

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0707165-5 A2**

(22) Data de Depósito: 17/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/435

(54) Título: **SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA RETIGABINA SOBRE KCNQ5**

(30) Prioridade Unionista: 19/01/2006 US 60/760,252

(73) Titular(es): Wyeth

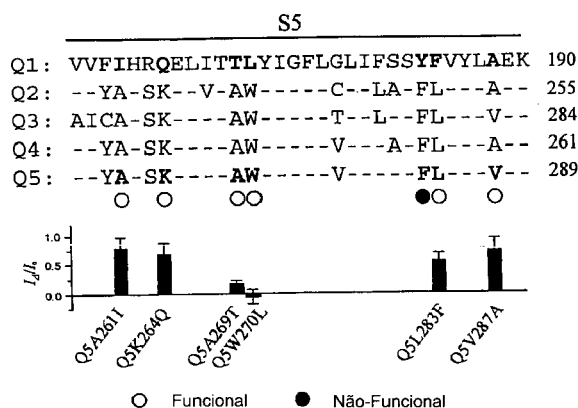
(72) Inventor(es): Kun Liu, Qiang Wang, Thomas Michael
Argentieri

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007001188 de 17/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/084531 de 26/07/2007

(57) Resumo: SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA RETIGABINA SOBRE KCNQ5. São aqui mostrados sequências de ácidos nucleicos e polipeptídeos de canais de potássio KCNQ5 mutados que carecem de capacidade de resposta para o ativador de canal de potássio retigabina. Também são aqui mostrados processos e kits relacionados ao uso dos canais de potássio KCNQ5 mutados mencionados anteriormente.





Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA RETIGABINA SOBRE KCNQ5"**.

Campo da Invenção

É aqui mostrado um novo sítio de ligação para retigabina sobre
5 KCNQ5, e o gene, ácido nucléico, proteína, vetores, e processos de seu uso.

Antecedentes da Invenção

Canais de íons são proteínas celulares que regulam o fluxo de íons, incluindo cálcio, potássio, sódio e cloreto, dentro e fora de células. Estes canais afetam processos tais como transmissão de nervo, contração de
10 músculo e secreção. Entre os canais de íons, canais de potássio são os mais ubíquos e diversos, sendo encontrados em uma variedade de células animais como tecido de nervo, muscular, glandular, imune, reprodutivo, e epitelial. Tais canais permitem o fluxo de potássio dentro e/ou fora da célula sob certas circunstâncias. Por exemplo, o fluxo para fora de íons potássio
15 com abertura destes canais torna o interior da célula mais negativo, contrabalançando voltagens despolarizantes aplicadas à célula. Estes canais são regulados, por exemplo, por sensibilidade de cálcio, bloqueio de voltagem, segundos mensageiros, ligantes extracelulares, e sensibilidade de ATP.

Canais de potássio são proteínas atravessando membrana que
20 genericamente atuam para hiper-polarizar neurônios e células de músculo. Estudos fisiológicos indicam que correntes de potássio são encontradas na maioria de células e são associadas com uma ampla faixa de funções, incluindo a regulação das propriedades elétricas de células excitáveis. Dependendo do tipo de canal de potássio, sua atividade funcional pode ser contro-
25 lada por voltagem de transmembrana, ligantes diferentes, fosforilação de proteína, ou outros segundos mensageiros (ver, por exemplo, patente US 6 893 858).

A família de canal de potássio possui aproximadamente setenta membros em tecidos mamíferos. A recentemente identificada subfamília
30 KCNQ (Kv7) foi mostrada desempenhar um importante papel funcional como determinantes de excitabilidade de célula. Recente evidência indica que as subunidades de canal de potássio KCNQ formam a base molecular para

atividade de corrente M em vários tipos de tecidos. Esta família de genes evoluiu para conter pelo menos cinco principais subunidades designadas KCNQ1 até KCNQ5 (Kv7.1-7.5). Estas subunidades foram mostradas comontarem para formação de canais de íons funcionais heteroméricos e homoméricos.

Canais de potássio dependentes de voltagem são reguladores-chaves do potencial de membrana em descanso e modulam a excitabilidade de células eletricamente ativas, tais como neurônios ou miócitos. Várias classes de canais de potássio (K^+) dependentes de voltagem foram clonadas (ver, por exemplo, Lerche C et al., J. Biol. Chem. 275:22395-22400 (2000)).

Mutações em quatro dos cinco genes de canal de potássio KCNQ são implicadas em diversas doenças, causando síndrome LQT cardíaca (KCNQ1), epilepsia (KCNQ2, e 3), surdez congênita (KCNQ4). Devido à importância de KCNQ5 em formação de corrente -M demonstrada no sistema nervoso central (CNS), é presumido que a falha deste gene pode resultar em distúrbio de excitabilidade neuronal (ver, por exemplo, Lerche C et al., J. Biol. Chem. 275:22395-22400 (2000); Schroeder BC et al., J. Biol. Chem. 275:24089-95 (2000)).

Canais de potássio estão envolvidos em um número de processos fisiológicos, incluindo regulação de batimento cardíaco, dilatação de artérias, liberação de insulina, excitabilidade de células de nervos, e regulação de transporte de eletrólito renal.

Retigabina (etil éster de ácido (N-(2-amino-4-(4-flúor benzil amino) fenil) carbâmico foi verificada abrir certos tipos de canais KCNQ, incluindo KCNQ5. Retigabina, entretanto, não tem efeito de aperfeiçoamento sobre KCNQ1, que é homólogo a KCNQ5 através de 37% de identidade de sequência. Retigabina exerce seus efeitos celulares através de aumento de probabilidade aberta destes canais (Main J, Mol. Pharmacol. 58:253-62 (2000); Wickenden A et al., Mol Pharmacol. 58:591-600 (2000)). Este aumento na abertura de canais KCNQ individuais resulta coletivamente na hiperpolarização de membranas de células, particularmente em células despolarizadas, produzida por significantes aumentos em condutância mediada

por KCNQ em célula integral.

