que al mismo tiempo permite el paso a través de la barrera hematoencefálica. Véase, por ejemplo, el documento WO 96/11698.

Para la administración parenteral, el compuesto puede disolverse en un vehículo farmacéutico y administrarse como una solución o una suspensión. Son ejemplos ilustrativos de vehículos adecuados agua, solución salina, soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol o aceites de origen animal, vegetal o sintético. El vehículo también puede contener otros ingredientes, por ejemplo conservantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, tampones y similares. Cuando los compuestos se administran por vía intratecal, también pueden disolverse en líquido cefalorraquídeo.

El agente activo preferiblemente se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad real administrada y la velocidad y evolución a lo largo del tiempo de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección a tratar. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, tiempos, etc. está dentro de la responsabilidad de los expertos o especialistas generales, y típicamente tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos para los expertos en la materia. Pueden encontrarse ejemplos de técnicas y protocolos en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Como alternativa, pueden usarse terapias de dirección para administrar el agente activo de forma más específica a ciertos tipos de células, por medio del uso de sistemas de dirección tales como anticuerpos o ligandos con especificidad de célula. La dirección puede ser deseable por una diversidad de razones, por ejemplo, si el agente es inaceptablemente tóxico o si de otra manera requeriría una dosificación demasiado elevada, o si de otra manera no podría entrar en las células diana.

En lugar de administrar estos agentes directamente, pueden producirse en la célula diana, por ejemplo, en un vector viral tal como el descrito anteriormente o en un sistema de administración basado en células tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.550.050 y en las publicaciones de solicitudes PCT N° WO 92/19195,

WO 94/25503, WO 95/01203, WO 95/05452, WO 96/02286, WO 96/02646, WO 96/40871, WO 96/40959 y WO 97/12635, diseñado para implantación en un paciente. El vector podía dirigirse a las células específicas a tratar o podría contener elementos reguladores que tengan mayor especificidad de tejido por las células diana. El sistema de administración basado en células se diseña para implantarse en el cuerpo de un paciente en el sitio diana deseado y contiene una secuencia codificante del agente activo. Como alternativa, el agente podría administrarse en una forma precursora para convertirse en la forma activa por un agente de activación producido en o dirigido a las células a tratar. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 425.731A y WO 90/07936.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivo celular y biología transgénica, que están dentro de la experiencia de este campo. Véase, por ejemplo Maniatis *et al.*, 1982; Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992; Glover, 1985; Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988; Jakoby and Pastan, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.* eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and G. C. Blackwell, eds., 1986); Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986).

Métodos de Análisis de Polimorfismos

Se describen métodos de extensión de una sola base, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.846.710; 6.004.744; 5.888.819 y 5.856.092. En resumen, los métodos funcionan hibridando un cebador que es complementario a una secuencia diana de tal forma que el extremo 3' del cebador esté inmediatamente adyacente pero no incluya un sitio de posible variación en la secuencia diana. Es decir, el cebador comprende una subsecuencia del complemento de un polinucleótido diana que termina en la base que está inmediatamente adyacente al extremo 5' del sitio polimórfico. La hibridación se realiza en presencia de uno o más nucleótidos marcados complementarios a una o más bases que pueden ocupar el sitio de posible variación. Por ejemplo, para un polimorfismo bialélico pueden usarse dos nucleótidos marcados de forma diferencial. Para un polimorfismo tetraalélico pueden usarse cuatro nucleótidos marcados de forma diferencial. En algunos métodos, particularmente los métodos que emplean múltiples nucleótidos marcados de forma diferencial, los nucleótidos son didesoxinucleótidos. La hibridación se realiza en condiciones que permiten la extensión de cebadores si está presente un nucleótido complementario a una base que ocupa el sitio de variación en la secuencia diana. La extensión incorpora un nucleótido marcado generando de esta manera un cebador extendido marcado. Si se usan múltiples nucleótidos marcados de forma diferencial y la diana es heterocigota, entonces pueden obtenerse múltiples cebadores extendidos marcados de forma diferencial. Los cebadores extendidos se detectan proporcionando una indicación de qué base ocupa el sitio de variación en el polinucleótido diana.

Ejemplos

La presente invención se detalla adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de manera alguna. En este campo se conocen bien técnicas convencionales o se utilizan las técnicas descritas de manera específica más adelante.

Ejemplo 1

Métodos de Biología Molecular

Todos los ARNc se sintetizaron después de que los genes se ligaran a pBF2 con un MCS modificado (pGA1) (Sesti and Goldstein, 1998). Se buscaron las bases de datos NCBI con la secuencia proteica codificada por *KCNE1* usando algoritmos BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y no se pudieron encontrar genes significativamente homólogos. Una reevaluación de las secuencias debajo del umbral de significado estadístico identificó 9 EST que llevaban un motivo diana corto. Los aminoácidos diana en MinK de rata eran sitios que se sabía que influían en la apertura de canales I_{Ks} (T59, I62, R68, S69, K71, S75, D77) (Takumi *et al.*, 1991; Splawski *et al.*, 1997), selectividad iónica (F55, T59) (Goldstein and Miller, 1991; Tai and Goldstein, 1998), conductancia unitaria (S75, D77) (Sesti and Goldstein, 1998), bloqueo de poros (Y47, I48, F55, G56, F57) (Goldstein and Miller, 1991; Wang *et al.*, 1996; Tai and Goldstein, 1998) y los que se exponen en la ruta de conducción de canales I_{Ks} profunda (F55, G56, F57, T59) (Wang *et al.*, 1996; Tai and Goldstein, 1998). Las secuencias de rata y humana que codifican MiRP1 primero se aislaron por transcripción inversa a partir de ARNm poli(A)⁺ cardíaco (Clontech). Se realizó una amplificación rápida de los extremos de ADNc con un Kit de ADNc MarathonTM y se exploraron bibliotecas de ADNc de rata adulta y de corazón humano adulto cebadas aleatoriamente y con oligo(dT) (Clontech) para determinar las secuencias completas. Se aislaron tres ADNc para MiRP1 de rata y humano y se secuenciaron las dos cadenas. Los análisis de las secuencias de nucleótidos y de proteínas se realizaron con LaserGene (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Los alineamientos se realizaron con ClustalW 1.6 con algoritmos Blossum y penalizaciones de apertura y extensión de huecos de 15 y 0,1. Como el gen de MinK se denomina *KCNE1*, los nuevos genes se han denominado *KCNE2* (MiRP1), *KCNE3* (MiRP2) y *KCNE4* (MiRP3) por el Comité de Nomenclatura de Bases de Datos del Genoma (HUGO/GDB). Los números de acceso para MiRP1

ES 2 338 520 T3

humana, MiRP1 de rata, MiRP2 humana, MiRP2 de ratón y MiRP3 de ratón son AF071002, AF071003, AF076531, AF076532 y AF076533, respectivamente.

Análisis de SSCP. Se amplificaron muestras genómicas por PCR y se usaron en análisis de SSCP. En la exploración de mutación se usaron tres pares de cebadores:

1F, 5'-CCGTTTTCCTAACCTTGTTTCG-3' (SEC ID N°:13) y

2R, 5'-AGCATCAACTTTGGCTTGGAG-3' (SEC ID N°: 14);

3F, 5'-GTCTTCCGAAGGATTTTATTAC-3' (SEC ID N°: 15) y

4R, 5'-GTTCCCGTCTCTTGGATTTC-3' (SEC ID N°: 16);

5F, 5'-AATGTTCTCTTTCATCATCGTG-3' (SEC ID N°: 17) y

6R, 5'-TGTCTGGACGTCAGATGTTAG-3' (SEC ID N°: 18).

La PCR se realizó con 50 ng de ADN en un volumen final de 10 μ l usando un aparato de ciclos térmicos Perkin-Elmer Cetus 9600. Las reacciones de PCR tuvieron una concentración final de formamida al 4% y glicerol al 10% y se recubrieron con aceite mineral. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C durante 10 s, 55°C durante 20 s y 72°C durante 20 s, seguido de extensión durante 5 minutos a 72°C. Las reacciones de diluyeron con 40 μ l de SDS al 0,1%/EDTA 10 mM y con 30 μ l de formamida al 95% como colorante de carga. La mezcla se desnaturalizó a 94°C durante 5-10 minutos e inmediatamente se puso en hielo. Tres μ l de cada muestra se sometieron a electroforesis en un gel de poli(acrilamida) al 5% (acrilamida:bisacrilamida 49:1) a 4°C y en geles de aumento de la detección de mutación 0,5X y 1X (MDE, FMC Bioproducts) a temperatura ambiente. Las electroforesis en los geles al 5% se realizaron a 40 W durante 2-3 horas y las electroforesis en los geles 0,5X y 1X se realizaron durante una noche a 350 V u 800 V respectivamente. Los geles se secaron en papel de filtro 3MM y se expusieron a la película durante 18 horas a -70°C.

Secuenciación de ADN. Se escindieron bandas de SSCP aberrantes y normales del gel y se eluyeron en 100 μ l de ddH₂O a 65°C durante 30 minutos. En una segunda reacción de PCR de 100 μ l usando el par de cebadores original se usaron 10 μ l del ADN eluido como plantilla. Los productos se lavaron 3 veces con 400 μ l de ddH₂O en micro-concentradores Microcon 100 (Amicon). El ADN se secuenció directamente en las dos direcciones por el método de terminación de cadena didesoxi, usando los cebadores originales, en un secuenciador de ADN de Applied Biosystems modelo 373A.

Ejemplo 2

Métodos de Electrofisiología

Se aislaron oocitos de *Xenopus laevis*, se desfolicularon por tratamiento con collagenasa y se inyectaron al día siguiente con 46 nl de ARNc. Se midieron las corrientes de las células enteras 2-4 días después de la inyección de 1 ng de ARNc de *HERG* con o sin 0,2 ng de ARNc de *MiRP1* de rata o humano usando fijación de voltaje de dos electrodos (Oocyte Clamp, Warner Instruments Inc., Hamden, CT), un ordenador IBM y un software no comercial. Los datos se muestrearon a 4 kHz y se filtraron a 1 kHz a menos que se indique otra cosa. Los datos de partida se muestran sin corrección de fugas. Los registros de un solo canal se registraron usando un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA), un ordenador Quadra 800 y un software ACQUIRE (Instrutech, Great Neck, NY) y se almacenaron sin filtrar en la cinta VHS. Los datos se filtraron a través de un filtro Bessel de 4 polos antes del análisis usando paquetes TAC (Instrutech Corp., Great Neck, NY) o IGOR (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR). Todos los experimentos se realizaron a 22°C.

Protocolos. Mantenimiento del voltaje en todos los casos a -80 mV. (1) Activación de estado estacionario; prepulso durante 3 s de -80 a 40 mV en etapas de 10 mV, pulso de ensayo durante 6 s a -100 mV; intervalo interpulso 5 s. (2) Cinética de activación; duraciones prepulso crecientes de 0,005 a 3 s a un voltaje de 0 a 60 mV en etapas de 20 mV, pulso de ensayo durante 3 s a -100 mV; intervalo interpulso 5 s. (3) Corriente máxima; desactivación de estado estacionario; cinética de desactivación; prepulso durante 3 s a 30 mV, pulso de ensayo durante 5 s de -150 a 10 mV en etapas de 10 mV; pulso hasta -120 mV durante 1 s; intervalo interpulso 5 s. (4) Inactivación de estado estacionario; prepulso durante 3 s a 20 mV, pulso durante 30 ms a un voltaje de -120 a 60 mV en etapas de 10 mV; pulso de ensayo durante 1 s a 20 mV; intervalo interpulso 2 s. (5) Bloqueo de E-4031; se repitieron 50 ciclos: pulso durante 3 s a 30 mV, pulso de ensayo durante 5 s a -100 mV. (6) Corrientes isócrona y máxima; pulso durante 1 ó 2 s de -80 a 20 ó 40 mV en etapas de 10 mV seguidas de una etapa de 2 s a -40 mV con un intervalo interpulso de 3 s. (7) Se activaron canales individuales por un pulso de 2 s de -80 a 20 mV seguido de un pulso de ensayo de 4 ó 6 s a voltajes de -120 a -20 mV en etapas de 10 mV con un intervalo interpulso de 3 s.

Condiciones iónicas. La activación de los canales formados únicamente con HERG o que contenía subunidades tanto rMiRP1 como HERG se evaluó a diversas concentraciones de Ca^{2+} por los protocolos 1 y 2. Tratando al Ca^{2+} como ión bloqueante, se observó una constante de inhibición de equilibrio (K_i) aparente para los canales de HERG de $0,29 \pm 0,02$ mM a -100 mV, un valor similar al presentado por otros investigadores (Ho *et al.*, 1998), mientras que los canales heteroméricos que contienen rMiRP1 tenían un valor de K_i aparente ~ 3 veces menor. De esta manera se realizaron caracterizaciones iniciales en una solución de baño de “bajo Ca^{2+} /alto K” en (en mM): 95 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl_2 , 0,3 CaCl_2 y 10 HEPES, pH 7,6 con NaOH. Otros estudios usan soluciones basadas en niveles de especies ionizadas encontradas en plasma humano (en mM): 4 KCl, 95 NaCl, 0,75 MgCl_2 , 1 CaCl_2 y 10 HEPES, pH 7,6 con NaOH. Para las titulaciones de K^+ en la Fig. 4, se sustituyeron isotónicamente NaCl y KCl. Para todas las zonas selladas (cell-attached), la solución de la pipeta era (en mM): 100 KCl, 1 MgCl_2 , 0,3 CaCl_2 , 10 HEPES, pH 7,5 sin KOH. Para las células enteras, las pipetas contenían (en mM): 100 KCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 2 EGTA, pH 7,5 con KOH.

Farmacología. La quinidina se adquirió en Sigma, la claritromicina en American Bioanalytical (Natick, MA). Se disolvieron quinidina y E-4031 rápidamente en solución de baño. Una solución madre 50 mM de claritromicina en DMSO se diluyó con solución de baño para los estudios. La quinidina y claritromicina se estudiaron por el protocolo 1 a -40 mV con solución de Ca^{2+} 1 mM, KCl 4 mM o de otra manera cuando se indique. E-4031 se estudió por el protocolo 3 a -100 mV con una solución de Ca^{2+} 1 mM, KCl 4 mM en el caso de los oocitos y el protocolo 1 a -40 mV para las células CHO. Los coeficientes de Hill se determinaron de acuerdo con $1/(1 + ([\text{fármaco}]/K_i)^n)$.

Ejemplo 3

Métodos de Bioquímica

rMiRP1 y HERG se marcaron en el epítipo reemplazando el codón de terminación terminal de cada uno con nucleótidos que codificaban residuos HA (YPYDVPDYAX; SEC ID N°: 19) o residuos cmc (ISMEQKLISEEDLN; SEC ID N°: 20). La transfección transitoria de las células COS se realizó por medio de una solución madre de DEAE-Dextrano, cloroquina y DMSO. Las células transfectadas se lisaron en tampón A (en mM): 150 NaCl, NP-40 al 1%, CHAPS al 1%, 0,2 PMSF, 20 NaF, 10 Na_3VO_4 , 50 Tris, pH 7,4 y 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Pepstatina, antes de clarificarse por centrifugación a 10.000 g durante 30 s. Las inmunoprecipitaciones se realizaron con anticuerpo monoclonal anti-cmc 9E10 (Oncogene Research) y proteína A/G inmovilizada (Pierce). Las muestras se separaron por SDS-PAGE (10-16%). Las transferencias de Western se realizaron con anticuerpo monoclonal anti-HA 12CA5 (Boehringer) con un anticuerpo secundario acoplado a quimioluminiscencia-peroxidasa de rábano picante (Oncogene Research) para fluorografía. Para generar subunidades de proteínas a partir de ARNc para rMiRP1, rMinK y HERG-cmc se usó lisado de reticulocitos de conejo Speedread Lysate 2TM (Novagen). Las subunidades se radiomarcaron con ³⁵S-metionina (Amersham) y se diluyeron en Tampón A que contenía NP-40 al 1,5%. Los ensayos de unión se realizaron mezclando volúmenes iguales de las mezclas de reacción e incubando durante 2 horas en hielo antes de IP como se ha indicado anteriormente.

Ejemplo 4

Identificación y Clonación de Genes que Codifican Productos Relacionados con MinK

Se evaluaron bases de datos disponibles a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con respecto a secuencias relacionadas con MinK. La estrategia de búsqueda de los presentes solicitantes se dirigió a sitios en MinK que se sabe que influyen en la apertura de canales I_{Ks} (Takumi *et al.*, 1991; Splawski *et al.*, 1997), la selectividad iónica (Goldstein and Miller, 1991; Tai and Goldstein, 1998), la conductancia unitaria (Sesti and Goldstein, 1998), el bloqueo de poros (Goldstein and Miller, 1991; Wang *et al.*, 1996; Tai and Goldstein, 1998) y los expuestos físicamente en la ruta de conducción de canales I_{Ks} (Wang *et al.*, 1996; Tai and Goldstein, 1998). De esta manera, se identificaron fragmentos de genes relacionados con MinK en 9 marcadores de secuencia expresada (EST) y 3 nuevos genes clonados. Como el gen de MinK se denomina *KCNE1*, los nuevos genes se han denominado *KCNE2*, *KCNE3* y *KCNE4* y sus secuencias de nucleótidos y proteica prevista se han depositado en el NCBI.