São aqui mostrados mutantes de KCNQ5 que perderam a propriedade funcional para responderem a retigabina.

Resumo da Invenção

5 Um aspecto é para um polinucleotídeo isolado codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5 (W270L).

Um outro aspecto é para um polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácidos nucléicos compreendendo SEQ ID
10 NO: 1;

(b) um polinucleotídeo codificando SEQ ID NO: 2;

(c) uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 95% de homologia com SEQ ID NO: 1, contanto que uma substituição em nucleotídeos 808-810 seja por um códon que
15 produz uma substituição conservativa para o aminoácido leucina;

(d) uma molécula de ácido nucléico que é capaz de hibridizar sob condições altamente rigorosas para SEQ ID NO: 1;

(e) uma molécula de ácido nucléico que é complementar a (a), (b), (c), ou (d); e

20 (f) uma variante de SEQ ID NO: 1.

Uma outra realização é um polinucleotídeo isolado codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1.

Ainda um aspecto é para um polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácidos nucléicos compreendendo SEQ ID NO: 3, onde nucleotídeos 769-1062 são substituídos com SEQ ID NO: 5;

(b) um polinucleotídeo codificando SEQ ID NO: 4, onde aminoácidos 257-354 são substituídos com um domínio transmembrana S5-S6 de
30 KCNQ1;

(c) uma molécula de ácido nucléico que é capaz de hibridizar sob condições altamente rigorosas para a seqüência de ácidos nucléicos de

(a) ou (b); e

(d) uma molécula de ácido nucléico que seja complementar a (a), (b), ou (c).

Um outro aspecto é para um polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácidos nucléicos compreendendo SEQ ID NO: 3, onde nucleotídeos 769-873 são substituídos com nucleotídeos 1-105 de SEQ ID NO: 5;

(b) um polinucleotídeo codificando SEQ ID NO: 4, onde aminoácidos 257-291 de SEQ ID NO: 4 são substituídos com um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(c) uma molécula de ácido nucléico que é capaz de hibridizar sob condições altamente rigorosas à seqüência de ácidos nucléicos de (a) ou (b); e

(d) uma molécula de ácido nucléico que é complementar a (a), (b), ou (c).

Uma outra realização é um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5 (W270L);

(b) uma seqüência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO: 2;

(c) uma variante de (a); e

(d) uma seqüência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade à seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, contanto que uma substituição no aminoácido 270 seja uma substituição conservativa para o aminoácido leucina.

Ainda um aspecto é para um canal dimérico KCNQ compreendendo pelo menos uma subunidade KCNQ5 que é o polipeptídeo isolado mencionado anteriormente. Um outro aspecto é para um canal tetramérico KCNQ compreendendo pelo menos uma subunidade KCNQ5 que é o polipeptídeo isolado mencionado anteriormente.

Ainda uma realização é um anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo SEQ ID NO: 2.

Um outro aspecto é um anticorpo que se liga especificamente a um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo pelo menos
5 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 2, onde o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

Ainda um aspecto é um polipeptídeo KCNQ5 isolado contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1.

Ainda um aspecto é um polipeptídeo KCNQ5 isolado contendo
10 um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Ainda um aspecto é um canal dimérico KCNQ compreendendo pelo menos uma subunidade KCNQ5 que é o polipeptídeo KCNQ5 isolado mencionado anteriormente contendo um domínio transmembrana S5-S6 ou um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Um outro aspecto é um canal tetramérico KCNQ compreendendo pelo me-
15 nos uma subunidade KCNQ5 que é o polipeptídeo KCNQ5 isolado mencionado anteriormente contendo um domínio transmembrana S5-S6 ou um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

Um outro aspecto é um processo para seleção de agentes, o processo compreendendo:

20 (a) contato de um agente com uma molécula KCNQ5 selecionada do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 con-
25 tendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

30 (v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmem-

brana S5 de KCNQ1; e

(b) detectando um efeito do dito agente sobre a atividade de KCNQ5;

onde detecção de uma diminuição ou um aumento em atividade de KCNQ5

5 é indicativa de um agente sendo um modulador de KCNQ5.

Ainda uma realização é um processo de seleção para agentes, o processo compreendendo:

(a) contato de uma célula com um agente; e

(b) determinação de nível de expressão de uma molécula de
10 KCNQ5 selecionada do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

15 (iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e
20

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

onde detecção de uma diminuição ou um aumento em expressão de KCNQ5 é indicativa de um agente sendo um modulador de KCNQ5.

25 Um outro aspecto é para processos de indução ou manutenção de controle de bexiga, tratamento ou prevenção de incontinência urinária, ou tratamento ou prevenção de dor neuropática em um mamífero, o processo compreendendo administração a um mamífero em sua necessidade de uma quantidade farmacologicamente efetiva do agente identificado através de
30 qualquer um dos processos mencionados anteriormente.

Um outro aspecto é para um processo para identificação de polipeptídeos capazes de ligação a um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo:

(a) aplicação de um procedimento dois híbridos mamíferos onde uma sequência codificando um polipeptídeo KCNQ5 é carregada por um vetor híbrido e sequência de uma biblioteca de ADN genômico ou ADNc é carregada pelo segundo vetor híbrido, onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5 (W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(b) transformação de célula hospedeira com os vetores;

(c) isolamento de células transformadas positivas; e

(d) extração do dito segundo vetor híbrido para obter uma sequência codificando um polipeptídeo que se liga ao polipeptídeo KCNQ5.

Ainda um aspecto é para processo para detecção de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo detecção de ligação de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em

(a) um anticorpo que liga seletivamente um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(b) um anticorpo que liga seletivamente um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

(c) um anticorpo que liga seletivamente um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1; e

(d) um anticorpo que liga seletivamente um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo pelo menos 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 2, onde o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2;

a uma molécula em uma amostra suspeita de conter um polipeptídeo KCNQ5, um polipeptídeo KCNQ5(W270L), ou um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L), onde o anticorpo é contactado com a amostra sob condi-

ções que permitem específica ligação com qualquer polipeptídeo KCNQ5, polipeptídeo KCNQ5(W270L), ou fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) presente na amostra e ligação do anticorpo à molécula na amostra indica a presença de um polipeptídeo KCNQ5, polipeptídeo KCNQ5(W270L), ou
5 fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L).

Ainda uma realização é um processo para detecção de expressão de KCNQ5 compreendendo detecção de ARNm codificando um polipeptídeo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);
10

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

15 em uma amostra de uma célula ou tecido suspeito de expressar KCNQ5 com uma sonda compreendendo pelo menos 12 nucleotídeos contíguos a partir de um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

20 (ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio de trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

Uma outra realização é um processo para determinação de se
25 um gene KCNQ5 sofreu mutação ou supressão compreendendo detecção, em uma amostra de células ou tecido de um sujeito, a presença ou ausência de uma alteração genética caracterizada por pelo menos uma alteração afetando a integridade de um gene codificando uma proteína KCNQ5 ou a má expressão de um gene KCNQ5, onde a etapa de detecção é realizada com
30 pelo menos uma sonda ou iniciador compreendendo pelo menos 12 nucleotídeos contíguos a partir de um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

5 (iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

Ainda um aspecto é para um processo de identificação de variantes de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo seleção de uma biblioteca combinatorial compreendendo mutantes KCNQ5 para agonistas ou antagonistas de polipeptídeo KCNQ5; onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado
10 do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e
15

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

Ainda um aspecto é para um processo de isolamento de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo:

20 (a) contato de um anticorpo KCNQ5 com uma amostra suspeita de conter um polipeptídeo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana de KCNQ1; e
25

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1; e

(b) isolamento de um complexo de anticorpo KCNQ5 - polipeptídeo KCNQ5 a partir da amostra.

30 Ainda uma realização é um processo de produção de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo:

(a) cultura de uma célula hospedeira transformada compreen-

dendo um vetor de expressão; onde o dito vetor de expressão compreende um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

5 (ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1;

em um meio apropriado de modo que um polipeptídeo KCNQ5 seja produzido; e
10

(b) opcionalmente, recuperando o polipeptídeo KCNQ5 de etapa (a).

Uma outra realização é um processo para o tratamento de um mamífero em necessidade de aumentada atividade de KCNQ5 compreendendo administração ao mamífero em sua necessidade de uma quantidade
15 terapeuticamente efetiva de uma molécula de KCNQ5 selecionada do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

20 (ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1;

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);
25

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1;e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

30 Ainda um aspecto é para um processo para o tratamento de um mamífero em necessidade de diminuída atividade de KCNQ5 compreendendo administração ao mamífero em sua necessidade, de uma quantidade te-

rapeuticamente efetiva de:

(a) um polinucleotídeo anti - sentido KCNQ5 que é anti-sentido para um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

5 (i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1; ou

10 (b) um anticorpo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:

(A) um anticorpo que seletivamente liga um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

15 (B) um anticorpo que liga seletivamente um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1;

(C) um anticorpo que liga seletivamente um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1; e

20 (D) um anticorpo que liga seletivamente um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo pelo menos 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 2, onde o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

Um outro aspecto é para um processo para obtenção de anticorpos polipeptídeo anti-KCNQ5 compreendendo:

25 (a) imunização de um animal com um polipeptídeo KCNQ5 imunogênico ou uma sua porção imunogênica única para um polipeptídeo KCNQ5, onde o dito polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

30 (ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-

membrana S5 de KCNQ1; e

(b) isolamento a partir de anticorpos animais que especificamente ligam-se a um polipeptídeo KCNQ5.

5 Ainda um aspecto é par aum processo para ensaio de habilidade de um polipeptídeo KCNQ5 codificar um canal de íon funcional compreendendo:

(a) transfecção de uma célula hospedeira com um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:

10 (i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

15 (b) expressão de polipeptídeo KCNQ5 na célula hospedeira; e

(c) medição eletrofisiológica de magnitude de corrente de íon do polipeptídeo KCNQ5.

20 Uma outra realização é um processo para prevenção em um sujeito de uma doença ou condição que pode se beneficiar de modulação de atividade e/ou expressão de KCNQ5 compreendendo administração ao sujeito de um polipeptídeo ou agente KCNQ5 que modula expressão de KCNQ5 ou pelo menos uma atividade de KCNQ5, onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

25 (i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

30 Ainda uma realização é um kit para detecção de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 compreendendo:

(a) um composto ou agente marcado capaz de detectar um poli-

peptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 em uma amostra biológica;

(b) meios para determinação de quantidade de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 na amostra;

(c) meios para comparação de quantidade de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 na amostra com um padrão; e

(d) opcionalmente, instruções para uso do kit para detectar polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5;

onde o polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1;

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

Uma outra realização é um kit para identificação de moduladores de atividade de KCNQ5 compreendendo:

(a) uma célula ou composição compreendendo um polipeptídeo KCNQ5;

(b) meios para determinação de atividade de polipeptídeo KCNQ5; e

(c) opcionalmente, instruções para uso do kit para identificação de moduladores de atividade de KCNQ5;

onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

5 Ainda uma realização é um kit para diagnóstico de um distúrbio associado com aberrante expressão e/ou atividade de KCNQ5 em um sujeito compreendendo:

(a) um reagente para determinação de expressão de um polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5;

10 (b) um controle ao qual os resultados do sujeito são comparados; e

(c) opcionalmente, instruções para uso do kit para propósitos diagnósticos;

15 onde o polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1;

20 (iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCMQ5(W270L);

25 (v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1; e

um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio trans-membrana S5 de KCNQ1.

Outros objetos e vantagens tornar-se-ão aparentes para aqueles versados na técnica com referência à descrição detalhada que se segue.

30 Breve Descrição das Seqüências

SEQ ID NO: 1 representa ADNc KCNQ(W270L).

SEQ ID NO: 2 representa uma proteína KCNQ(W270L).

SEQ ID NO: 3 representa ADNc KCNQ5 humano tipo selvagem.

SEQ ID NO: 4 representa proteína KCNQ5 humana tipo selvagem.