Ejemplo 5

MiRP1 es una Subunidad De Canal Iónico

Como un fragmento de gen EST que codificaba MiRP1 de rata (rMiRP1) detectaba un abundante mensajero individual en corazón de rata y músculo esquelético por análisis de transferencia de Northern (Fig. 1A), se exploró una biblioteca de ADNc cardíaca y se aislaron múltiples clones de rMiRP1 idénticos. Una fase de lectura abierta prevista de 369 pb prevé una proteína de 123 aminoácidos con dos sitios de N-glicosilación, un solo segmento transmembrana y secuencias consenso para 2 sitios de fosforilación mediados por la proteína quinasa C (Fig. 1C). Esto sugiere que MiRP1 tiene la misma topología de membrana de Tipo I sencilla encontrada para MinK - un extremo amino extracelular seguido de un solo tramo transmembrana y un extremo carboxi citoplásmico (Busch *et al.*, 1992; Blumenthal and Kaczmarek, 1994; Wang and Goldstein, 1995). Los aislados de rata de MiRP1 y MinK muestran una identidad de aminoácidos del 27% y una homología del 45% (Fig. 1C).

Para ensayar si rMiRP1 podía funcionar como subunidad de canal iónico, su ARNc (1-25 ng) se inyectó en oocitos de *Xenopus laevis*. El ARN complementario para MinK induce corrientes de K^+ en estas condiciones por medio de su asociación con una subunidad formadora de poros endógena para las células (Blumenthal and Kaczmarek, 1992; Wang and Goldstein, 1995; Sanguinetti *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1997). Por el contrario, las mediciones por fijación de voltaje de dos electrodos no reveló corrientes en los días 1-14 después de la inyección con ARNc de rMiRP1 (n = 45, no mostrado). Además, el ARNc de rMiRP1 no tuvo ningún efecto aparente sobre los canales formados por la expresión de subunidades KvLQT1, KCNQ2, Shaker, ($\Delta 6-46$) Shaker retirado por inactivación rápida, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6 o Kv2.1 (n = 15-39, no mostrado). Por el contrario, rMiRP1 tenía efectos significativos sobre las propiedades de canales formados con subunidades de HERG.

Los canales HERG se abren cuando se despolarizan a voltajes positivos que favorecen corrientes de salida de K^+ . Se describen como canales de rectificación interna, sin embargo, porque el movimiento neto de iones a través de estos canales es hacia el interior durante un ciclo de despolarización-hiperpolarización cuando las concentraciones de K^+ en los dos lados de la membrana son iguales (una condición no fisiológica usada rutinariamente para la caracterización de canales). Como se ve en los registros realizados en solución de KCl 100 mM simétrica (Fig. 2) y como se modela más adelante, la rectificación interna se produce como resultado de una rápida inactivación del canal (Shibasaki, 1987; Sanguinetti *et al.*, 1995; Trudeau *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997).



Los canales de HERG se activan desde un estado cerrado a un estado abierto (C→O) tras la despolarización, pero pasa poca corriente hacia el exterior porque rápidamente se inactivan (O→I). Con la repolarización de vuelta a potenciales negativos, los canales rápidamente se recuperan del estado inactivo al estado abierto (O←I) y la corriente de K^+ pasa hasta que se cierran (C←O). El tiempo transcurrido en el estado abierto durante la repolarización es significativo porque la etapa *c* es rápida en comparación con la etapa *d* (una transición denominada desactivación). Esta es la causa de que la velocidad de desactivación tenga una influencia tan fuerte sobre la magnitud de la corriente de K^+ . Como menores concentraciones de Ca^{2+} muestran las transiciones de apertura de los canales de HERG e I_{Kr} nativos (Sanguinetti and Jurkiewicz, 1992; Ho *et al.*, 1996) y (Sanguinetti *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1998), inicialmente se usó una solución de Ca^{2+} 0,3 mM KCl 100 mM para estudiar la influencia de rMiRP1 sobre la función de los canales.

Se descubrió que la activación se alteraba por rMiRP1 usando un protocolo que estima la fracción de canales que dejan el estado cerrado en el equilibrio después de que la membrana pase a diversos potenciales de ensayo (Fig. 2A, 2C). Los canales que contenían rMiRP1 requerían un potencial más positivo, $\sim 9 \pm 1$ mV (media $\pm$ s.e.m. para 10 oocitos), para conseguir la activación semimáxima ($V_{1/2}$) en comparación con canales formados sólo con subunidades HERG; por el contrario, no fue evidente ningún cambio en el factor de pendiente (Fig. 2C). Este cambio en $V_{1/2}$ parecía deberse a una menor velocidad de activación de los canales formados con rMiRP1 (Fig. 2C encarte, modelo etapa *a*).

Las corrientes máximas también se alteraron por rMiRP1. La dimensión de las corrientes de células enteras se evaluó usando un protocolo que activa completamente los canales por medio de una despolarización sostenida y después mide las corrientes máximas a diversos potenciales de ensayo (Fig. 2B). Las corrientes máximas medias fueron un 40% menores para los canales con rMiRP1 en comparación con los formados únicamente con subunidades HERG (Fig. 2D). Como se muestra más adelante, esto se debía principalmente a la corriente alterada de un solo canal (es decir, el número de iones que se mueven a través del canal abierto por unidad de tiempo) en lugar de a los cambios en la apertura del canal.

La inactivación (etapa *b*) se juzgó usando un protocolo de estado estacionario (Smith *et al.*, 1996) en el que la inactivación del canal llega al equilibrio a diversos voltajes durante un prepulso tan breve que puede producirse una pequeña desactivación; después, se evalúa la fracción de canales en estado inactivo pasando el voltaje hasta un potencial de ensayo. La inactivación de los canales de HERG fue igual que la de los que contenían rMiRP1 con voltajes de prepulso de -100 a 30 mV (Fig. 2E). Las relaciones de corriente-voltaje divergían sólo a potenciales más negativos que -100 mV donde eran evidentes las diferencias en la desactivación. La recuperación de la inactivación (etapa *c*) seguía siendo extremadamente rápida en los dos tipos de canales.

La desactivación de los canales (etapa *d*) se alteró notablemente por rMiRP1. Después de activar completamente los canales por una etapa de despolarización, la velocidad con la que los canales volvían al estado cerrado se evaluó a diversos potenciales de ensayo. En estas condiciones iónicas, rMiRP1 indujo un aumento de 7 veces en la velocidad de desactivación (Fig. 2F). De esta manera, los canales de HERG no se desactivaban apreciablemente hasta -100 mV y requerían una etapa de 50 mV más negativos para conseguir la misma velocidad de desactivación que los canales formados con rMiRP1. Aunque la desactivación era sensible al voltaje, el aumento de velocidad con rMiRP1 no cambió de -100 a -150 mV (no mostrado).

Ejemplo 6

Conductancia Unitaria y Desactivación de Canales de rMiRP1 /HERG y Canales I_{Kr} Nativos

El análisis de un solo canal reveló el mecanismo primario por medio del cual rMiRP1 reducía las corrientes máximas en células enteras (Fig. 2D). rMiRP1 producía una reducción en la corriente unitaria de ~ 40% a través de complejos de canales abiertos (Fig. 3A, B). De esta manera, se descubrió que los canales de HERG individuales tenían una conductancia diferencial de $12,9 \pm 2$ pS (Fig. 3C), como se ha descrito previamente (Zou *et al.*, 1997). Los canales que contenían rMiRP1 mostraron un valor de 8 ± 1 pS (Fig. 3C). Éste es similar al valor de conductancia unitaria presentado para canales I_{Kr} nativos en células de nodo auriculoventricular de conejo estudiadas en condiciones idénticas, 8,4 pS (Shibasaki, 1987).

La mayor velocidad de desactivación del canal observada cuando los canales estaban formados con rMiRP1 y se estudiaron en modo de células enteras (Fig. 2F) también fue evidente a nivel de un solo canal (Fig. 4). Aunque los canales de HERG individuales permanecían abiertos durante muchos segundos en las zonas mantenidas a -100 mV, como se ha notificado previamente (Zou *et al.*, 1997), los canales formados con rMiRP1 se cerraban rápidamente (Fig. 4A). Medias de conjunto de 50-70 rastros subrayan la aceleración de 2,3 veces de la desactivación producida por la formación de canales con rMiRP1 (Fig. 4E). De esta manera, los canales formados con rMiRP1 de nuevo eran como los canales I_{Kr} nativos. En monocitos ventriculares humanos y de ratón, se descubrió que los canales I_{Kr} se desactivaban de 2 a 3 veces más rápido que los canales formados con HERG o con subunidades de un gen relacionado con éter a-go-go murino (MERG) (Yang *et al.*, 1994; Sanguinetti *et al.*, 1995; Lees-Miller *et al.*, 1997; London *et al.*, 1997).

Ejemplo 7

Regulación por K^+ Externo de Canales de rMiRP/HERG y Canales I_{Kr} Nativos

A continuación se emplearon condiciones iónicas similares a las del plasma humano (solución de KCl 4 mM, Ca^{2+} ionizado 1 mM). Un rasgo característico de los canales I_{Kr} nativos y los formados sólo de subunidades HERG es una pendiente negativa para la relación de corriente-voltaje a voltajes despolarizados; esto se debe a la inactivación del canal (Sanguinetti *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Spector *et al.*, 1996). Como era de esperar, rMiRP1 no tuvo ningún efecto significativo sobre la forma de la relación de corriente-voltaje (Fig. 5A, B) ya que no tenía alterada la inactivación del canal (Fig. 2E). Por el contrario, la regulación positiva de corrientes de K^+ hacia el exterior asociadas con la elevación de la concentración externa de K^+ , otra notable característica de los canales de HERG y canales I_{Kr} nativos (Sanguinetti and Jurkiewicz, 1992; Sanguinetti *et al.*, 1995) se modificó por rMiRP1. Los canales que contenían rMiRP1 eran menos sensibles que los canales de HERG cuando el ión K^+ externo variaba de 1 a 8 mM (Fig. 5C). También se encontró una baja respuesta a K^+ externo, como la observada en la presente memoria con rMiRP1, cuando se estudiaron canales I_{Kr} nativos en células de aurícula murina o miocitos ventriculares de cobaya (Shibasaki, 1987; Scamps and Carmeliet, 1989; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1992; Sanguinetti *et al.*, 1995; Yang and Roden, 1996). Al estudiarse en condiciones iónicas similares a las del plasma y en el modo de células enteras, de nuevo se observó que rMiRP1 aumentaba la velocidad de desactivación ~2 veces desde $\tau = 130 \pm 8$ ms para canales de HERG a 61 ± 4 ms (media $\pm$ s.e.m., protocolo 3, n = 5 células) (Fig. 5D).

Los efectos combinados de rMiRP1 sobre la activación, desactivación y regulación por el ión K^+ externo, en estas condiciones iónicas, produjeron una relación de corriente-voltaje que cambiaba poco en su forma en comparación con los canales formados por subunidades HERG solas (Fig. 5B). Sin embargo, los oocitos que expresaban canales con rMiRP1 pasaban la mitad de la corriente de entrada y un cuarto de la corriente de salida en comparación con los canales de HERG (Fig. 5D, 5E).

Ejemplo 8

Asociación Estable de Subunidades rMiRP1 y HERG

Se evaluó la interacción de subunidades entre rMiRP y HERG primero estudiando las proteínas modificadas con marcadores de epítomos y expresadas en células de cultivo de tejidos de mamíferos. Los epítomos no tenían ningún efecto aparente sobre la actividad macroscópica del canal (no mostrado). La expresión transitoria de rMiRP1-HA en células COS, seguido del análisis de transferencia de Western con anticuerpo anti-HA, reveló tres bandas específicas a distancias de migración apropiadas para la proteína madura y pequeñas cantidades de sus formas mono- y no glicosiladas (Fig. 6A, calle 1); el tratamiento con endoglisadasa F produjo el colapso del perfil a una banda específica a la menor masa prevista (no mostrado).

La coexpresión de rMiRP1-HA con HERG-cmyc permitió la recuperación de rMiRP1-HA por inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo monoclonal anti-cmyc (Fig. 6, calle 2). Se demostró que la recuperación era específica porque anti-cmyc IP no daba ninguna señal cuando HERG-cmyc se expresaba solo (Fig. 6A, calle 3), cuando rMiRP1-HA se expresaba solo (Fig. 6A, calle 4) o cuando se expresaba la proteína de canal conexina 43-cmyc con rMiRP1-HA (Fig. 6A, calle 5).

Como se ha notificado previamente, MinK y HERG-cmyc también se ensamblan (McDonald *et al.*, 1997). Para comparar la unión de MinK y MiRP1 a HERG-cmyc, se realizó un ensayo usando subunidades de MinK marcada con

³⁵S y MiRP1 sintetizadas *in vitro*. La incubación de rMiRP1 y HERG-cmyc seguido de anti-cmyc IP permitió una fuerte recuperación de rMiRP1, a juzgar por la autorradiografía (Fig. 6B, calle 1). De forma similar, la incubación de rMinK y HERG-cmyc permitió una fuerte recuperación de rMinK (Fig. 6B, calle 2). Cuando rMiRP1 y rMinK se mezclaron en una relación 1:1 y se incubaron a un exceso molar de 5 veces con HERG-cmyc, anti-cmyc IP condujo a una fuerte recuperación de rMiRP1, como la observada en ausencia de rMinK, mientras que la recuperación de rMinK era deficiente (Fig. 6B, calle 3). De esta manera, rMinK y rMiRP1 podían ensamblarse cada uno con HERG-cmyc. Sin embargo, en estas condiciones *in vitro*, la presencia de los dos péptidos favorecía la formación de complejos estables rMiRP1/HERG preferentemente a los formados con rMinK.

Ejemplo 9

Clonación y Función del Gen de rMiRP1 Humano, *hKCNE2*

Basándose en la supuesta correlación molecular de complejos de canales MiRP1/HERG y canales I_{Kr} cardiacos nativos, se clonó el gen de MiRP1 humano (*hKCNE2*) para explorar con respecto a la presencia de mutaciones en pacientes con arritmias cardiacas. Se aislaron múltiples clones idénticos a partir de una biblioteca de ADNc de músculo cardiaco humano. Como ocurre en la rata, los transcritos se detectaron en músculo cardiaco y esquelético (no mostrado). El ADNc humano también predijo una proteína de 123 aminoácidos con 2 sitios de N-glicosilación, un solo segmento transmembrana y 2 sitios de fosforilación mediados por proteína quinasa C. El alineamiento de rMiRP1 de rata y humano mostró una identidad del 82% y una homología del 97% (Fig. 1c).

El gen *hKCNE2* se localizó en el cromosoma 21q22.1 (número de acceso AP000052). Esto era importante porque *hKCNE1*, el gen que codifica MinK, previamente se había localizado en este sitio (número de acceso AP000053). Los 2 genes están dispuestos en orientación opuesta, separados por 79 kb. Sus fases de lectura abiertas comparten una identidad del 34% y los dos están contenidos en un solo exón (Splawski *et al.*, 1998). Esto sugiere que MiRP1 y MinK están relacionados por medio de duplicación génica y evolución divergente.

MiRP1 humano de tipo salvaje, estudiado por expresión transitoria en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) usando solución de KCl 4 mM, Ca^{2+} 1 mM, tuvo los mismos efectos que MiRP1 de rata. Al igual que los canales con rMiRP1, los complejos de hMiRP1/HERG necesitaban la despolarización a potenciales más positivos para conseguir una activación semimáxima y no mostraban ningún cambio en el factor de pendiente en comparación con los canales formados por subunidades HERG solas (Tabla 1). Al igual que rMiRP1, hMiRP1 no alteraba la inactivación en estado estacionario (no mostrado). Al igual que los que tienen rMiRP1, los complejos de hMiRP1/HERG se desactivaban más rápidamente que los canales de HERG, ~3 veces (Tabla 1, τ_f a -120 mV). Finalmente, la conductancia unitaria de los canales formados con hMiRP1 (en oocitos) era igual que la medida para canales con rMiRP1, $8,0 \pm 0,7$ pS ($n = 11$ zonas, no mostrado, como en la Fig. 3C).

TABLA 1

Parámetros de Activación y Desactivación de Canales de hMiRP1/HERG y Canales Formados Sólo con Subunidades HERG

canal	activación	pendiente	desactivación	desactivación	relación de
(Nº de células)	$V_{1/2}$	de	τ_f	τ_s	desactivación
	mV	mV	s	s	$I_f(I_s + I_f)$
HERG (11)	-25 ± 5	$9,1 \pm 1,4$	241 ± 119	782 ± 376	$0,59 \pm 0,19$
WT hMiRP1 (21)	-21 ± 6	$9,5 \pm 1,0$	80 ± 26	483 ± 491	$0,82 \pm 0,03$
T8A hMiRP1 (15)	-29 ± 6	$9,4 \pm 1,7$	100 ± 40	590 ± 370	$0,83 \pm 0,05$
Q9E hMiRP1 (14)	-12 ± 4	$7,6 \pm 0,4$	100 ± 27	750 ± 451	$0,80 \pm 0,11$
M54T hMiRP1 (10)	-21 ± 6	$7,2 \pm 2,0$	37 ± 8	266 ± 35	$0,81 \pm 0,06$

La cinética de activación se estimó en macrozonas (macropatches) en solución de KCl 4 mM, Ca^{2+} , 1, 0 mM. Se midieron las corrientes y se ajustaron para los parámetros de activación con la Figura 2; para la desactivación, se usó una función doble exponencial ($I_0 + I_f e^{(-t/\tau_f)} + I_s e^{(-t/\tau_s)}$) y el protocolo 3 (-120 mV). Cuando se estudió el bloqueo en solución de KCl 1 mM, Ca^{2+} 1 mM, los canales con hMiRP1 de tipo salvaje mostraron un valor de $V_{1/2} = -20 \pm 5$

mV y una pendiente = $9,2 \pm 2$ mientras que los canales de Q9E-hMiRP1 tenían un valor de $V_{1/2} = -12 \pm 5$ mV y una pendiente = $7,6 \pm 1$ ($n = 7-13$ células).