SEQ ID NO: 5 representa um domínio trans-membrana S5-S6 de ADNc KCNQ1 humano.

- 5 SEQ ID NO: 6 representa um domínio trans-membrana S5-S6 de KCNQ1 humano (seqüência de aminoácidos traduzida).

SEQ ID NO: 7 representa ADN KCNQ1 humano tipo selvagem.

SEQ ID NO: 8 representa proteína KCNQ1 humana tipo selvagem.

Breve Descrição das Figuras

- 10 A Figura 1 (A), traços de corrente de Q5Q1P evocados por uma série de pulsos de voltagem despolarizados a partir de -100 a 60 mV em incrementos de 10 mV (potencial de retenção foi -100 mV) na ausência (painel esquerdo) e presença (painel direito) de retigabina 50 μ M. (B), o curso de tempo de efeito de retigabina sobre mutantes Q5Q1P. (C), relação corrente (I) - voltagem de mutantes Q5Q1P na ausência (n = 9) e presença (n = 7, 5 minutos após a aplicação) de retigabina 50 μ M. Nenhuma diferença significativa é encontrada em qualquer um dos pontos de dado ($p > 0,05$).

- 20 A Figura 2 (A), traços de corrente de Q5Q1S5 evocados por uma série de pulsos de voltagem despolarizados a partir de -100 a 60 mV em incrementos de 10 mV (potencial de retenção foi -100 mV) na ausência (painel esquerdo) e presença (painel direito) de retigabina 50 μ M. (B), o curso de tempo de efeito de retigabina sobre mutantes Q5Q1P. (C), relação de corrente (I) - voltagem de mutantes Q5Q1S5 na ausência (n = 7) e presença (n = 7) de retigabina 50 μ M. Nenhuma diferença significativa é encontrada em 25 qualquer um dos pontos de dados ($p > 0,05$) entre estes dois grupos.

- Figura 3 Análises de mutagênese de domínio S5 em KCNQ5. Alinhamento de seqüência de todos os cinco membros em família KCNQ é mostrado no alto. Os resíduos mais diversos entre KCNQ1 e os outros membros são destacados em negrito e os correspondentes resíduos em 30 KCNQ5 foram individualmente mutados para suas contrapartes em KCNQ1. Então cada mutante com mutação simples foi testado com retigabina 50 μ M e as vezes de aumento (I_A/I_0) em amplitude de corrente foi plotado no gráfico

no fundo. Em todos os mutantes, n igual a 6.

Figura 4 (A), traços de corrente anotados sobre KCNQ1 tipo selvagem na ausência (Controle) e na presença de retigabina 50 μM e 200 μM . (B), traços de corrente anotados de KCNQ1 L171W na ausência (Controle) e presença de retigabina 50 μM e 200 μM . (C), traços de corrente superpostos evocados por pulso de voltagem de 80 mV a partir de KCNQ1 L171W na ausência e presença de retigabina 50 μM e 200 μM . (D), relações de corrente - voltagem de KCNQ1 L171W na ausência (círculo aberto) e presença de retigabina 50 μM (quadrado aberto) e 200 μM (triângulo aberto). As amplitudes de estado estável das correntes evocadas por uma série de pulsos de voltagem despolarizados a partir de -100 a 80 mV em incremento de 10 mV foram normalizados para o nível evocado pelo potencial de membrana de 80 mV no grupo controle. O potencial de retenção foi -100 mV. Dados foram coletados de 10 oócitos em cada grupo. O gráfico inserido mostra a condutância de canal (G) normalizada para o nível em 80 mV (G_{max} na ausência (círculo aberto) e presença de retigabina 200 μM (triângulo aberto), para comparar o efeito de retigabina sobre dependência de voltagem de ativação de canal.

Descrição Detalhada da Invenção

Os requerentes especificamente incorporam os inteiros conteúdos de todas as referências citadas nesta exposição. Ainda, quando uma quantidade, concentração, ou outro valor ou parâmetro é dado tanto com o uma faixa, faixa preferida, ou uma lista de valores superiores preferíveis ou valores inferiores preferíveis, isto é para ser entendido como especificamente mostrando todas as faixas formadas a partir de qualquer par de qualquer limite de faixa superior ou valor preferido e qualquer limite de faixa inferior ou valor preferido, independente de se faixas são mostradas separadamente. Onde uma faixa de valores numéricos é aqui recitada, à menos que de outro modo estabelecido, a faixa é pretendida para incluir os seus pontos finais, e todos os inteiros e frações dentro da faixa. Não é pretendido que o escopo da invenção seja limitado aos específicos valores recitados quando definindo uma faixa.

I. Definições

No contexto desta exposição, um número de termos devem ser utilizados.

5 Como aqui usado, o termo "cerca" ou "aproximadamente" significa dentro de 20%, preferivelmente dentro de 10%, e mais preferivelmente dentro de 5% de um dado valor ou faixa.

"Níveis alterados" refere-se à produção de produto(s) gene em organismos em quantidades ou proporções que diferem daquela de organismos normais ou não-transformados. Superexpressão do polipeptídeo pode ser realizada através de primeiro construindo um gene quimérico ou construção quimérica na qual a região codificante está operavelmente ligada a um promotor capaz de direcionar expressão de um gene ou construção nos desejados tecidos no desejado estágio de desenvolvimento. Por razões de conveniência, o gene quimérico ou construção quimérica pode compreender seqüências promotoras e seqüências líderes de tradução derivadas dos mesmos genes. Seqüências não-codificantes 3' codificando sinais de terminação de transcrição também podem ser providas. O presente gene quimérico ou construção quimérica então pode ser construída. A escolha de vetor plasmídeo é dependente do processo que será usado para transformar células hospedeiras. O técnico versado está bem ciente elementos genéticos que têm de estar presentes sobre o vetor plasmídeo de modo a transformar, selecionar, e propagar com sucesso células hospedeiras contendo o gene quimérico ou construção quimérica. O técnico versado também reconhecerá que diferentes eventos de transformação independentes resultarão em diferentes níveis e padrões de expressão (ver, por exemplo, De Almedia ERP et al., Mol. Genet. Genomics 218:78-86 (1989)), e assim que múltiplos eventos têm de ser selecionados de modo a obter linhas mostrando os desejados nível de expressão e padrão. Tal seleção pode ser realizada por análises Southern de ADN, análises Northern de expressão de ARNm análises Western ou imuno citoquímica de expressão de proteína, ou análises fenotípicas.

10
15
20
25
30

Um "anticorpo" inclui uma molécula de imunoglobulina capaz de ligação de um epítopo presente sobre um antígeno. Como aqui usado, o

termo abrange não somente moléculas de imunoglobulina intactas tais como anticorpos monoclonais e policlonais, mas também anticorpos anti-idiotípicos, mutantes, fragmentos, proteínas de fusão, anticorpos bi-específicos, proteínas humanizadas, e modificações da molécula de imunoglobulina que compreendem um sítio de reconhecimento de antígeno da requerida especificidade.

O termo "ADNcs" inclui ADN complementar, ou seja moléculas de ARNm presentes em uma célula ou organismo feitas em ADNc com uma enzima tal como transcriptase reversa. Uma "biblioteca de ADNC" inclui uma coleção de moléculas de ARNm presentes em uma célula ou organismo, convertidas em moléculas de ADNc com a enzima transcriptase reversa, então inseridas em vetores. A biblioteca então pode ser sondada para o específico ADNc (e assim ARNm) de interesse.

O termo "compreendendo" é pretendido incluir realizações abrangidas pelos termos "consistindo essencialmente em" e "consistendo em". Similarmente, o termo "consistindo essencialmente em" é pretendido incluir realizações abrangidas pelo termo "Consistindo em".

Um "polipeptídeo KCNQ5", "seqüência de aminoácidos de KCNQ5", ou "proteína KCNQ5" como aqui usado refere-se as polipeptídeos KCNQ5 tipo não-selvagem tendo pelo menos uma modificação de aminoácido que torna o polipeptídeo KCNQ5 substancialmente insensível ao ativador de canal de K⁺ retigabina enquanto retendo atividade de canal de potássio de corrente M de KCNQ5. "KCNQ5 tipo selvagem" (por exemplo, SEQ ID NO: 4, que representa KCNQ5 tipo selvagem humano), por outro lado, responde a retigabina (ver Wickendon AD et al., Brit. J. Pharmacol. 132:381-84 (2001)). "polipeptídeo KCNQ5(W270L)", "seqüência de aminoácidos de KCNQ5(W270L)", ou "proteína KCNQ5(W270L)" refere-se a um polipeptídeo KCNQ5 humano tendo uma mutação ponto em aminoácido 270 a partir de um resíduo triptofano (em posição de aminoácido 270 na proteína tipo selvagem humana, de inteiro comprimento) para um resíduo leucina, que proporciona insensibilidade a retigabina para o polipeptídeo KCNQ5(W270L). SEQ ID NO: 2 representa um polipeptídeo KCNQ5(W270L).

Polipeptídeo KCNQ5, em uma realização, é um polipeptídeo KCNQ5 humano. Em uma outra realização, polipeptídeo KCNQ5 é um polipeptídeo KCNQ5mamífero, não-humano. Polipeptídeos KCNQ5 mamíferos, não-humanos preferidos incluem polipeptídeo KCNQ5 de rato (co-
5 propriedade, pedido de patente provisório co-pendente N° 60/760 249) e polipeptídeo KCNQ5 de camundongo (N° de Acesso GenBank NM_023872), ambos os quais são sensíveis a retigabina (ver, por exemplo, Jensen HS et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 139:52-62 (2005)), compartilham alta homologia com KCNQ5 tipo selvagem humano (94,7% para rato e 95,2% para ca-
10 mundongo), e contêm um aminoácido que é acreditado ser equivalente a W270 (W269 em rato e W271 em camundongo).

Como aqui usado, uma "proteína quimérica" ou "proteína de fusão" KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) compreende um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) operavelmente ligado a um polipeptídeo não-KCNQ5 ou
15 não-KCNQ5(W270L). Um "polipeptídeo não-KCNQ5" refere-se a um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma proteína que não é substancialmente homóloga à proteína KCNQ5, por exemplo proteína que é diferente da proteína KCNQ5 e que é derivada do mesmo ou um diferente organismo. Um "polipeptídeo não-KCNQ5(W270L)" refere-se a um
20 polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma proteína que não é substancialmente homóloga à proteína KCNQ5(W270L), por exemplo, uma proteína que é diferente da proteína KCNQ5(W270L) e que é derivado do mesmo ou de um diferente organismo. Dentro de uma proteína de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), o polipeptídeo KCNQ5 ou
25 KCNQ5(W270L) pode corresponder a toda ou uma porção de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Em uma realização preferida, uma proteína de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) compreende pelo menos uma porção biologicamente ativa de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Dentro de proteína de fusão, o termo "ligado operavelmente" é pretendido indicar que o
30 polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e o polipeptídeo não-KCNQ5 ou não-KCNQ5(W270L) são usados em-estrutura um para o outro. O polipeptídeo não-KCNQ5 ou não-KCNQ5(W270L) pode ser fundido ao terminus-N ou

terminus-C do polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Um "polinucleotídeo KCNQ5" ou "seqüência de ácidos nucléicos de KCNQ5" refere-se a polinucleotídeos KCNQ5 tipo não-selvagem que codificam polipeptídeos KCNQ5 tendo pelo menos uma modificação de amino-ácido que torna o polipeptídeo KCNQ5 substancialmente insensível ao ativador de canal de K^+ retigabina enquanto retendo uma atividade de canal de potássio de corrente - M de KCNQ5. "Polinucleotídeo KCNQ5 tipo selvagem" ou "seqüência de ácidos nucléicos de KCNQ5 tipo selvagem" (por exemplo, SEQ ID NO: 3, que representa polinucleotídeo KCNQ5 tipo selvagem), por outro lado, codifica KCNQ5 tipo selvagem que responde a retigabina (ver Wickendon AD et al., Brit. J. Pharmacol. 132:381-84 (2001)).