Ejemplo 10

Los Canales de hMiRP1/HERG y los Canales I_{Kr} Nativos Presentan Cinéticas de Bloqueo de Clase III Bifásicas

Una discrepancia fundamental entre los canales I_{Kr} nativos y los canales de HERG clonados es sus respuestas dispares a antiarrítmicos de metanosulfonilida de Clase III como E-4031. Los canales de HERG cerrados expuestos a los agentes muestran poca inhibición con un pulso de ensayo inicial y consiguen un bloqueo de equilibrio lentamente con pulsos de activación repetitivos o despolarización prolongada (Spector *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1998). Por el contrario, los canales I_{Kr} nativos muestran 2 fases de bloqueo - inhibición significativa con el pulso de ensayo inicial y una relajación rápida al bloqueo de equilibrio con pulsos de ensayo posteriores (Carmeliet, 1992; Carmeliet, 1993).

Como era de esperar, los canales de HERG expresados en células CHO y bañados en E-4031 mostraron una inhibición mínima tras el primer pulso de ensayo (Fig. 7A). En un notable contraste, los canales formados con hMiRP1 se inhibían significativamente en el primer pulso, al igual que los canales I_{Kr} nativos (Fig. 7B). La fracción de corriente no bloqueada en el primer pulso por E-4031 $1 \mu\text{M}$ era $0,9 \pm 0,1$ para los canales de HERG y $0,6 \pm 0,2$ para los canales formados con MiRP1 y HERG ($n = 9$ células).

Los canales de HERG en las células CHO alcanzaron el equilibrio lentamente con pulsos repetitivos (Fig. 7C); la relajación se alcanzó de la mejor manera por una sola reducción exponencial con una constante de tiempo (τ) de 26 ± 9 ciclos de pulsos ($n = 9$ células). El bloqueo de los canales con hMiRP1 se describió de la mejor manera como un bloqueo rápido inicial seguido de una sola reducción exponencial con $\tau = 4 \pm 1$ ciclos de pulso ($n = 7$ células, Fig. 7C). De esta manera, los complejos de canales mixtos reproducían la cinética de bloqueo bifásico característica observada con los canales I_{Kr} nativos (Carmeliet, 1992; Carmeliet, 1993).

La potencia de la metanosulfonilida varía ampliamente con el tipo celular y la condición iónica (Snyders and Chaudhary, 1996; Yang and Roden, 1996; Yang *et al.*, 1997). Otros autores han observado que el bloqueo de los canales de HERG por E-4031 es débil en oocitos, $K_i = 588$ nM (Trudeau *et al.*, 1995) y fuerte en células de cultivo de tejido de mamíferos, $K_i = 7,7$ nM (Zhou *et al.*, 1998). En oocitos, también se observó que el bloqueo por E-4031 de los canales de HERG era deficiente, $K_i = 1.250 \pm 200$ nM; los canales formados con rMiRP1 y HERG eran ~ 3 veces más sensibles, $K_i = 380 \pm 60$ (Fig. 5F). En células CHO, los canales de HERG se bloqueaban fuertemente por E-4031, $K_i = 8,8 \pm 0,8$ nM; de nuevo, los canales formados con hMiRP1 eran ~ 2 veces más sensibles, $K_i = 4,6 \pm 0,6$ nM ($n = 6$ células). Se observó que los canales I_{Kr} nativos en miocitos cardíacos de hurón eran sensibles a E-4031, $K_i = 10,3$ nM (Liu-*et al.*, 1996).

Ejemplo 11

Las Mutaciones en MiRP1 Humano están Asociadas Con Arritmias

Para ensayar la hipótesis de que los mutantes de MiRP1 producen arritmia cardíaca, se exploró un panel de 20 pacientes con arritmia inducida por fármaco y 230 pacientes con arritmias hereditarias o esporádicas y sin mutaciones en sus genes *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A* o *KCNE1*. También se evaluó una población de control de 1.010 individuos. El análisis por SSCP y secuenciación de ADN reveló 3 anomalías y 1 polimorfismo.

Q9E-hMiRP1. Uno de 20 pacientes con arritmia inducida por fármacos tuvo una transversión de C a G en el nucleótido +25 de *hKCNE2* produciendo una sustitución de Q9 a E en el supuesto dominio extracelular de hMiRP1. Esta mutación no se identificó en 1.010 individuos de control. El paciente es una mujer afroamericana de 76 años con una historia de hipertensión sanguínea, diabetes no dependiente de insulina e ictus. Dos electrocardiogramas basales mostraron intervalos QT corregidos para el ritmo cardíaco que estaban prolongados al límite ($QT_c = 460$ ms). La ecocardiografía reveló una hipertrofia del ventrículo izquierdo concéntrica con hipocinesis difusa de leve a moderada pero sin dilatación ventricular. La paciente fue admitida en el hospital con neumonía y se trató con 7 dosis de eritromicina intravenosa, 500 mg cada 6 horas y después se cambió a claritromicina oral, 500 mg cada 12 horas. Después de 2 dosis de claritromicina, la electrocardiografía mostró un QT_c de 540 ms. La paciente desarrolló TdP y VF, necesitando desfibrilación. En ese momento, presentaba hipocalcemia con un nivel sérico de potasio de 2,8 meq/L.

M54T-hMiRP1. Uno de 230 pacientes con arritmias hereditarias o esporádicas tuvo una transición de T a C en el nucleótido +161 que causaba la sustitución de T por M54 en el segmento transmembrana previsto. Esta mutación no se identificó en 1.010 individuos de control. Este paciente es una mujer caucásica de 38 años que tenía buena salud. No se estaba sometiendo a ninguna medicación. Este individuo tuvo VF mientras hacía footing. Su resucitación necesitó desfibrilación. Los resultados de la ecocardiografía y la cateterización cardíaca con estudios electrofisiológicos y biopsia del ventrículo derecho fueron normales. Los electrocardiogramas posteriores mostraron una respuesta atípica al ejercicio con intervalos QT_c que variaban de 390 a 500 ms. Se puso un desfibrilador interno automático.

I57T-hMiRP1. Otro de los 230 pacientes con arritmias hereditarias o esporádicas tenía una transición de T a C en +170 que producía una sustitución de I57 por T en el segmento transmembrana previsto. Este paciente es una mujer hispana de 48 años con buena salud y que no tiene historia de TdP o VF. Su electrocardiograma en reposo

muestra un intervalo QT prolongado ($QT_c = 470$ ms). Es miembro de una familia multigeneracional que ahora está bajo evaluación genética, clínica y biofísica.

T8A-hMiRP1. En 18 de 1.260 individuos explorados, un polimorfismo de A a G en el nucleótido +22 produjo un cambio de T8 por A en el supuesto dominio extracelular de MiRP1. El cambio se encontró en 1 paciente con arritmia inducida por quinidina, 1 con arritmia hereditaria o esporádica y 16 controles.

Ejemplo 12

Los Mutantes de hMiRP1 Asociados con Arritmia Reducen el Flujo de K^+

Se compararon canales de hMiRP1/HERG de tipo salvaje y los formados con Q9E, M54T, I57T o T8A-hMiRP1 por expresión transitoria en células CHO usando solución de KCl 4 mM, Ca^{2+} 1 mM. Los canales mutantes formados con Q9E-hMiRP1 y HERG eran similares a los formados con las subunidades de tipo salvaje en su inactivación de estado estacionario y en la velocidad de desactivación (Fig. 8B, 8D; Tabla 1). Sin embargo, este mutante aumentó la dependencia del voltaje de la activación del canal. De esta manera, los canales Q9E-hMiRP1 requerían despolarización a potenciales más positivos para conseguir una activación semimáxima y tenían un factor de pendiente reducido en comparación con el tipo salvaje (Fig. 8C; Tabla 1). Un aumento en la dependencia del voltaje produce menos canales abiertos para una etapa de despolarización dada y, por lo tanto, un menor flujo de K^+ . En el corazón, se prevé que la corriente disminuida de K^+ ralentiza la repolarización de fase 3. Esto prolonga la duración del potencial de acción cardíaco y se refleja en el electrocardiograma de superficie como un intervalo QT prolongado.

Los canales mutantes formados con M54T-hMiRP1 eran parecidos a los del tipo salvaje en su inactivación de estado estacionario (no mostrado). Sin embargo, este mutante también aumentaba la dependencia del voltaje de la activación, en este caso disminuyendo el factor de pendiente de activación sin alterar $V_{1/2}$ (Fig. 8C; Tabla 1). Además, los canales formados con este mutante mostraron una velocidad acelerada de cierre; estos canales se desactivaban ~3 veces más rápido que los formados con hMiRP1 de tipo salvaje y 6-7 veces más rápido que los canales formados por subunidades HERG solas (Fig. 8D; Tabla 1). Como se ha indicado anteriormente, un aumento de la dependencia del voltaje produce menos canales abiertos para una etapa de voltaje dada; una desactivación más rápida indica que los canales mutantes, si se abren, se cerrarán más rápidamente que el tipo salvaje. En el corazón, estos dos efectos reducirían la corriente de K^+ , prolongando el potencial de acción cardíaco y el intervalo QT medido en un electrocardiograma.

I57T-hMiRP1 también disminuyó el flujo de K^+ a través de complejos de canales MiRP1/HERG y se considerará con detalle en otras partes (Splawski *et al.*, 1999).

La variante T8A-hMiRP1 se aisló a partir de 18 de 1260 individuos explorados. Aunque los canales que contenían la variante eran similares a los que tenían MiRP1 de tipo salvaje, mostraron una menor dependencia del voltaje para la activación, abriéndose más rápidamente después de la despolarización (Fig. 8B, 8C, 8D; Tabla 1). La variante se encontró en 2 pacientes con arritmia, 1 con prolongación de QT inducida con quinidina (500 ms). Como se sabe que la quinidina inhibe los canales I_{Kr} cardíacos (Roden *et al.*, 1986), se comparó el bloqueo de los canales formados con el tipo salvaje o T8A-hMiRP1. La sensibilidad a quinidina de los 2 tipos de canales no fue significativamente diferente; los canales de tipo salvaje mostraron una constante de equilibrio (K_i) de $0,79 \pm 0,18 \mu M$ mientras que los canales T8A-hMiRP1 tenían un valor de $K_i = 0,84 \pm 0,10 \mu M$ con coeficientes de Hill de $1,1 \pm 0,07$ y $1,0 \pm 0,05$, respectivamente ($n = 7$ células).

Ejemplo 13

Aumento del Bloqueo por Claritromicina de Canales Formados con Q9E-hMiRP1

Q9E-hMiRP1, asociado con TdP y VF inducidos por claritromicina, se ensambla con HERG para formar canales con mayor sensibilidad al bloqueo por este antibiótico macrólido. La dosis que conducía al semibloqueo de la corriente máxima de salida para los canales formados con hMiRP1 de tipo salvaje era $0,72 \pm 0,18$ mM, similar a la medida para canales formados únicamente con HERG ($0,75 \pm 0,31 \mu M$). Por el contrario, los canales formados con Q9E-hMiRP1 presentaban un valor de K_i de $0,24 \pm 0,04$ mM (Fig. 9A, 9B). Se observó bloqueo sólo a los voltajes positivos hasta el umbral para la activación y aumentó cuando el potencial prepulso se hizo más positivo (Fig. 9C). Esto es coherente con el bloqueo de los canales abiertos, un mecanismo que se considera que subyace a la inhibición de los canales I_{Kr} por agentes antiarrítmicos de Clase III (Spector *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Sin embargo, la claritromicina también produjo un desplazamiento de 10 mV a potenciales más positivos en el $V_{1/2}$ (sin cambio en el factor de pendiente) para los canales de tipo salvaje y Q9E-hMiRP1 (Fig. 9C). En el momento actual, el mecanismo de inhibición de claritromicina se describe de la mejor manera como dependiente del estado.

Como los canales I_{Kr} nativos muestran una sensibilidad creciente a agentes de Clase III con K^+ externo reducido (Yang and Roden, 1996), se volvió a evaluar el bloqueo por claritromicina cuando la concentración de K^+ del baño se redujo de 4 a 1 mM. Aunque el cambio de la solución no tuvo ningún efecto sobre la activación de ningún canal (Tabla 1), la potencia de bloqueo de claritromicina se aumentó ~20% para los dos canales formados con MiRP1 de tipo salvaje y los formados con Q9E-hMiRP1 (tipo salvaje $K_i = 0,59 \pm 0,1$, para Q9E-hMiRP1 $K_i = 0,20 \pm 0,07$ mM, $n = 6$ células cada uno, no mostrado). De esta manera, los canales formados con Q9E-hMiRP1 son más sensibles al bloqueo por claritromicina y la inhibición se intensifica por hipocalcemia intercorriente.

Ejemplo 14

Generación de Anticuerpo Policlonal Contra KCNE2

- 5 Se expresan segmentos de secuencia codificante de *KCNE2* como proteína de fusión en *E. coli*. La proteína sobre-expresada se purifica por elución del gel y se usa para inmunizar conejos y ratones usando un procedimiento similar al descrito por Harlow y Lane (1988). Este procedimiento, según se ha demostrado, genera Ab contra otras diversas proteínas (por ejemplo, véase Kraemer *et al.*, 1993).
- 10 En resumen, un tramo de secuencia codificante de *KCNE2* se clona como una proteína de fusión en el plásmido PET5A (Novagen, Inc., Madison, WI). Después de la inducción con IPTG, se verifica la sobreexpresión de una proteína de fusión con el peso molecular esperado por SDS-PAGE. La proteína de fusión se purifica del gel por electroelución. La identificación de la proteína como el producto de fusión de *KCNE2* se verifica por secuenciación de la proteína en el extremo N. A continuación, la proteína purificada se usa como inmunógeno en conejos. Se inmunizan conejos con 100
- 15 μg de la proteína en adyuvante completo de Freund y se refuerzan dos veces a intervalos de 3 semanas, primero con 100 μg de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund seguido de 100 μg de inmunógeno en PBS. Dos semanas después se recoge el suero que contiene anticuerpo.
- Este procedimiento se repite para generar anticuerpos contra las formas mutantes del producto del gen *KCNE2*.
- 20 Estos anticuerpos, junto con anticuerpos contra *KCNE2* de tipo salvaje, se usan para detectar la presencia y nivel relativo de las formas mutantes en diversos tejidos y fluidos biológicos.

El procedimiento anterior también se usa para generar anticuerpos policlonales específicos para *KCNE3* y *KGNE4*.

Ejemplo 15

Generación de Anticuerpos Monoclonales Específicos para KCNE2

- 30 Se generan anticuerpos monoclonales de acuerdo con el siguiente protocolo. Se inmunizan ratones con inmunógeno que comprende *KCNE2* intacto o péptidos de *KCNE2* (de tipo salvaje o mutante) conjugados con hemocianina de lapa californiana usando glutaraldehído o EDC, como es bien conocido.

- El inmunógeno se mezcla con un adyuvante. Cada ratón recibe cuatro inyecciones de 10 a 100 μg de inmunógeno y después de la cuarta inyección se toman muestras de sangre de los ratones para determinar si el suero contiene anticuerpo contra el inmunógeno. Se determina el título en suero por ELISA o RIA. Los ratones con suero que indica la presencia de anticuerpo contra el inmunógeno se seleccionan para la producción de hibridomas.
- 35

- Se extraen los bazo de los ratones inmunes y se prepara una suspensión de una sola célula (véase Harlow and Lane, 1988). Las fusiones celulares se realizan esencialmente como se describe por Kohler y Milstein (1975). En resumen, se fusionan células de mieloma P3.65.3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) con células inmunes de bazo usando polietilenglicol como se describe por Harlow y Lane (1988). Las células se ponen en las placas a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. En los pocillos individuales se examina el crecimiento y los sobrenadantes de los pocillos con crecimiento se ensayan con respecto a la presencia de anticuerpos específicos para *KCNE2* por ELISA o RIA usando proteína diana *KCNE2* de tipo salvaje o mutante. Las
- 45 células en los pocillos positivos se expanden y subclonan para establecer y confirmar la monoclonalidad.

- Los clones con las especificidades deseadas se expanden y desarrollan como líquido ascítico en ratones o en un sistema de fibras huecas para producir suficientes cantidades de anticuerpo para la caracterización y el desarrollo del ensayo.
- 50

El procedimiento anterior también se usa para generar anticuerpos monoclonales específicos para *KCNE3* y *KCNE4*.

Ejemplo 16

55 *Ensayo Tipo Sándwich para KCNE2*

- Se une anticuerpo monoclonal a una superficie sólida tal como una placa, tubo, perla o partícula. Preferiblemente, el anticuerpo se une a la superficie de pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos. Al anticuerpo en fase sólida se le añaden 100 μl de muestra (por ejemplo, suero, orina, citosol de tejido) que contiene el péptido/proteína *KCNE2* (de tipo salvaje o mutante). La muestra se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se decanta el fluido de la muestra y la fase sólida se lava con tampón para retirar el material no unido. Se añaden a la fase sólida 100 μl de un segundo anticuerpo monoclonal (para un determinante diferente del péptido/proteína *KCNE2*). Este anticuerpo se marca con una molécula detectora (por ejemplo, ^{125}I , enzima, fluoróforo o un cromóforo) y la fase sólida
- 65 con el segundo anticuerpo se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. El segundo anticuerpo se decanta y la fase sólida se lava con tampón para retirar el material no unido.

Se cuantifica la cantidad de marcador unido, que es proporcional a la cantidad de péptido/proteína KCNE2 presente en la muestra. Se realizan ensayos separados usando anticuerpos monoclonales que son específicos para el KCNE2 de tipo salvaje así como anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las mutaciones identificadas en KCNE2.

- 5 El procedimiento anterior también se usa para ensayar KCNE3 y KCNE4 usando los anticuerpos contra KCNE3 o KCNE4 apropiados

Ejemplo 17

10 *Ensayo para Explorar Fármacos que Afectan al Canal de K⁺ de KCNE2*

Con el conocimiento de que KCNE2 se ensambla para formar un canal de potasio I_{Ks} cardíaco, ahora es posible idear un ensayo para explorar fármacos que tengan un efecto sobre este canal. El gen *KCNE2* se cotransfecta en oocitos o células de mamífero y se coexpresa como se ha descrito anteriormente. La cotransfección se realiza usando cualquier combinación de *KCNE2* de tipo salvaje o mutado específicamente. Cuando uno de los genes usados para la cotransfección contiene una mutación que produce LQT, se observa un cambio en la corriente inducida en comparación con la cotransfección con genes de tipo salvaje solo. Se añade un candidato de fármaco a la solución del baño de las células transfectadas para ensayar los efectos de los candidatos de fármaco sobre la corriente inducida. Un candidato de fármaco que altera la corriente inducida de tal forma que esté próxima a la corriente observada con células cotransfectadas con *KCNE2* de tipo salvaje, es útil para tratar LQT.

Aunque la invención se ha descrito en esta solicitud de patente haciendo referencia a los detalles de realizaciones preferidas de la invención, debe entenderse que la descripción debe considerarse en un sentido ilustrativo en lugar de limitante, ya que se contempla que a los especialistas en la técnica se les ocurrirán fácilmente modificaciones dentro del espíritu de la invención y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de referencias

- Altschul, S. F. *et al.* (1990). *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
- 30 Altschul S.F. *et al.* (1997). *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- Anand, R (1992). *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press).
- 35 Anderson, W.F. *et al.* (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5399-5403.
- Anderson, M.A. and Gussella, J.F. (1984). *In Vitro* 20:856-858.
- Antzelevitch, C. and Sicouri, S. (1994). *J. Am. Col. Card.* 23:259-277.
- 40 Antzelevitch, C. *et al.* (1996). *J Am Coll Cardiol* 28:1836-48.
- Attali, B. *et al.* (1993). *Nature* 365:850-852.
- 45 Attwell, D. *et al.* (1979). *Pflugers Arch.* 379:137-142.
- Ausubel, F.M. *et al.* (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, New York, NY).
- Balser, J.R *et al.* (1990). *J. Gen. Physiol.* 96:835-863.
- 50 Balser, J.R. *et al.* (1991). *Circ. Res.* 69:519-529.
- Bandyopadhyay PK and Temin HM (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:749-754.
- 55 Barhanin J, *et al.* (1996). *Nature* 384:78-80.
- Bartel PL, *et al.* (1993). "Using the 2-hybrid system to detect protein-protein interactions." In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, Oxford University Press, pp. 153-179.
- 60 Bazzett H (1920). *Heart* 7:353-370.
- Beaucage SL and Caruthers MH (1981). *Tetra. Letts.* 22:1859-1862.
- Berglund P, *et al.* (1993). *Biotechnology* 11:916-920.
- 65 Berkner KL, *et al.* (1988). *BioTechniques* 6:616-629.
- Berkner KL (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:39-66.

Blumenthal, E. M. and **Kaczmarek**, L. K. (1992). *Neurochemical Research* 17:869-76. Blumenthal, E. M. and

L. K. (1994). *J. Neurosci.* 14:3097-105.

Borman S (1996). Chemical & Engineering News, December 9 issue, pp. 42-43.

Breakefield XO and **Geller AI** (1987). *Mol. Neurobiol.* 1:337-371.

Brinster RL, et al. (1981). *Cell* 27:223-231.

Bruggemann A, et al. (1993). *Nature* 365:445-448.

Buchschacher GL and **Panganiban AT** (1992). *J. Virol.* 66:2731-2739.

Buckler AJ, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 88:4005-4009.

Bum TC, et al. (1995). *Gene* 161:183-187.

Busch AE, et al. (1992). *Science* 255:1705-1707.

Busch, A. E. et al. (1997). *Br J Pharmacol* 122:187-9.

Capecchi MR (1989). *Science* 244:1288.

Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators (1992). *N. Engl. J. Med* 327:227-233.

Cariello NF (1988). *Am. J. Human Genetics* 42:726-734.

Carlsson, L. et al. (1997). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282:220-7.

Carmeliet, E. (1992). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262:809-17.

Carmeliet, E. (1993). *Circ Res* 73:857-68.

Chee M, et al. (1996). *Science* 274:610-614.

Chen, J. et al. (1999). *Biophys. J.* 76:A331.

Chevray PM and **Nathans DN** (1992). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 89:5789-5793.

Chin HM, et al. (1991). *Genomics* 11:914-919.

Church DM, et al. (1994). *Nat. Genet.* 6:98-105.

Compton J (1991). *Nature* 350:91-92.

Conner BJ, et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282.

Costantini F and **Lacy E** (1981). *Nature* 294:92-94.

Cotten M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 87:4033-4037.

Cotton RG, et al. (1988). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 85:4397-4401.

Covarrubias M, et al. (1991). *Neuron* 7:763-773.

Cui J, et al. (1994). *J. Gen Physiol.* 104:87-105.

Culver KW, et al. (1992). *Science* 256:1550-1552.

Culver K (1996). *Gene Therapy: A Primer for Physicians*, 2nd Ed., Mary Ann Liebert.

Curiel DT, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 88:8850-8854.

Curiel DT, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:147-154.

Currán ME, et al. (1995). *Cell* 80:795-804.

Daleau, P. et al. (1995). *Circulation* 91:3010-6.

DeRisi J, et al. (1996). *Nat. Genet.* 14:457-460.

Deutscher M (1990). *Meth. Enzymology* 182:83-89 (Academic Press, San Diego, Cal.).

Donehower LA, et al. (1992). *Nature* 356:215.

Drici, M. D. et al. (1998). *JAMA* 280:1774-6.

Duggal P et al. (1998). *Circulation* 97:142-146.

Ebert, S. N. et al. (1998). *J Womens Health* 7:547-57.

Editorial (1996). *Nature Genetics* 14:367-370.

Eichelbaum, M. et al. (1996). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 983-985

Elghanian R, et al. (1997). *Science* 277:1078-1081.

Ellenbogen, K. A. et al. (1996). *J Am Coll Cardiol* 28:130-6.

Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1983).

Erickson J, et al. (1990). *Science* 249:527-533.

Fahy E, et al. (1991). *PCR Methods Appl.* 1:25-33.

Felgner PL, et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.

Fields S and Song O-K (1989). *Nature* 340:245-246.

Fiers W, et al. (1978). *Nature* 273:113-120.

Fink DJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:11-19.

Fink DJ, et al. (1996). *Ann. Rev. Neurosci.* 19:265-287.

Finkelstein J, et al. (1990). *Genomics* 7:167-172.

Fodor SPA (1997). *Science* 277:393-395.

Freese A, et al. (1990). *Biochem. Pharmacol.* 40:2189-2199.

Friedman T (1991). *In Therapy for Genetic Diseases*, T. Friedman, ed., Oxford University Press, pp. 105-121.

ellens M, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:554-558.

George AL, et al. (1995). *Cytogenet. Cell. Genet.* 68:67-70.

Glover D (1985). *DNA Cloning*, I and II (Oxford Press).

Goding (1986). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed. (Academic Press, N.Y.).

Godowski PJ, et al. (1988). *Science* 241:812-816.

Goldstein SAN and Miller C (1991). *Neuron* 7:403-408.

Gordon JW, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384.

Gorziglia M and Kapikian AZ (1992). *J. Virol.* 66:4407-4412.

Graham FL and van der Eb AJ (1973). *Virology* 52:456-467.

Green ED and Olson MV (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1213-1217.

Grompe M (1993). *Nature Genetics* 5:111-117.

Grompe M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5855-5892.

Guthrie G and Fink GR (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press).

Gyapay G, et al. (1994). *Nat. Genet.* 7:246-339.

Hacia JG, et al. (1996). *Nature Genetics* 14:441-447.

Harlow E and Lane D (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Hasty PK, et al. (1991). *Nature* 350:243.

Hausdorff SF, et al. (1991). *Biochem.* 30:3341-3346.

Heginbotham L, et al. (1994). *Biophys. J.* 66:10151-1067.

Helseth E, et al. (1990). *J. Virol.* 64:2416-2420.

Ho, W. K. et al. (1998). *J Physiol (Lond)* 507:631-8.

Hodgson J (1991). *Bio/Technology* 9:19-21.

Hohnloser, S. H., and Woosley, R L. (1994). *Sotalol. N Engl J Med* 331:31-8.

Howarth, F. C. et al. (1996). *Pflugers Arch* 431:713-22.

Huse WD, et al. (1989). *Science* 246:1275-1281.

Innis MA, et al. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, San Diego, CA).

Jablonski E, et al. (1986). *Nucl. Acids Res.* 14:6115-6128.

Jakoby WB and Pastan IH (eds.) (1979). *Cell Culture, Methods in Enzymology* Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY)).

January CT and Riddle JM (1989). *Circ. Res.* 64:977-990.

Jervell A and Lange-Nielsen F (1957). *Am. Heart J.* 54:59-68.

Jiang C, et al. (1994). *Nat. Genet.* 8:141-147.

Johnson PA, et al. (1992). *J. Virol.* 66:2952-2965.

Johnson, et al. (1993). "Peptide Turn Mimetics" in *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York.

Kaczmarek, L. K., and Blumenthal, E. M. (1997). *Physiol Rev* 77:627-41.

Kaneda Y, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:1216-12129.

Kanehisa M (1984). *Nucl. Acids Res.* 12:203-213.

Kannel WB, et al. (1987). *Am. Heart J.* 113:799-804.

Katapadi, K. et al. (1997). *Angiology* 48:821-6.

Keating MT, et al. (1991a). *Science* 252:704-706.

Keating MT, et al. (1991b). *Am. J. Hum. Genet.* 49:1335-1339.

Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1996). *Curr Opin Genet Dev* 6:326-33.

Kinszler KW, et al. (1991). *Science* 251:1366-1370.

Kohler G and Milstein C (1973). *Nature* 256:495-497.

Kraemer FB, et al. (1993). *J. Lipid Res.* 34:663-672.

- Kubo T, et al. (1988).** *FEBS Lett.* 241:119.
- Kundu, S., et al. (1997).** *Ann Emerg Med* 30:542-4.
- 5 **Kwiatkowski TJ, et al. (1990).** *Nucl. Acids Res.* 18:7191-7192.
- Kyte J and Doolittle RF (1982).** *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Landegren U, et al. (1988).** *Science* 242:229-237.
- 10 **Lathrop, GM, et al. (1985).** *Am. J. Hum. Genet.* 37:482-498.
- Lee JE, et al. (1995).** *Science* 268:836-844.
- 15 **Lee, K. L. et al. (1998).** *Am J Med* 104:395-6.
- Lees-Miller, J. P. et al. (1997).** *Circ Res* 81:719-26.
- Lesage F, et al. (1993).** *Receptors and Channels* 1:143-152.
- 20 **Li G-R, et al. (1996).** *Circ. Res.* 78:689-696.
- Lim CS, et al. (1991).** *Circulation* 83:2007-2011.
- 25 **Linder, M. W. et al. (1997).** *Clin. Chem.* 43:254-266.
- Lipshutz RJ, et al. (1995).** *BioTechniques* 19:442-447.
- Liu DW and Antzelevitch C (1995).** *Circ. Res.* 76:351-365.
- 30 **Liu, S. et al. (1996).** *Biophys J* 70, 2704-15.
- Lockhart DJ, et al. (1996).** *Nature Biotechnology* 14:1675-1680.
- 35 **London, B. et al. (1997).** *Circ Res* 81:870-8.
- MacKinnon R (1991).** *Nature* 350:232-235.
- MacKinnon R, et al. (1993).** *Science* 262:757-759.
- 40 **Madzak C, et al. (1992).** *J. Gen. Virol.* 73:1533-1536.
- Magovcevic I, et al. (1992).** *Genomics* 12:125-129.
- 45 **Makkar, R. R. et al. (1993).** *JAMA* 270:2590-7.
- Maniatis T, et al. (1982).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 50 **Mann R and Baltimore D (1985).** *J. Virol.* 54:401-407.
- Marchuk D, et al. (1991).** *Nucl. Acids Res.* 19:1154.
- Margolskee RF (1992).** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:67-95.
- 55 **Martin R, et al. (1990).** *BioTechniques* 9:762-768.
- Matsuura H, et al. (1987).** *Pflugers Arch.* 410:596-603.
- 60 **Matteucci MD and Caruthers MH (1981).** *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185.
- Matthews JA and Kricka LJ (1988).** *Anal. Biochem.* 169:1.
- McDonald, T. V. et al. (1997).** *Nature* 388:289-92.
- 65 **Merrifield B (1963).** *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156.
- Metzger D, et al. (1988).** *Nature* 334:31-36.

- Mifflin** TE (1989). *Clinical Chem.* 35:1819-1825.
- Miller** AD (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 159:1-24.
- 5 **Miller** AD, *et al.* (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5:431-437.
- Miller** AD, *et al.* (1988). *J. Virol.* 62:4337-4345.
- Modrich** P (1991). *Ann. Rev. Genet.* 25:229-253.
- 10 **Mombaerts** P, *et al.* (1992). *Cell* 68:869.
- Moss** AJ and **McDonald** J (1971). *N. Engl. J. Med.* 285:903-904.
- 15 **Moss** AJ, *et al.* (1991). *Circulation* 84:1136-1144.
- Moss** B (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:25-38.
- Moss** B (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11341-11348.
- 20 **Muzyczka** N (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129.
- Nabel** EG, *et al.* (1990). *Science* 249:1285-1288.
- 25 **Nabel** (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:399-410.
- Naldini** L, *et al.* (1996). *Science* 272:263-267.
- Newton** CR, *et al.* (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516.
- 30 **Neyroud** N, *et al.* (1997). *Nat. Genet.* 15:186-189.
- Nguyen** Q, *et al.* (1992). *BioTechniques* 13:116-123.
- 35 **Novack** DF, *et al.* (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:586-590.
- Oebman** H, *et al.* (1988). *Genetics* 120:621-623.
- Ohi** S, *et al.* (1990). *Gene* 89:279-282.
- 40 **Orita** M, *et al.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770.
- Page** KA, *et al.* (1990). *J. Virol.* 64:5270-5276.
- 45 **Pellicer** A, *et al.* (1980). *Science* 209:1414-1422.
- Petropoulos** CJ, *et al.* (1992). *J. Virol.* 66:3391-3397.
- Philpott** KL, *et al.* (1992). *Science* 256:1448.
- 50 **Pongs** O, *et al.* (1988). *EMBO J.* 7:1087-1095.
- Quantin** B, *et al.* (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584.
- 55 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).
- Rettig** J, *et al.* (1994). *Nature* 369:289-294.
- Rigby** PWJ, *et al.* (1977). *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
- 60 **Roden**, D. M. (1998). *Pace-Pacing and Clinical Electrophysiology* 21:1029-1034.
- Roden**, D. M. *et al.* (1986). *Am Heart J* 111:1088-93.
- 65 **Romano** C (1965). *Lancet* 1658-659.
- Romano** C, *et al.* (1963). *Clin Pediatr.* 45:656-683.