Uma "seqüência codificante" ou uma seqüência "codificando" um produto de expressão, tal como um ARN, polipeptídeo, proteína, ou enzima, é uma seqüência de nucleotídeos que, quando expressa, resulta na produção daquele ARN, polipeptídeo, proteína, ou enzima, isto é, a seqüência de nucleotídeos codifica uma seqüência de aminoácidos para aquele polipeptídeo, proteína, ou enzima.

O termo "complementar" é usado para descrever a relação entre bases nucleotídeos que são capazes de hibridizarem umas às outras. Por exemplo, com relação a ADN, adenosina é complementar para timina e citosina é complementar para guanina.

Os termos "quantidade efetiva", "quantidade terapeuticamente efetiva", e "dosagem efetiva" como aqui usados, referem-se à quantidade de uma molécula efetora que, quando administrada a um mamífero em necessidade, é efetiva para pelo menos melhorar parcialmente condições relacionadas a ou condições adversas de, por exemplo, o sistema nervoso central (CNS) e sistemas periféricos, incluindo vários tipos de dor como, por exemplo, dor somática, cutânea ou visceral causada por exemplo, por queimadura, hematoma, abrasão, laceração, osso quebrado, ligamento lacerado, tendão lacerado, músculo lacerado, infecção viral, bacteriana, de protozoário ou fungos, dermatite de contato, inflamação (causada por exemplo, por trauma, infecção, cirurgia, queimaduras, ou doenças com um componente inflamatório).

rio), câncer, dor de dentes; dor neuropática causada por exemplo, por dano no sistema nervoso central ou periférico devido a câncer, infecção de HIV (vírus de imunodeficiência humana), trauma de tecido, infecção, doença auto-imune, diabetes, artrite, neuropatia diabética, neuralgia trigeminal, ou administração de droga; tratamento de ansiedade causada por exemplo, por 5 distúrbio de pânico, distúrbio de ansiedade generalizada, ou distúrbio de tensão, particularmente distúrbio de tensão aguda, distúrbios afetivos, mal de Alzheimer, ataxia, dano de CNS causado por trauma, acidente vascular cerebral ou doença degenerativa, déficits cognitivos, comportamento compulsivo, demência, depressão, mal de Huntington, mania, prejuízo de memória, 10 distúrbios de memória, disfunção de memória, distúrbios de movimento, distúrbios motores, perda de memória relacionada a idade, doenças neurodegenerativas, mal de Parkinson, e distúrbios motores semelhantes a Parkinson, fobias, mal de Pick, psicose, esquizofrenia, dano de cordão espinhal, 15 tremor, ataques, convulsões, epilepsia, distrofia macular semelhante a Star-gardt, distrofia macular de cone - bastão, mal de Salla, epilepsia, relaxantes de músculo, redutores de febre, ansiolíticos, agentes anti - enxaqueca, analgésicos, distúrbios bipolares, depressão unipolar, distúrbios funcionais do intestino (por exemplo, dispepsia e síndrome de intestino irritável), diarreia, 20 constipação, vários tipos de incontinência urinária (por exemplo, incontinência urinária estimulada, incontinência urinária de tensão, incontinência urinária de transbordamento ou incontinência urinária inconsciente, e incontinência urinária mista), urgência urinária, instabilidade de bexiga, bexiga neurogênica, perda de audição, tinido, glaucoma, distúrbios cognitivos, dor inflamatória crônica e neurálgica; para prevenção e redução de dependência de 25 droga ou tolerância para tratamento de, por exemplo, câncer, inflamação, distúrbios oftálmicos, e vários distúrbios de CNSA.

Os termos "expressa" e "expressão" significam permitindo ou causando a informação em um gene ou sequência de ADN tornar-se manifesta, por exemplo, produzindo uma proteína através de ativação de funções 30 celulares envolvidas em transcrição e tradução de um correspondente gene ou sequência de ADN. Uma sequência de ADN é expressa em ou por uma

célula para formar um "produto de expressão" tal como uma proteína. O próprio produto de expressão, por exemplo, a resultante proteína, também pode ser dito ser "expresso" pela célula. Um produto de expressão pode ser caracterizado como intracelular, extracelular, ou secretado. O termo "intracelular" significa algo que está dentro de uma célula. O termo "extracelular" significa algo que está fora de uma célula. Uma substância é "secretada" por uma célula se ela aparece em medida significativa fora da célula, a partir de algum lugar sobre ou dentro da célula. "Inibição anti - sentido" refere-se à produção de transcrições ARN anti-sentido capazes de supressão de expressão da proteína alvo. "Superexpressão" refere-se à produção de um produto gene em um organismo que excede níveis de produção em organismos normais ou não-transformados. "Supressão" refere-se a supressão de expressão de genes estranhos ou endógenos ou transcritos de ARN.

O termo "sistema de expressão" significa uma célula hospedeira e vetor compatível sob condições apropriadas, por exemplo, para a expressão de uma proteína codificada por ADN estranho carregado pelo vetor e introduzido na célula hospedeira.

O termo "gene" significa uma seqüência de ADN, incluindo seqüências reguladoras precedendo (seqüências não-codificantes 5') e seguindo (seqüência não-codificantes 3') a seqüência codificante, que codifica ou corresponde a uma particular seqüência de aminoácidos que compreende toda ou parte de uma ou mais proteínas ou enzimas. "Gene nativo" refere-se a um gene como encontrado em natureza com suas próprias seqüências reguladoras. "Gene quimérico" ou "construção quimérica" refere-se a qualquer gene ou construção, não um gene nativo, compreendendo seqüências reguladoras e codificantes que não são encontradas juntas na natureza. Da mesma maneira, um gene quimérico ou construção quimérica pode compreender seqüências reguladoras e seqüências codificantes que são derivadas de diferentes fontes, ou seqüências reguladoras e seqüências codificantes derivadas da mesma fonte, mas dispostas em uma diferente maneira daquela encontrada na natureza. "gene endógeno" refere-se a um gene nativo em sua localização natural no genoma de um organismo. Um gene "es-

tranho" refere-se a um gene normalmente não encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo hospedeiro através de transferência de gene. Genes estranhos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não-nativo, ou genes quiméricos. Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma através de um procedimento de transformação.