ES 2 338 520 T3

- Rosenfeld** MA, *et al.* (1992). *Cell* 68:143-155.
- Ruano** G and **Kidd** KK (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:8392.
- 5 **Russell** MW, *et al.* (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:503-507.
- Russell** D and **Hirata** R (1998). *Nature Genetics* 18:323-328.
- 10 **Sambrook** J, *et al.* (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Sanguinetti** MC and **Jurkiewicz** NK (1990). *J. Gen Physiol.* 96:195-215.
- Sanguinetti**, M. C., and **Jurkiewicz**, N. K. (1992). *Pflugers Archiv* 420:180-6.
- 15 **Sanguinetti** MC, *et al.* (1995). *Cell* 81:299-307.
- Sanguinetti** MC, *et al.* (1996a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2208-2212.
- 20 **Sanguinetti** MC, *et al.* (1996b). *Nature* 384:80-83.
- Scamps**, F., and **Carmeliet**, E. (1989). *Am J Physiol* 257:C1086-92.
- Scharf** SJ, *et al.* (1986). *Science* 233:1076-1078.
- 25 **Schneider** G, *et al.* (1998). *Nature Genetics* 18:180-183.
- Schott** J, *et al.* (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:1114-1122.
- 30 **Schultze-Bahr** E, *et al.* (1997). *Nat. Genet.* 17:267-268.
- Schwartz** PJ, *et al.* (1975). *Am. Heart J.* 109:378-390.
- Schwartz** PJ, *et al.* (1994). "The long QT syndrome". In *Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside*. D. P. Zipes and J. Jalife eds. (W.B. Sanders Company) pp.788-811.
- 35 **Scopes** R (1982). *Protein Purification: Principles and Practice*, (Springer-Verlag, NY).
- Seino** S, *et al.* (1992). *Genomics* 13:1375-1377.
- 40 **Sesti**, F., and **Goldstein**, S. A. N. (1998). *J. Gen Phys.* 112:651-64.
- Sheffield** VC, *et al.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236.
- 45 **Sheffield** VC, *et al.* (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 49:699-706.
- Shenk** TE, *et al.* (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:989-993.
- Shi** G, *et al.* (1996). *Neuron* 16:843-852.
- 50 **Shibasaki**, T. (1987). *J Physiol* 387:227-250.
- Shimada** T, *et al.* (1991). *J. Clin. Invest.* 88:1043-1047.
- 55 **Shinkai** Y, *et al.* (1992). *Cell* 68:855.
- Shoemaker** DD, *et al.* (1996). *Nature Genetics* 14:450-456.
- Smith** PL, *et al.* (1996). *Nature* 379:833-836.
- 60 **Snouwaert** JN, *et al.* (1992). *Science* 257:1083.
- Snyders**, D. J., and **Chaudhary**, A. (1996). *Mol Pharmacol* 49:949-55.
- 65 **Sorge** J, *et al.* (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:1730-1737.
- Spargo** CA, *et al.* (1996). *Mol. Cell. Probes* 10:247-256.

- Spector**, P. S. *et al.* (1996). *Circ Res* 78:499-503.
- Spector** PS, *et al.* (1996). *J. Gen Physiol.* 107:611-619.
- 5 **Splawski** I, *et al.* (1997a). *N. Engl. J. Med* 336:1562-1567.
- Splawski** I, *et al.* (1997b). *Nat. Genet.* 17:338-340.
- Splawski**, I. *et al.* (1998). *Genomics* 51:86-97.
- 10 **Stenberg** N (1990). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 87:103-107.
- Stewart** MJ, *et al.* (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:267-275.
- 15 **Stratford-Perricaudet** LD, *et al.* (1990). *Hum. Gene Ther.* 1:241-256.
- Surawicz** B (1989). *J. Am. Coll. Cardiol.* 14:172-184.
- Swanson** R, *et al.* (1993). *Seminars in the Neurosciences* 5:117-124.
- 20 **Tai**, K.-K. *et al.* (1997). *J. Biol. Chem.* 272:1654-1658.
- Tai**, K. K., and **Goldstein**, S.A.N. (1998). *Nature* 391:605-608.
- 25 **Takumi** T, *et al.* (1988). *Science* 242:1042-1045.
- Takumi** T, *et al.* (1991). *J. Biol. Chem.* 266:22192-22198.
- Tanigami** A, *et al.* (1992). *Am. J. Hum. Genet.* 50:56-64.
- 30 **Tokino** T, *et al.* (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 48:258-268.
- Tyson** J, *et al.* (1997). *Hum. Mol. Genet.* 6:2179-2185.
- 35 **Valancius** V and **Smithies** O (1991). *Mol. Cell Biol.* 11:1402.
- Veldkamp**, M. W. *et al.* (1995). *Circulation* 92:3497-504.
- Vetter** DE, *et al.* (1996). *Neuron* 17:1251-1264.
- 40 **Vincent** GM, *et al.* (1992). *N. Engl. J. Med* 327:846-852.
- Wagner** E, *et al.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4255-4259.
- 45 **Wagner** E, *et al.* (1990). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 87:3410-3414.
- Walker** GT, *et al.*, (1992). *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696.
- Wang** KW and **Goldstein** SA (1995). *Neuron* 14:1303-1309.
- 50 **Wang** KW, *et al.* (1996). *Neuron* 16:571-577.
- Wang** CY and **Huang** L (1989). *Biochemistry* 28:9508-9514.
- 55 **Wang** Q and **Keating** MT (1994). *BioTechniques* 17:282-284.
- Wang** Q, *et al.* (1995a). *Cell* 80:805-811.
- Wang** Q, *et al.* (1995b). *Hum. Mol. Genet.* 4:1603-1607.
- 60 **Wang** Q, *et al.* (1996). *Nat. Genet.* 12:17-23.
- Wang**, S. *et al.* (1997). *J Physiol* 502:45-60.
- 65 **Wang**, S. *et al.* (1997). *FEBS Lett* 417:43-7.
- Ward** OC (1964). *J. Ir. Med. Assoc.* 54:103-106.

Warmke JE and **Ganetzky** B (1994). *Proc. Natl. Acad Sci.* 91:3438-3442.

Wartell RM, *et al.* (1990). *Nucl. Acids Res.* 18:2699-2705.

Weinstein LS *et al.* (1988). *FEBS Letters* 232:333-340.

Wells JA (1991). *Methods Enzymol.* 202:390-411.

Wetmur JG and **Davidson** N (1968). *J. Mol. Biol.* 31:349-370.

White MB, *et al.* (1992). *Genomics* 12:301-306.

White R and **Lalouel** JM (1988). *Annu. Rev. Genet.* 22:259-279.

Wilkinson GW and **Akrigg** A (1992). *Nucleic Acids Res.* 20:2233-2239.

Willich SN, *et al.* (1987). *Am. J. Cardiol.* 60:801-806.

Wolff JA, *et al.* (1990). *Science* 247:1465-1468.

Wolff JA, *et al.* (1991). *BioTechniques* 11:474-485.

Wollnik, B. *et al.* (1997). *Hum Mol Genet* 6:1943-9.

Woosley, R. L. *et al.* (1993). *JAMA* 269:1532-6.

Wu DY and **Wallace** RB (1989). *Genomics* 4:560-569.

Wu CH, *et al.* (1989). *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987.

Wu GY, *et al.* (1991). *J. Biol. Chem.* 266:14338-14342.

Wymore RS, *et al.* (1994). *Genomics* 20:191202.

Yang, T., and **Roden**, D. M. (1996). *Circulation* 93:407-11.

Yang, T. *et al.* (1994). *Circ Res* 75:870-8.

Yang, T. *et al.* (1997). *Circ Res* 80:782-9.

Yang WP, *et al.* (1997). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 94:4017-4021.

Yang, Y., and Sigworth, F. (1998). *J. Gen Physiol.* 112:665-678.

Zenke M, *et al.* (1990). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 87:3655-3659.

Zhou, Z. *et al.* (1998). *Biophys J* 74:230-41.

Zipes DP (1987). *Am. J. Cardiol.* 59:26E-31E.

Zou, A. *et al.* (1997). *Am J Physiol* 272:H1309-14.

Patentes y solicitudes de patente publicadas

European Patent Application Publication No. 0332435.

EPO Publication No. 225,807.

Hitzeman *et al.*, EP 73,675A.

EP 425,731A.

WO 84/03564.

WO 90/07936.

WO 92/19195.

ES 2 338 520 T3

WO 93/07282.

WO 94/25503.

5 WO 95/01203.

WO 95/05452.

10 WO 96/02286.

WO 96/02646.

WO 96/11698.

15 WO 96/40871.

WO 96/40959.

WO 97/02048.

20 WO 97/12635.

U.S. 3,817,837.

25 U.S. 3,850,752.

U.S. 3,939,350.

U.S. 3,996,345.

30 U.S. 4,275,149.

U.S. 4,277,437.

35 U.S. 4,366,241.

U.S. 4,376,110.

U.S. 4,486,530.

40 U.S. 4,554,101.

U.S. 4,683,195.

45 U.S. 4,683,202.

U.S. 4,816,567.

U.S. 4,868,105.

50 U.S. 5,252,479.

U.S. 5,270,184.

55 U.S. 5,409,818.

U.S. 5,436,146.

U.S. 5,455,166.

60 U.S. 5,550,050.

U.S. 5,691,198.

65 U.S. 5,735,500.

U.S. 5,747,469.

ES 2 338 520 T3

U.S. 5,846,710.

U.S. 5,856,092.

5 U.S. 5,888,819.

U.S. 6,004,744.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica MiRP1 humano indicado en la SEC ID N°: 2 o su complementaria.

2. Polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2.

3. Procedimiento de amplificación de un exón de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2, donde dicho procedimiento comprende usar un par de cebadores.

4. Vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 1.

5. Célula transfectada con el vector de la reivindicación 4.

6. Animal transgénico no humano que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 1.

7. Procedimiento para evaluar el riesgo de un individuo de padecer el síndrome de QT largo, que comprende explorar el individuo en relación con una mutación en MiRP1 comparando la secuencia de MiRP1 o sus productos de expresión aislados de una muestra de tejido de dicho individuo con una secuencia de tipo salvaje de MiRP1 o sus productos de expresión, donde la secuencia de tipo salvaje de MiRP1 codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2, donde una mutación en la secuencia del individuo indica un riesgo de síndrome de QT largo.

8. Procedimiento de cribaje de fármacos que sean útiles en el tratamiento o prevención del síndrome de QT largo, dicho procedimiento comprendiendo:

(a) poner células que expresan *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en una solución de baño para medir la corriente;

(b) medir la corriente de K⁺ inducida en las células de la etapa (a);

(c) poner las células que expresan *HERG* mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en una solución de baño para medir la corriente;

(d) medir la corriente de K⁺ inducida en las células de la etapa (c);

(e) añadir un fármaco a la solución de baño de la etapa (c);

(f) medir una corriente de K⁺ inducida en las células de la etapa (e); y

(g) determinar si el fármaco produjo una corriente de K⁺ inducida más similar o menos similar a la corriente de K⁺ inducida observada en las células que expresan *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en comparación con la corriente observada en células que expresan *HERG* mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en ausencia de un fármaco,

donde un fármaco que produce una corriente más similar a la corriente observada en las células que expresan *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 es útil en el tratamiento o prevención del síndrome de QT largo.

9. Procedimiento de la reivindicación 8, en el que: i) dichas células de la etapa (a) se cotransfectan con *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2, ii) dichas células de la etapa (c) se cotransfectan con *HERG* mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2, o iii) dichas células de la etapa (a) se cotransfectan con *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 y dichas células de la etapa (c) se cotransfectan con *HERG* mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2.

10. Procedimiento de la reivindicación 8, en el que: i) dichas células de la etapa (a), ii) dichas células de la etapa (c) o iii) dichas células de las etapas (a) y (c) se transfectan con ARN.

11. Procedimiento de cribaje de fármacos que sean útiles en el tratamiento o prevención del síndrome de QT largo, dicho procedimiento comprendiendo:

(a) preparar un animal transgénico no humano cotransfectado con *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2;

ES 2 338 520 T3

(b) medir la corriente de K^+ inducida en el animal transgénico de la etapa (a);

(c) preparar un animal transgénico no humano cotransfectado con *HERG* de tipo mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2;

(d) medir la corriente de K^+ inducida en el animal transgénico de la etapa (c);

(e) administrar un fármaco al animal transgénico de la etapa (c);

(f) medir la corriente de K^+ inducida en el animal tratado con fármaco de la etapa (e);

(g) determinar si el fármaco produjo una corriente de K^+ inducida más similar o menos similar a la corriente de K^+ inducida observada en el animal transgénico cotransfectado con *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en comparación con la corriente observada en un animal transgénico cotransfectado con *HERG* mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en ausencia de fármaco,

donde un fármaco que produce una corriente más similar a la corriente observada en animales transgénicos cotransfectados con *HERG* de tipo salvaje y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 es útil en el tratamiento o prevención del síndrome de QT largo.

12. Animal transgénico no humano, donde dicho animal comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 y un *HERG* humano mutante.

13. Procedimiento para determinar la capacidad de un fármaco de afectar a la corriente de potasio rectificadora retardada rápida (I_{Kr}), dicho procedimiento comprendiendo:

a) poner células que expresan *HERG* mutante y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido indicado en la SEC ID N°: 2 en una solución de baño para medir la corriente;

b) medir o detectar una primera corriente de K^+ inducida en las células de la etapa (a);

c) añadir un fármaco a la solución de baño de la etapa (a);

d) medir una segunda corriente de K^+ inducida en las células de la etapa (c); y

e) determinar si la adición de dicho fármaco en la etapa (c) inhibe, aumenta o altera el I_{Kr} comparando dicha primera corriente de K^+ inducida con dicha segunda corriente de K^+ inducida.

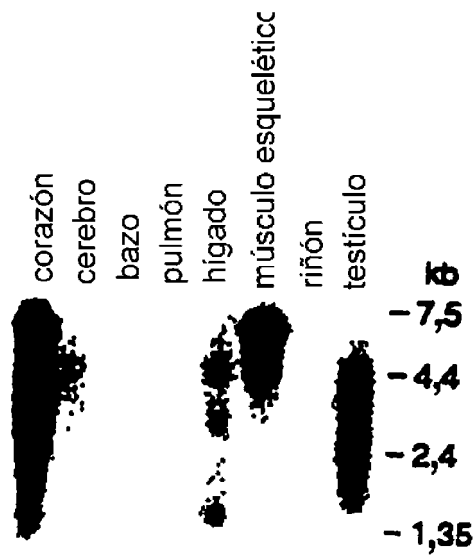


FIG. 1A



FIG. 1B

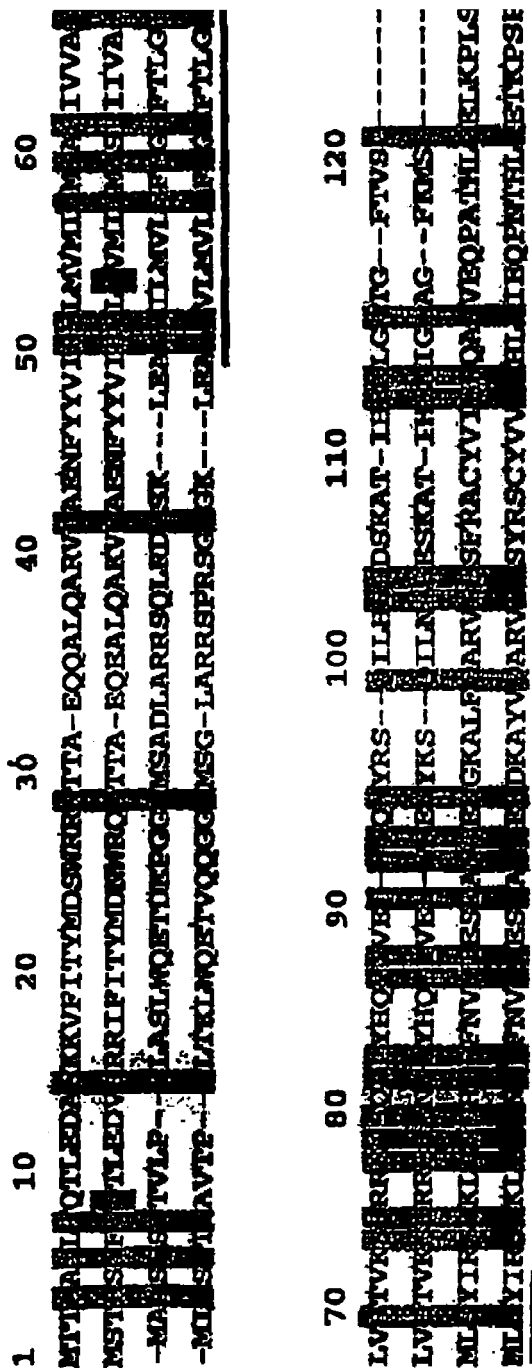
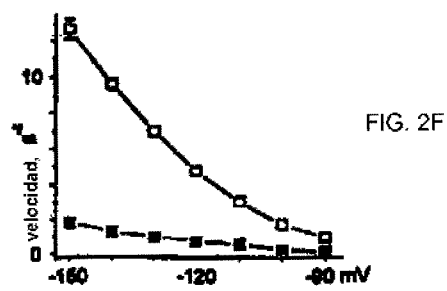
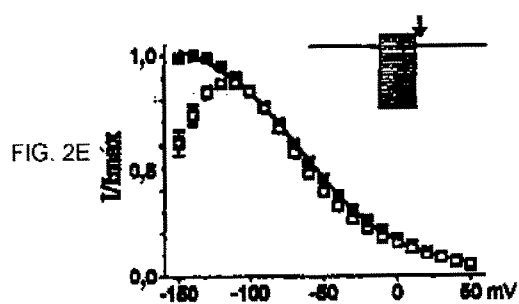
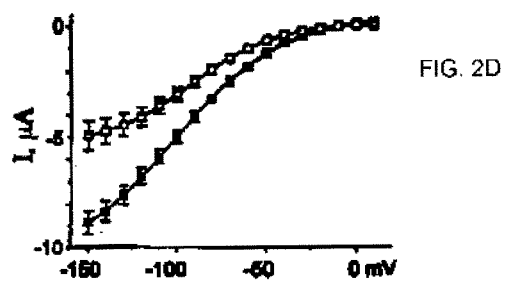
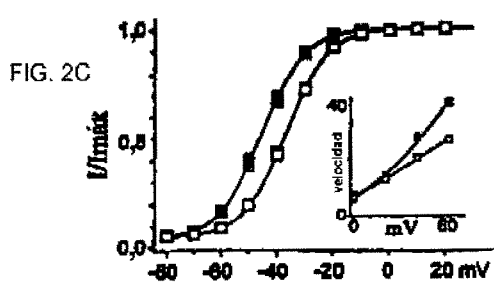
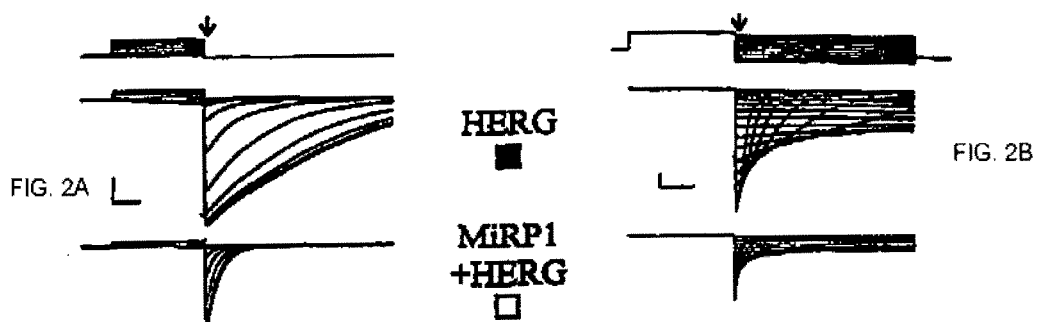