O termo "geneticamente modificado" inclui uma célula contendo e/ou expressando um gene estranho ou sequência de ácidos nucleicos que por sua vez modifica o genótipo ou fenótipo da célula ou sua progênie. Este termo inclui qualquer adição, supressão, ou interrupção para nucleotídeos endógenos de célula.

Um "produto gene" inclui um aminoácido (por exemplo, peptídeo ou polipeptídeo) gerado quando um gene é transcrito e traduzido.

O termo "heterólogo" refere-se a uma combinação de elementos não ocorrendo naturalmente. Por exemplo, ADN heterólogo refere-se a ADN não localizado naturalmente na célula, ou em um sítio cromossômico da célula. Preferivelmente, o ADN heterólogo inclui um gene estranho para a célula. Um elemento regulador de expressão heterólogo é um elemento tal operavelmente associado com um gene diferente daquele que está associado na natureza.

O termo "homomérico" como aqui usado refere-se a um canal de íon compreendendo somente um tipo de subunidade. Por exemplo, um canal KCNQ dímero homomérico ("homodímero") pode ser composto por duas subunidades polipeptídeo KCNQ5 idênticas. Um tetrâmero homomérico ("homotetrâmero") pode ser composto por quatro subunidades de polipeptídeo KCNQ5 idênticas. O termo "heteromérico" como aqui usado refere-se a um canal de íon compreendendo pelo menos duas subunidades diferentes. Por exemplo, um canal KCNQ dímero heteromérico ("heterodímero") pode ser composto por uma subunidade polipeptídeo KCNQ5 e uma subunidade KCNQ3, ou um canal KCNQ heterodímero pode ser composto por uma subunidade polipeptídeo KCNQ5 e uma subunidade polipeptídeo KCNQ5 diferente. Um canal KCNQ tetrâmero heteromérico ("heterotetrâmero") pode ser

composto por 1, 2, 3, ou 4 subunidades polipeptídeo KCNQ5, contanto que se todas as quatro subunidades sejam subunidades polipeptídeo KCNQ5 que pelo menos uma das subunidades seja diferente das outras três.

"Homólogo" refere-se ao grau de similaridade de seqüência entre dois polímeros (isto é, moléculas de polipeptídeo ou moléculas de ácido nucléico). Os números de porcentagens de homologia aqui referidos refletem a máxima homologia possível entre os dois polímeros, isto é, a porcentagem de homologia quando os dois polímeros são alinhados de modo a terem o maior número de posições emparelhadas (homólogas). Os termos "homólogo" e "homologia" também referem-se à relação entre proteínas que possuem uma "origem evolucionária comum", incluindo proteínas das super - famílias (por exemplo, a super - família imunoglobulina) e proteínas homólogas de diferentes espécies (por exemplo, cadeia leve miosina, etc.) (ver, por exemplo, Reeck GR et al., Cell 50:667 (1987)). Tais proteínas (e seus genes codificantes) têm homologia de seqüência, como refletida por sua similaridade de seqüência, se em termos de porcentagem de similaridade ou a presença de específicos resíduos ou motivos em posições conservadas. Da mesma maneira, o termo "similaridade de seqüência" refere-se ao grau de identidade ou correspondência entre seqüências de ácidos nucléicos ou aminoácidos de proteínas que podem ou não compartilhar uma origem evolucionária comum (ver Reeck GR et al., supra). Entretanto, em utilização comum e no presente pedido de patente, o termo "homólogo", quando modificado com um advérbio tal como "altamente", pode referir-se a similaridade de seqüência e pode ou não relacionar-se a uma origem evolucionária comum.

Para determinar a porcentagem de identidade de duas seqüências de aminoácidos ou de duas seqüências de ácidos nucléicos, as seqüências são alinhadas para propósitos de ótima comparação (por exemplo, folgas podem ser introduzidas em uma ou ambas de uma primeira e uma segunda seqüência de aminoácidos ou ácidos nucléicos para ótimo alinhamento) Em uma realização preferida, o comprimento de uma seqüência referência alinhada para propósitos de comparação é pelo menos 30%, preferi-

velmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, mesmo mais preferivelmente pelo menos 60%, e mesmo mais preferivelmente pelo menos 70%, 80%, ou 90% do comprimento da seqüência referência. Os resíduos em correspondentes posições são então comparados e quando uma

5 posição em uma seqüência é ocupada pelo mesmo resíduo como a correspondente posição na outra seqüência, então as moléculas são idênticas naquela posição. A porcentagem de identidade entre duas seqüências, por isso, é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas duas seqüências (isto é, % de identidade = # de posições idênticas / total #

10 de posições x 100). A porcentagem de identidade entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências, levando em conta o número de folgas, e o comprimento de cada folga, que são introduzidas para ótimo alinhamento das duas seqüências.

A comparação de seqüências e determinação de porcentagem

15 de identidade entre duas seqüências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático. Um exemplo não-limitante de um algoritmo matemático utilizado para comparação de seqüências é o algoritmo de Karlin S e Altschul SF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68 (1990), modificado como em Karlin S and Altschul SF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 (1993). Um

20 tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST (version 2.0) de Altschul SF et al., J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990). Buscas de nucleotídeo BLAST podem ser realizadas com o escore de programa NBLAST = 100, comprimento de palavra = 12 para obter seqüências de nucleotídeos homólogas às moléculas de ácido nucléico. Buscas de proteína BLAST podem ser

25 realizadas com o programa XBLAST, escore = 50, comprimento de palavra = 3 para obter seqüências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteína. Para obter alinhamentos com folga para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul SF et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). Quando utilizando programas BLAST

30 e Gapped BLAST, os parâmetros default dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados.