FIG. 1C



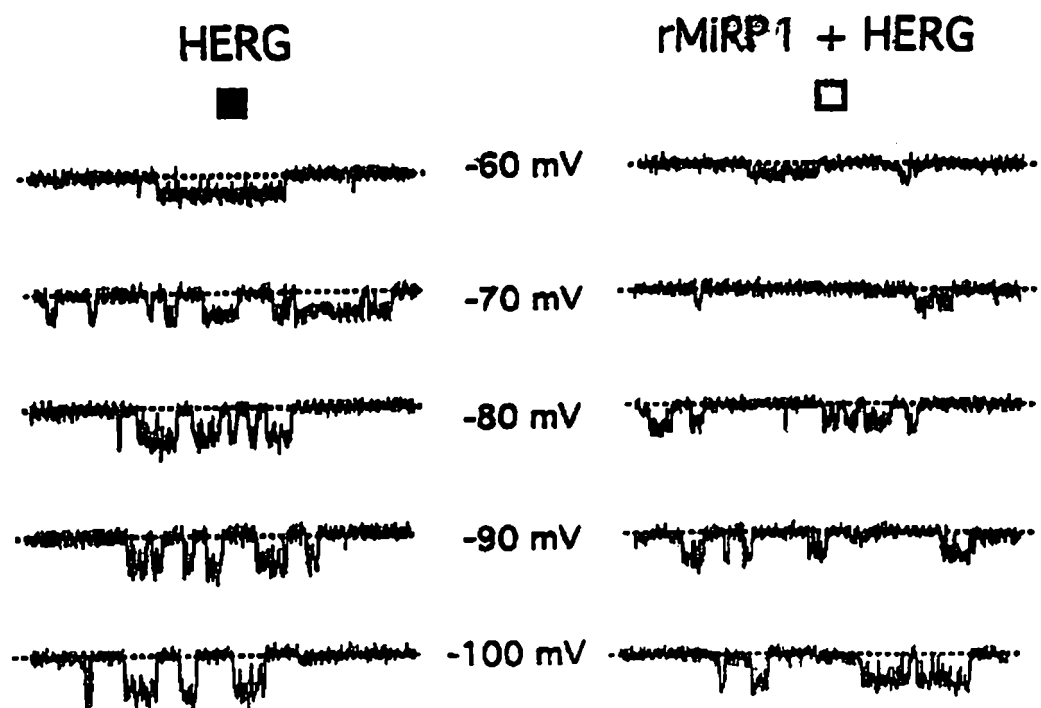


FIG. 3A

1 pA
0,1 s

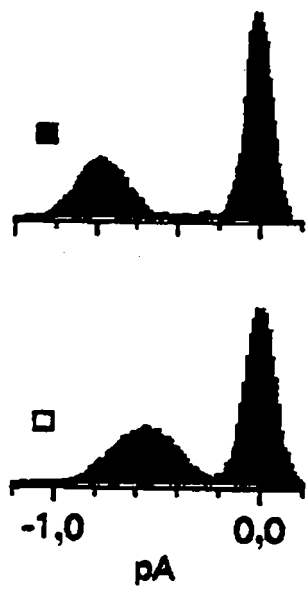


FIG. 3B

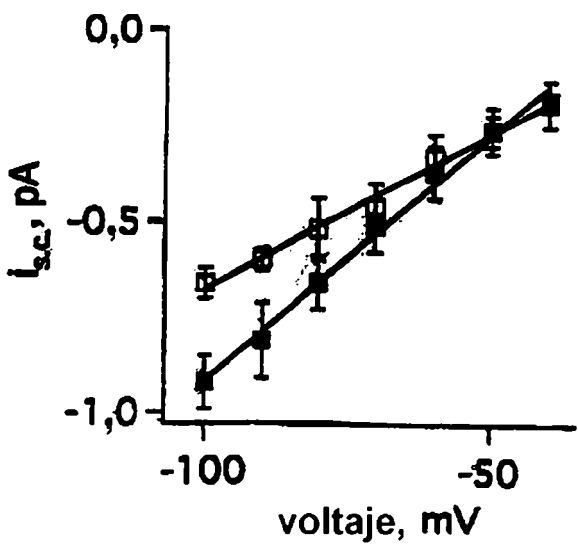


FIG. 3C

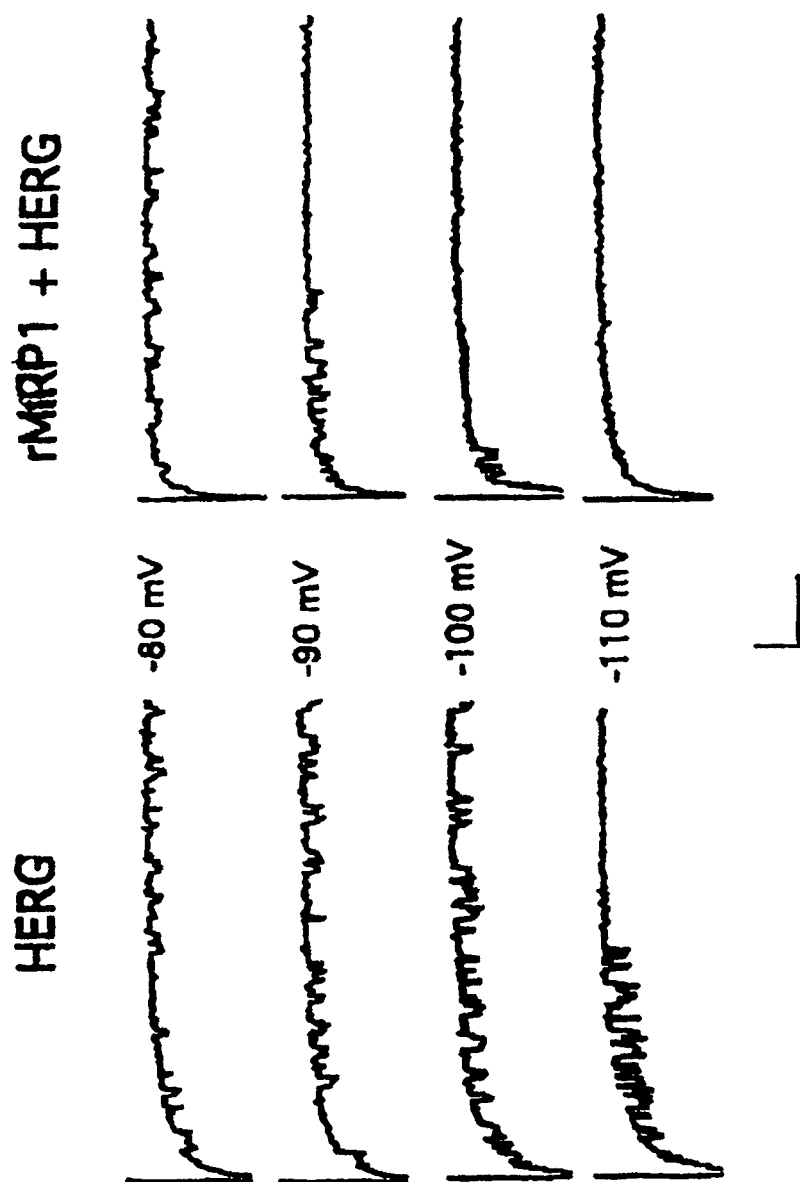
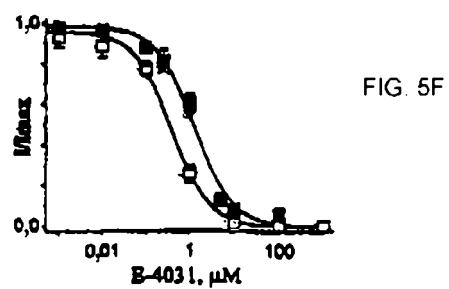
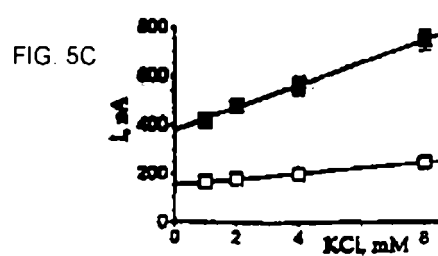
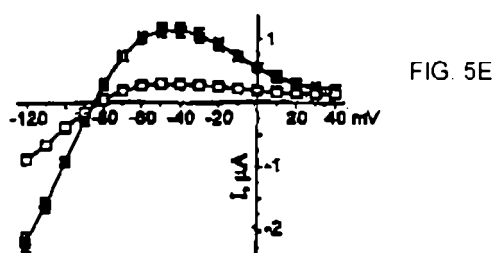
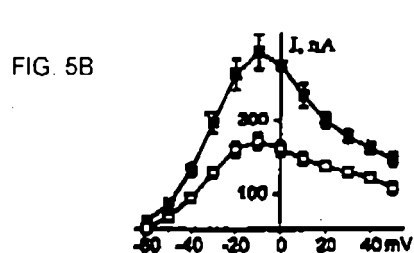
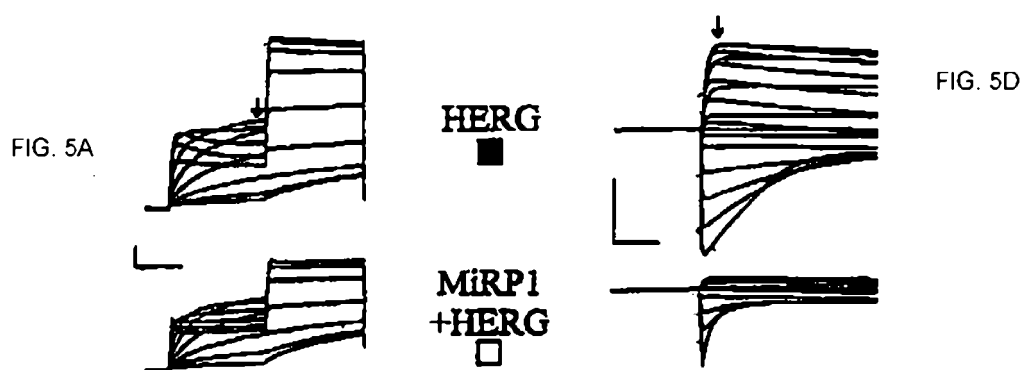


FIG. 4A



FIG. 4B



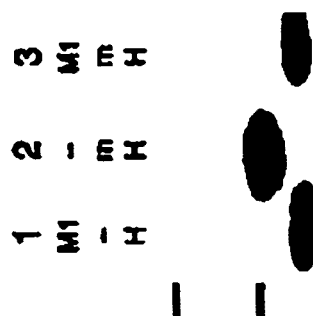


FIG. 6B

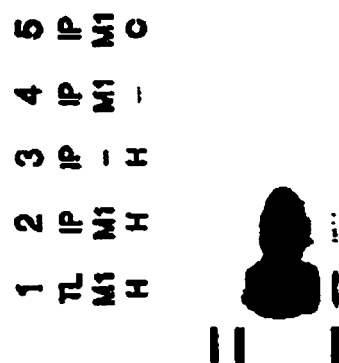
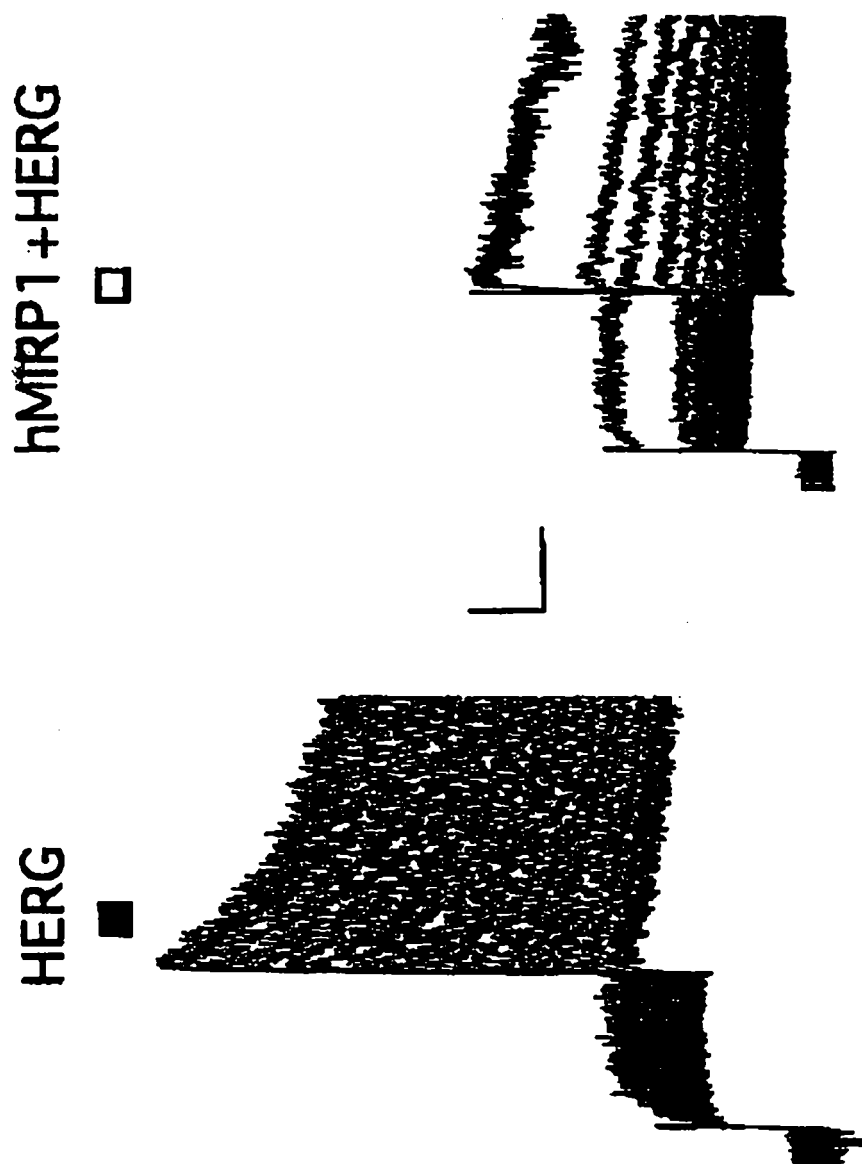


FIG. 6A



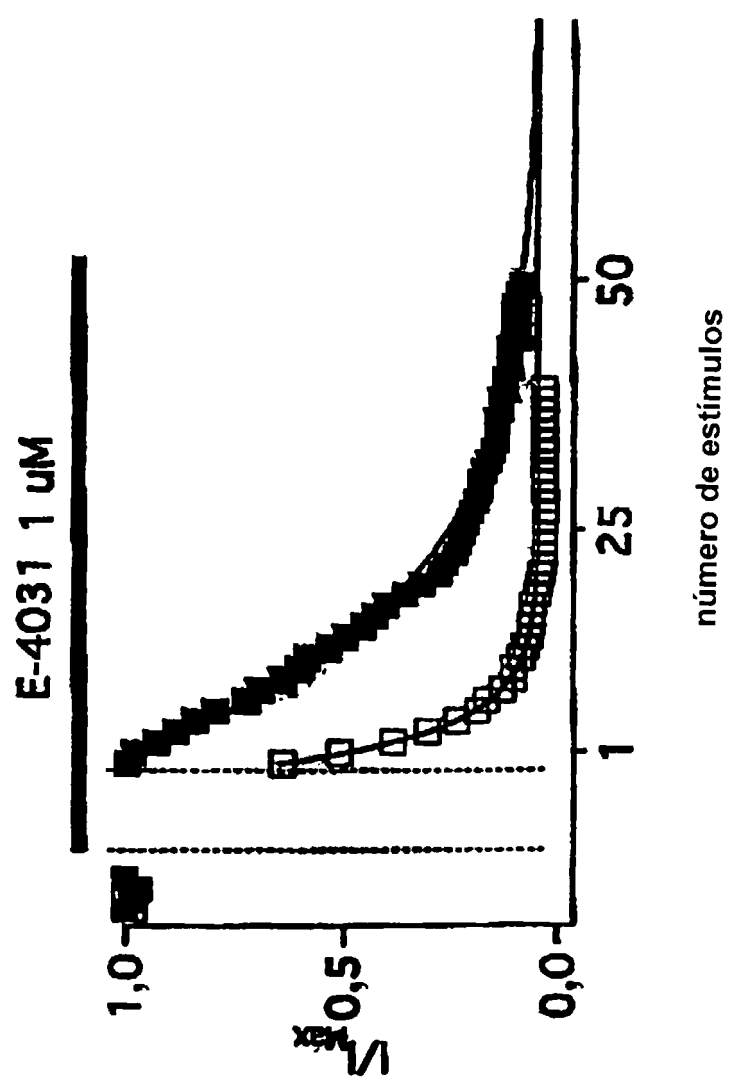


FIG. 7C

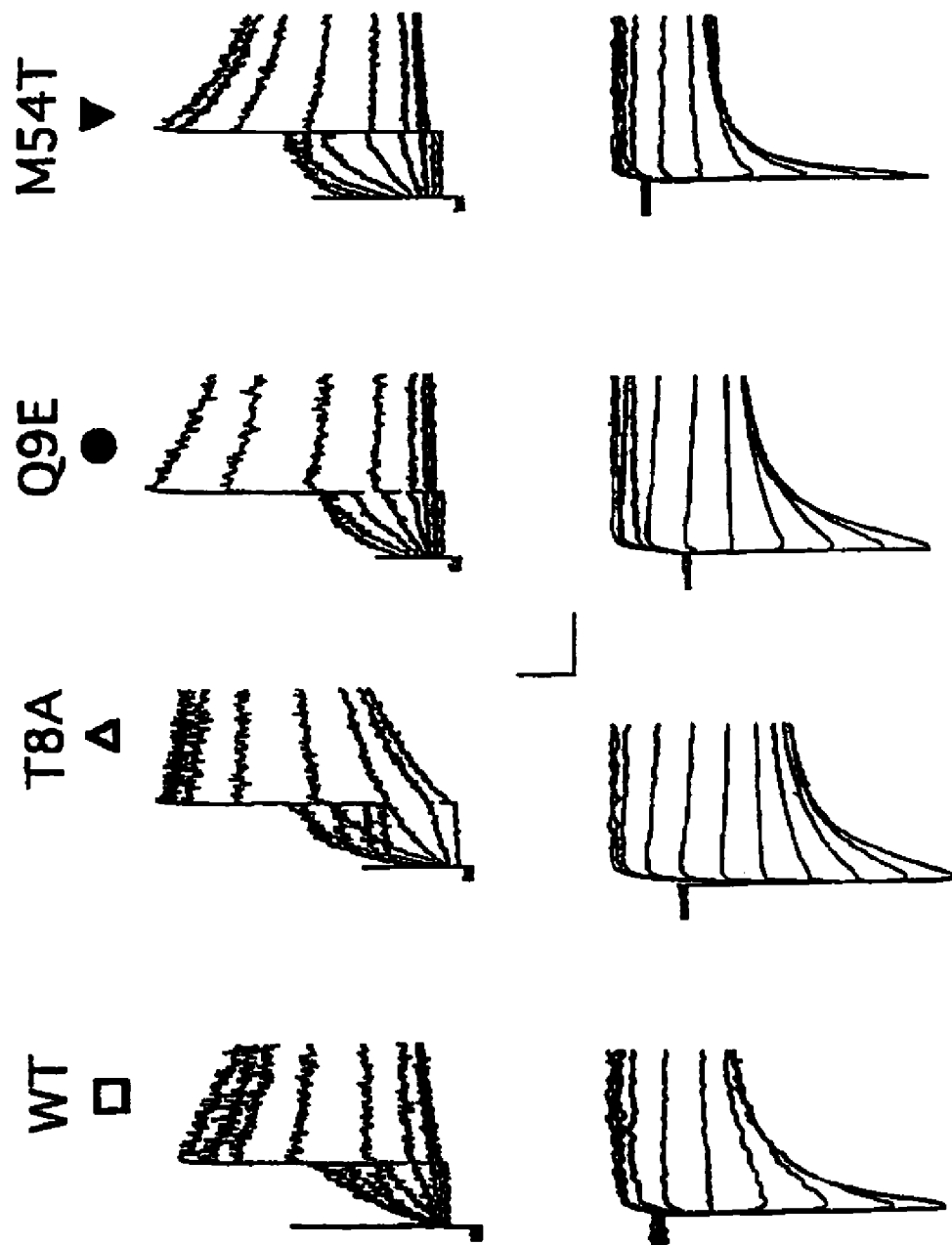


FIG. 8A

FIG. 8B

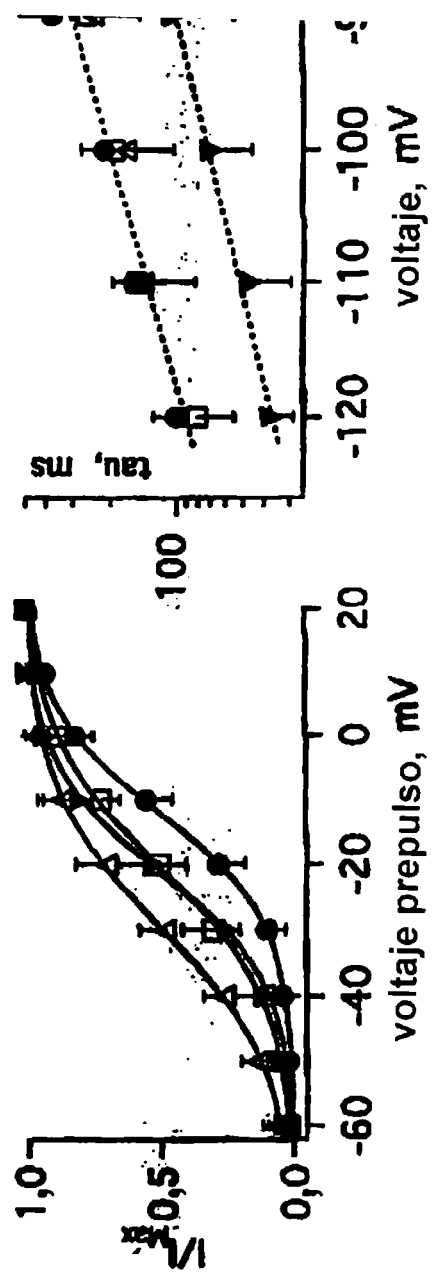


FIG. 8D

FIG. 8C

FIG. 9A

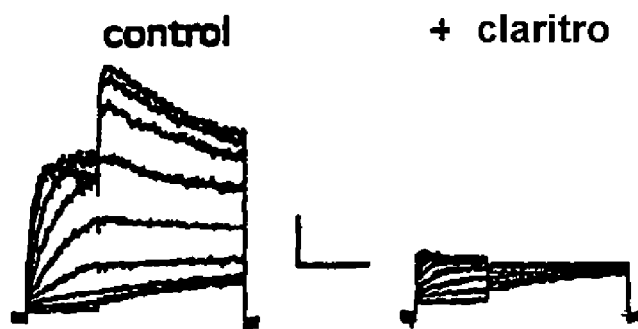


FIG. 9B

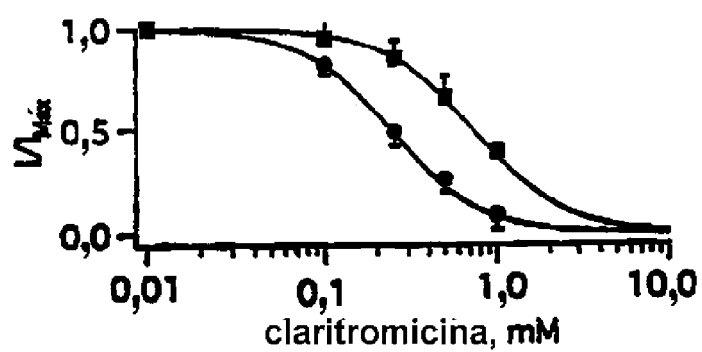
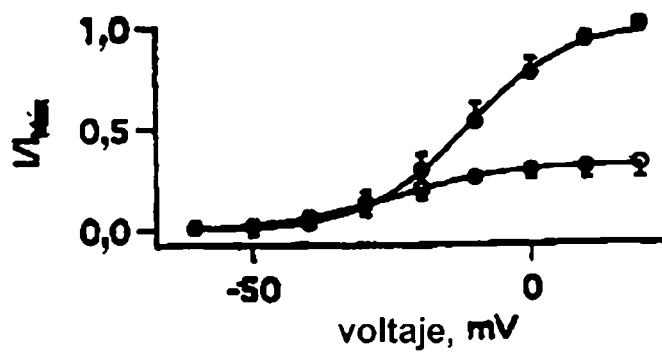


FIG. 9C



ES 2 338 520 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Abbott, Geoffrey W.
Sesti, Federico
5 Splawski, Igor
Keating, Mark T.
Goldstein, Steve A.N.
University of Utah Research Foundation
Yale University
10
<120> Genes Relacionados con Mink, Formación de canales de Potasio y Asociación con Arritmias Cardiacas

<130> KCNE2 *et al.*
15
<140>
<141>

20 <150> US 60/129.404
<151> 15-04-1999

<160> 20
25 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 732
30 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
35 <221> CDS
<222> (74)..(442)

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 520 T3

<400> 1

```

    caaatccaga aaagatccgt tttcctaacc ttgttcgcct attttattat ttaaattgca 60
5    gcaggaggga agc atg tct act tta tcc aat ttc aca cag acg ctg gaa 109
      Met Ser Thr Leu Ser Asn Phe Thr Gln Thr Leu Glu
      1 5 10
10   gac gtc ttc cga agg att ttt att act tat atg gac aat tgg cgc cag 157
      Asp Val Phe Arg Arg Ile Phe Ile Thr Tyr Met Asp Asn Trp Arg Gln
      15 20 25
15   aac aca aca gct gag caa gag gcc ctc caa gcc aaa gtt gat gct gag 205
      Asn Thr Thr Ala Glu Gln Glu Ala Leu Gln Ala Lys Val Asp Ala Glu
      30 35 40
20   aac ttc tac tat gtc atc ctg tac ctc atg gtg atg att gga atg ttc 253
      Asn Phe Tyr Tyr Val Ile Leu Tyr Leu Met Val Met Ile Gly Met Phe
      45 50 55 60
25   tct ttc atc atc gtg gcc atc ctg gtg agc act gtg aaa tcc aag aga 301
      Ser Phe Ile Ile Val Ala Ile Leu Val Ser Thr Val Lys Ser Lys Arg
      65 70 75
30   cgg gaa cac tcc aat gac ccc tac cac cag tac att gta gag gac tgg 349
      Arg Glu His Ser Asn Asp Pro Tyr His Gln Tyr Ile Val Glu Asp Trp
      80 85 90
35   cag gaa aag tac aag agc caa atc ttg aat cta gaa gaa tcg aag gcc 397
      Gln Glu Lys Tyr Lys Ser Gln Ile Leu Asn Leu Glu Glu Ser Lys Ala
      95 100 105
40   acc atc cat gag aac att ggt gcg gct ggg ttc aaa atg tcc ccc 442
      Thr Ile His Glu Asn Ile Gly Ala Ala Gly Phe Lys Met Ser Pro
      110 115 120
45   tgataaggga gaaaggcacc aagctaacat ctgacgtcca gacatgaaga gatgccagt 502
      ccacgaggca aatccaaatt gtctttgctt agaagaaagt gagttccttg ctctttgttg 562
      agaattttca tggagattat gtggttgagg aataaagata gatgacattt caatctcagt 622
      gatttatgct tgcttggttg agcaatattt tgtgctgaag acctctttta ctttccgggc 682
      aagtgaatgt cattttaatc aatatcaatg atgaaaataa agccaaattt 732

```

<210> 2

<211> 123

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 338 520 T3

<400> 2

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

<210> 3

30 <211> 468

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

35 <220>

<221> CDS

<222> (35)..(403)

40 <400> 3

45	cctgtgagga	atctctcatc	ctcaaggggg	aaac	atg	acc	act	tta	gcc	aac	ttg	55					
	Met	Thr	Thr	Leu	Ala	Asn	Leu										
	1					5											
50	acg	cag	acc	ctg	gag	gat	gcc	ttc	aaa	aag	gtt	ttc	att	act	tat	atg	103
	Thr	Gln	Thr	Leu	Glu	Asp	Ala	Phe	Lys	Lys	Val	Phe	Ile	Thr	Tyr	Met	
	10					15					20						

55

60

65

ES 2 338 520 T3

```

gac agc tgg agg agg aac aca aca gcc gaa caa cag gcg ctc cag gcc 151
Asp Ser Trp Arg Arg Asn Thr Thr Ala Glu Gln Gln Ala Leu Gln Ala
    25                30                35

5   aga gtg gat gcc gag aac ttc tac tac gtc atc ctg tac ctc atg gtg 199
Arg Val Asp Ala Glu Asn Phe Tyr Tyr Val Ile Leu Tyr Leu Met Val
    40                45                50                55

10  atg atc ggc atg ttc gcc ttc atc gtg gtg gcc atc ctg gtg agc acg 247
Met Ile Gly Met Phe Ala Phe Ile Val Val Ala Ile Leu Val Ser Thr
                60                65                70

15  gtg aag tcg aag cgg cgg gag cac tcc cag gac ccg tac cac cag tac 295
Val Lys Ser Lys Arg Arg Glu His Ser Gln Asp Pro Tyr His Gln Tyr
                75                80                85

20  atc gtg gag gat tgg cag cag aag tat agg agt cag atc ttg cat ctg 343
Ile Val Glu Asp Trp Gln Gln Lys Tyr Arg Ser Gln Ile Leu His Leu
                90                95                100

25  gaa gac tcc aag gcc acc atc cat gag aac ctg ggg gcg acg ggg ttc 391
Glu Asp Ser Lys Ala Thr Ile His Glu Asn Leu Gly Ala Thr Gly Phe
    105                110                115

30  aca gtg tca ccc tgataaagaa cgagagtcca tctgcccagg aaggggtgct 443
Thr Val Ser Pro
    120

    tctgcccgcct tgaagcccca cttgc 468

30  <210> 4
    <211> 123
    <212> PRT
35  <213> Rattus norvegicus

    <400> 4

40  Met Thr Thr Leu Ala Asn Leu Thr Gln Thr Leu Glu Asp Ala Phe Lys
    1                5                10                15

    Lys Val Phe Ile Thr Tyr Met Asp Ser Trp Arg Arg Asn Thr Thr Ala
                20                25                30

45  Glu Gln Gln Ala Leu Gln Ala Arg Val Asp Ala Glu Asn Phe Tyr Tyr
    35                40                45

    Val Ile Leu Tyr Leu Met Val Met Ile Gly Met Phe Ala Phe Ile Val
    50                55                60

50  Val Ala Ile Leu Val Ser Thr Val Lys Ser Lys Arg Arg Glu His Ser
    65                70                75                80

    Gln Asp Pro Tyr His Gln Tyr Ile Val Glu Asp Trp Gln Gln Lys Tyr
55                85                90                95

    Arg Ser Gln Ile Leu His Leu Glu Asp Ser Lys Ala Thr Ile His Glu
                100                105                110

60  Asn Leu Gly Ala Thr Gly Phe Thr Val Ser Pro
    115                120

    <210> 5
    <211> 492
65  <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

ES 2 338 520 T3

<220>

<221> CDS

<222> (93)..(401)

5

<400> 5

aaagggactc cttgaaactg attgagagcc cagtggattt gccagcagtt tgagcttcta 60

10 ccgagtcttc cccacactca atccctgttg ct atg gag act acc aat gga acg 113
Met Glu Thr Thr Asn Gly Thr
1 5

15 gag acc tgg tat gag agc ctg cat gcc gtg ctg aag gct cta aat gcc 161
Glu Thr Trp Tyr Glu Ser Leu His Ala Val Leu Lys Ala Leu Asn Ala
10 15 20

20 act ctt cac agc aat ttg ctc tgc cgg cca ggg cca ggg ctg ggg cca 209
Thr Leu His Ser Asn Leu Leu Cys Arg Pro Gly Pro Gly Leu Gly Pro
25 30 35

25 gac aac cag act gaa gag agg cgg gcc agc cta cct ggc cgt gat gac 257
Asp Asn Gln Thr Glu Glu Arg Arg Ala Ser Leu Pro Gly Arg Asp Asp
40 45 50 55

30 aac tcc tac atg tac att ctc ttt gtc atg ttt cta ttt gct gta act 305
Asn Ser Tyr Met Tyr Ile Leu Phe Val Met Phe Leu Phe Ala Val Thr
60 65 70

35 gtg ggc agc ctc atc ctg gga tac acc cgc tcc cgc aaa gtg gac aag 353
Val Gly Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys
75 80 85

40 cgt agt gac ccc tat cat gtg tat atc aag aac cgt gtg tct atg atc 401
Arg Ser Asp Pro Tyr His Val Tyr Ile Lys Asn Arg Val Ser Met Ile
90 95 100

taacacgaga gggctgggac ggtggaagac caagacacct ggggattgcg tctggggcct 461

ccagaactct gctgtggact gcatcaggtc t 492

40

<210> 6

<211> 103

<212> PRT

45

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

50 Met Glu Thr Thr Asn Gly Thr Glu Thr Trp Tyr Glu Ser Leu His Ala
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Leu Asn Ala Thr Leu His Ser Asn Leu Leu Cys Arg
20 25 30

55 Pro Gly Pro Gly Leu Gly Pro Asp Asn Gln Thr Glu Glu Arg Arg Ala
35 40 45

Ser Leu Pro Gly Arg Asp Asp Asn Ser Tyr Met Tyr Ile Leu Phe Val
50 55 60

60 Met Phe Leu Phe Ala Val Thr Val Gly Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr
65 70 75 80

Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys Arg Ser Asp Pro Tyr His Val Tyr Ile
85 90 95

65

Lys Asn Arg Val Ser Met Ile
100

ES 2 338 520 T3

<210> 7
 <211> 972
 <212> ADN
 5 <213> *Mus musculus*

 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (241)..(549)

 <400> 7

 15 atcctggaaa cttgataatc aatgactctc taggagttgg aaatccgggg actcaaggaa 60
 gagaaacaaa acaccagtgt ttctgtctgt gccatttgg aaccaagaga tgcaccttgc 120
 20 aaggaactga ggggttgtgg gacatccacg aagagatcct caaagatgtc tcagagccag 180
 cagagtctct gaactgtttg atcacattcc agctcttccc atacctcaat atctgttgc 240
 25 atg gag act tcc aac ggg act gag acc tgg tac atg agc ctc cat gct 288
 Met Glu Thr Ser Asn Gly Thr Glu Thr Trp Tyr Met Ser Leu His Ala
 1 5 10 15
 30 gtg ctg aag gct ctg aac aca acc ctt cac agt cac ttg ctc tgc cgg 336
 Val Leu Lys Ala Leu Asn Thr Thr Leu His Ser His Leu Leu Cys Arg
 20 25 30
 35 cct ggg cca gga cca ggg cca gac aat caa act gag gat cgt cgg gct 384
 Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Asp Asn Gln Thr Glu Asp Arg Arg Ala
 35 40 45
 40 agc ctt cct ggt cgt aat gac aac tcc tac atg tat att ctc ttt gtc 432
 Ser Leu Pro Gly Arg Asn Asp Asn Ser Tyr Met Tyr Ile Leu Phe Val
 50 55 60
 45 atg ttc cta ttt gcc gtc act gtg ggc agt ctc atc ctg gga tat acc 480
 Met Phe Leu Phe Ala Val Thr Val Gly Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 50 cgt tca cgc aaa gtg gac aaa cgt agt gac ccc tat cat gtg tac atc 528
 Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys Arg Ser Asp Pro Tyr His Val Tyr Ile
 85 90 95
 55 aag aac cgt gtg tct atg atc tcatgtgagg aacctgaaga caatggaaga 579
 Lys Asn Arg Val Ser Met Ile
 100
 60 ttacaatgtc tgaggattgt cttctggtgc ctccggaact caactcaacc atatcaagcc 639
 acagtgtatc tatgtaagat caacaggaaa ctggttaagag gattaggtca ttattaggac 699
 65 cagagaagag ggactgatag gccagtctt gtggatgaga catttttoga gacacagatg 759
 cgcattataa actcagagcc catgaacaca tatatataaa gtatggacaa ccagcaagta 819
 70 gaagaggaag ctgtggcgaa gggaaatggg gcagaaagat gctctggata tataatctct 879
 taatgtatga tcttcaacat gagaaacctt gataaaactg agaatgctac ttaaaaaaaaa 939
 75 aaaaaaaaaa aaaaaaattt ccgcggccgc aag 972

ES 2 338 520 T3

<210> 8

<211> 103

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 8

```

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

```

30

<210> 9

<211> 1932

<212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

40 <221> CDS

<222> (604)..(1113)

<400> 9

```

45      gaaccctctt ggactggacg atttgggaat tcaaaacttg ggacaaactg tcagccttgg 60
      taagtcagca aggctacact ttgctttcag aaacatttaa aagagggaca tttttgccaa 120
      ttaatagatg aatttttttc ctttattttc ttcttgcttt tctttgttct aaggaaacat 180
50      tgttttgaat ttaaaatagt ttggtttttg aaacacaatg taaactttgt ttctgctcag 240
      ttaaaatacg tttcccagtt ttaaagatac tatttactgt atgctcctgt cttacattga 300
55      tttttttttt aatcaaagta atactgctca ctacaaacag gacaaatgtg tacactaaaa 360
      aaaaaaaaaa agtccttctt acttttccca gtgaaccttc ccgggcttct ctcccggtgca 420
      ctccaagccc tcatagctca ctcttgctcag ctgtttggct tatgctatct ctttcattga 480
60      cttttaagct tttttggtat tgcagttcca caaacctcgt gctcccccac ctccctggcc 540
      caggaccttg gggagagtct aacctgcggc tttttoccag ccctgctgt ggaggcagcc 600

```

65

ES 2 338 520 T3

tca atg ctg aaa atg gag cct ctg aac agc acg cac ccc ggc acc gcc 648
 Met Leu Lys Met Glu Pro Leu Asn Ser Thr His Pro Gly Thr Ala 15
 1 5 10

gcc tcc agc agc ccc ctg gag tcc cgt gcg gcc ggt ggc ggc agc ggc 696
 Ala Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly 30
 20 25

aat ggc aac gag tac ttc tac att ctg gtt gtc atg tcc ttc tac ggc 744
 Asn Gly Asn Glu Tyr Phe Tyr Ile Leu Val Val Met Ser Phe Tyr Gly 45
 35 40

att ttc ttg atc gga atc atg ctg ggc tac atg aaa tcc aag agg cgg 792
 Ile Phe Leu Ile Gly Ile Met Leu Gly Tyr Met Lys Ser Lys Arg Arg 60
 50 55

gag aag aag tcc agc ctc ctg ctg ctg tac aaa gac gag gag cgg ctc 840
 Glu Lys Lys Ser Ser Leu Leu Leu Tyr Lys Asp Glu Glu Arg Leu 75
 65 70

tgg ggg gag gcc atg aag ccg ctg ccc gtg gtg tcc ggc ctg agg tcc 888
 Trp Gly Glu Ala Met Lys Pro Leu Pro Val Val Ser Gly Leu Arg Ser 95
 80 85 90

gtg cag gtg ccc ctg atg ctg aac atg ctg cag gag agc gtg gcg ccc 936
 Val Gln Val Pro Leu Met Leu Asn Met Leu Gln Glu Ser Val Ala Pro 110
 100 105

gcg ctg tcc tgc acc ctc tgt tcc atg gaa ggg gac agc gtg agc tcc 984
 Ala Leu Ser Cys Thr Leu Cys Ser Met Glu Gly Asp Ser Val Ser Ser 125
 115 120

gag tcc tcc tcc ccg gac gtg cac ctc acc att cag gag gag ggg gca 1032
 Glu Ser Ser Ser Pro Asp Val His Leu Thr Ile Gln Glu Glu Gly Ala 140
 130 135

gac gat gag ctg gag gag acc tcc gag acg ccc ctc aac gag agc agc 1080
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Thr Ser Glu Thr Pro Leu Asn Glu Ser Ser 155
 145 150

gaa ggg tcc tcc gag aac atc cat cag aat tcc tagcaccccc gggaccocctg 1133
 Glu Gly Ser Ser Glu Asn Ile His Gln Asn Ser 170
 160 165 170

ccggtggctc catcagccag caaccttaga gagaggaaag acagttttca agtgtctggt 1193

ttcactttca cagtgcggct gccactttga agagaccctt ggtaaaccce tgattcgggg 1253

tggggtgggg gactaggctc agccggaacc agcaccttca aggagtccgg gaggtgcctg 1313

tggtttgac ccaccactga aaaagcccg aagatgcgca gcgcgtacac tgactttggg 1373

gcctgggtgt tgggggttct gatcagaatt gggcgggatg atatgtttgc cattttctca 1433

ctggatgcc tgggtagctc ctgcagggtc tgcctgttcc cagggtgcc gaatgcttta 1493

ggacacgctg agagactagt tgtgatttgc tattttgocct agagctttgt ccttctagat 1553

ctgattggct gtaagtatct ctactgtgta cctgtggcat tccttcacag tgggttacia 1613

gcttcttttg gattagaggg ggatttttga tgggagaaag ctggagatct gaaccagcc 1673

catttgaca ctataagaaa aaaaagtaac ttttaaacct gttaacattg gccgggggtta 1733

ES 2 338 520 T3

taagagatga tcttctatctt tgaccttttg tctaacttat gaccttgaac tctgacctgt 1793
gaccatgcag catcacatga tggcatgacg ttctttggat cagaagagct tccccagaat 1853
5 ctaacctgca ctcccgatgg tgggtcagga gactcttcct gatctttcta gaaggggtaa 1913
agtgggggttg aacaaggcc 1932

<210> 10

10 <211> 170

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 10

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

<210> 11

50 <211> 2499

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

55 <220>

<221> CDS

<222> (86)..(595)

60 <400> 11

aacatcctca gatttggccg tttaagagtt ccacacttgg gacaaactgt cagcttttga 60
tcccggtgt gtgagcggca attca atg ctg agg atg gag cct ctg aac agc 112
Met Leu Arg Met Glu Pro Leu Asn Ser
1 5

ES 2 338 520 T3

5	aca tac ccc agc gct gca gcc tcc agc agc ccc ctc gag tcc cat gtg 160 Thr Tyr Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ser His Val 25 10 15 20
10	cct agt aac agc agt ggt aat ggc aat gaa tac ttc tat att ttg gtc 208 Pro Ser Asn Ser Ser Gly Asn Gly Asn Glu Tyr Phe Tyr Ile Leu Val 40 30 35
15	gtt atg tcc ttc tat ggc gtt ttc ctg atc gga atc atg ctg ggc tac 256 Val Met Ser Phe Tyr Gly Val Phe Leu Ile Gly Ile Met Leu Gly Tyr 55 45 50
20	atg aaa tcc aag agg cgg gag aag aag tcc agc ctt ctg ctg ttg tac 304 Met Lys Ser Lys Arg Arg Glu Lys Lys Ser Ser Leu Leu Leu Tyr 70 60 65
25	aaa gac gag gag agg ctg tgg ggg gag gct atg aag ccg cta cct atg 352 Lys Asp Glu Glu Arg Leu Trp Gly Glu Ala Met Lys Pro Leu Pro Met 85 75 80
30	atg tcc ggc ttg agg tca ggg cag gtg ccc atg atg ctg aat atg ctg 400 Met Ser Gly Leu Arg Ser Gly Gln Val Pro Met Met Leu Asn Met Leu 105 90 95 100
35	cag gag agt gtg gcg ccg gca ctg tcc tgc act ctt tgc tgc atg gaa 448 Gln Glu Ser Val Ala Pro Ala Leu Ser Cys Thr Leu Cys Ser Met Glu 120 110 115
40	ggg gac agt gtg agc tcc gag tcc tcc tct cct gat gtg cac ctt ccc 496 Gly Asp Ser Val Ser Ser Glu Ser Ser Ser Pro Asp Val His Leu Pro 135 125 130
45	atc cag gag gag ggg gct gat gac gag ctg gag gag acc tcc gag acg 544 Ile Gln Glu Glu Gly Ala Asp Asp Glu Leu Glu Glu Thr Ser Glu Thr 150 140 145
50	cct ctc aac gac agc agt gaa ggc tct tcc gag aac atc cac cag aat 592 Pro Leu Asn Asp Ser Ser Glu Gly Ser Ser Glu Asn Ile His Gln Asn 165 155 160
55	tcc tagcaccac caggtgctag gaggtagctc cgtaagctac acttgacaga 645 Ser 170
60	gggaaacac ttgccaaagt cccgggtttcg cttttgctct gcggctgcc cattgaacag 705
65	actgagggca agctccaaaa tggggcaggg agagacaagg ctcagctgca gtccttgagg 765
70	ttcctgtggg actcatctct gaaaaagtcc cagagacata cagcatgacc attgactctg 825
75	gggcctgggt ggtggtgggt ctgtggtcag catctggctg gataatgtgg tgttttttca 885
80	ctggaggccc tgggtaactt ctgcagcatc tgtctgtgcc cagggctgac aactgcccag 945
85	ggcaggctga aggactcgtt tcgatttgct aattttccta gagctttgtt cttctagatc 1005
90	tgatgggctg taagtatctt taatgtgtgc ctgtggcatt cgattagaga cagttatata 1065
95	tttcacttgg aggtgggaga aagctgaaga gagaaccag attgtttgca caatgcaaag 1125
100	ggagaaggta attcgtacac atgtctgaat tagctgggag tataagctat gacctcatct 1185
105	gagcttttgt ctcacctgtg agcttgaact ctacagcatt gcaggtgagc atggctttct 1245

ES 2 338 520 T3

ttgccagtca gcttccctcat aaccaagcct gcattcggga tggctgttca tgggtggcct 1305
 cctgaccttc acagattggg taatgggtgg gttatacaag gccaaatcat tgacagctct 1365
 5 gctgcagctc tttttcccag cctagttttc tgaggccaga aaggacacat gtgggcctca 1425
 taatatgggg ttttgtcacg tagctggacc ctggaagggc atacttaggc gagatcgagc 1485
 10 agagctgggg ttcaagcaat gtgcttctct gtctgagccc tgacactcat tcaactgtgag 1545
 gttctgggca tgtcatcaca agattctgcc tacatgaggc tcctgaggct gtgcagcccc 1605
 agggggctgg gaggacatct ttagactttg tactgtgtga taaatcctcc acagcctgg 1665
 15 gtgaggaagt ttggagcaag tatttccctt ttggccgctt agtctggaga aagatgtgtt 1725
 gacttaaaga cacagtggga gactttggat atgtgtagct ggggaattcg aggctggatc 1785
 20 atcggccttc cttactgtgg ctttcccagg atgogactga agaagctggc agcatagttt 1845
 cctctgcaga gtcgtgtgga tgggaggatg ttaacacacc caaccgaggg aaagagaaat 1905
 ttaaaggagg ctactcaaga gctttgcagc aggtctctgt gcccttagaa gaccagaagg 1965
 25 aagcagaaaa ctccccaaag gtcaagtttg cctctagtgc aaaaocctct taatttttat 2025
 ttatctgaac tctccctgga ttgagacaga gcagtcacta atgtcccat gaggggttaa 2085
 30 cactataagg agctgttttt ttcaatcagt ttgacacag agatagaaag gtaatttatg 2145
 ttagaggcgg aaagggggccc tctgttcaact ttaagattca gagtgtggat caactccaaa 2205
 35 gggggccggt taagttgaaa gaagccaagt taagtttggc ctggtgcctg gaatcacttg 2265
 aattctgaaa ctttactgcg acagacatgt gcgttgtcac attttccatt gcttaatcct 2325
 ggtttggtgc aagtctgtct gcgcctgtta caaagtgatg tatatacttc cttccagtat 2385
 40 gctgagttgt agacaattgt ctggtgtatt taatggtttg taattttcac gatatttttt 2445
 aatttaaata aacacatttt cgatatgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatt 2499

45 <210> 12
 <211> 170
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*

55

60

65

ES 2 338 520 T3

<400> 12

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

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de PCR para exploración de mutaciones

45

<400> 13

ccgttttct aacctgttc g

21

50

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de PCR para exploración de mutaciones

60

<400> 14

agcatcaact ttgcttgga g

21

65

<210> 15

<211> 23

ES 2 338 520 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de PCR para exploración de mutaciones	
	<400> 15	
10	gtcttcgaa ggattttat tac	23
	<210> 16	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de PCR para exploración de mutaciones	
	<400> 16	
25	gttcccgctct ctggatttc a	21
	<210> 17	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de PCR para exploración de mutaciones	
	<400> 17	
40	aatgttctct ttcacatcg tg	22
	<210> 18	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de PCR para exploración de mutaciones	
	<400> 18	
55	tgtctggacg tcagatgta g	21
	<210> 19	
60	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: residuos de HA para localización de epítipo en el mapa genómico	

ES 2 338 520 T3

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (10)

5 <223> Xaa representa un codón de terminación codificado.

<400> 19

10 **Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Xaa**
 1 5 10

<210> 20

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: residuos cmc para localización del epítipo en el mapa genómico

<220>

25 <221> PÉPTIDO

<222> (15)

<223> Xaa representa un codón de terminación codificado.

30 <400> 20

Ile Ser Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Xaa
 1 5 10 15

35

40

45

50

55

60

65