Um outro algoritmo não-limitante preferido utilizado para a com-

paração de seqüências é o algoritmo de Myers EW and Miller W, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988). Um tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que é parte do pacote de software de alinhamento de seqüência GCG. Quando utilizando o programa ALIGN para comparação de

5 seqüências de aminoácidos, uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de folga de 12, e uma penalidade de folga de 4 podem ser usados.

Um outro exemplo não-limitante de um algoritmo matemático utilizado para o alinhamento de seqüências de proteínas é o algoritmo de

10 Lipman - Pearson (Lipman DJ and Pearson WR, Science 227:1435-41 (1985)). Quando usando o algoritmo de Lipman - Pearson, uma tabela de resíduo de peso PAM250, uma penalidade de comprimento de folga de 12, uma penalidade de folga de 4, e um Kutple de 2 podem ser usados. Um e-

15 xemplo não-limitante, preferido, de um algoritmo matemático utilizado para o alinhamento de seqüências de ácidos nucléicos é o algoritmo de Wilbur - Lipman (Wilbur WJ and Lipman DJ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-30 (1983)). Quando usando o algoritmo de Wilbur - Lipman, uma janela de 20, uma penalidade de folga de 3, Ktuple de 3 podem ser usados. Ambos, o al-

20 goritmo de Lipman - Pearsoin e o algoritmo de Wilbur - Lipman são incorpo-

20 rados, por exemplo, no programa MEGALIGN (por exemplo, versão 3.1.7) que é parte do pacote de software de análise de seqüência DNASTAR.

Adicionais algoritmos para análises de seqüências são conheci-

dos na técnica, e incluem ADVANCE e ADAM, descritos em Torelli A and Robotti CA, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5 (1994); e FASTA, descrito em Pe-

25 arson WR and Lipman DJ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 (1988).

Em uma realização preferida, a porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácidos é determinada usando o programa GAP no pacote de software GCG, usando uma matriz Blosun 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de folga de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de

30 comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Ainda em uma outra realização preferida, a porcentagem de identidade entre duas seqüências de nucleotídeos é de-

terminada usando o programa GAP no pacote de software GCG, usando um

NWSgapdna. Matriz CMP e um peso de folga de 40, 50, 60, 70, ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

5 Alinhamentos de proteínas também podem ser feitos usando o programa de alinhamento de proteína global Geneworks (por exemplo, versão 2.5.1) com o custo para folga aberta fixado em 5, o custo para folga aumentando fixado em 5, e comprimento diagonal mínimo fixado em 4, o offset diagonal máximo fixado em 130, e corte consenso fixado em 50% e utilizando a matriz Pam 250.

10 As seqüências de ácidos nucleicos e proteínas ainda podem ser usadas como uma "seqüência questão" para realização de uma busca contra bases de dados públicas para, por exemplo, identificar outros membros de família ou seqüências relacionadas. Tais buscas podem ser realizadas usando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul SF et al., J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990). Buscas de nucleotídeos BLAST podem ser
15 realizadas com o programa NBLAST, escore = 100, comprimento de palavra = 12 para obter seqüências de nucleotídeos homólogas a moléculas de ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Buscas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, escore = 50, comprimento de palavra = 3 para obtenção de seqüências de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(M270L). Para obter alinhamentos com
20 folgas para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul SF et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). Quando utilizando programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros default dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST)
25 podem ser usados. Por exemplo, as seqüências de nucleotídeos podem ser analisadas usando a matriz Blastn default 1-3 com penalidades de folga fixadas em: existência 11 e extensão 1. As seqüências de aminoácidos podem ser analisadas usando as fixações default: a matriz Blosum62 com penalidades de folga fixadas em existência 11 e extensão 1.

30 O termo "célula hospedeira" significa qualquer célula de qualquer organismo que é selecionada, modificada, transformada, crescida, ou usada ou manipulada de qualquer maneira, para a produção de uma subs-

tância pela célula, por exemplo, a expressão pela célula de um gene, uma sequência de ADN ou ARN, uma proteína, ou uma enzima.

Uma molécula de ácido nucléico é "hibridizável" a uma outra molécula de ácido nucléico, tal como ADNc, ADN genômico, ou ARN, quando

5 uma forma de fita simples da molécula de ácido nucléico pode anelar para o outra molécula de ácido nucléico sob as condições apropriadas de temperatura e resistência iônica de solução (Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) Cold spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87696-309-6)). As condições de temperatura e

10 resistência iônica determinam a "rigoriedade" da hibridização. Para seleção preliminar para ácidos nucléicos homólogos, condições de hibridização de baixa rigoriedade, correspondendo a uma T_m de 55°C, podem ser usadas, por exemplo, 5x SSC, SDS 0,1%, leite 0,25%, e nenhuma formamida; ou formamida 30%, 5x SSC, SDS 0,5%). Condições de hibridização de rigoriedade

15 moderada correspondem a uma maior T_m , por exemplo, formamida 40%, com 5x ou 6x SCC. Condições de hibridização de alta rigoriedade correspondem à mais alta T_m , por exemplo, formamida 50%, 5x ou 6x SCC. Hibridização requer que os dois ácidos nucléicos contenham seqüências complementares embora, dependendo da rigoriedade da hibridização, de-

20 semparelhamentos entre bases sejam possíveis. A apropriada rigoriedade para hibridização de ácidos nucléicos depende do comprimento dos ácidos nucléicos e o grau de complementação, variáveis bem conhecidas na técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas seqüências de nucleotídeos, maior o valor de T_m para híbridos de ácidos nucléicos

25 tendo aquelas seqüências. A estabilidade relativa (correspondendo a maior T_m) de hibridizações de ácido nucléico diminui na seguinte ordem: ARN : ARN, ADN : ARN, ADN : ADN. Para híbridos maiores que 100 nucleotídeos em comprimento, equações para cálculo de T_m foram derivadas (Sambrook et al., supra).

30 "Inibidores", "ativadores", "abridores", ou "moduladores" de canais de potássio de voltagem bloqueada compreendendo uma subunidade KCNQ referem-se a moléculas inibidoras ou ativadoras identificadas usando

ensaios in vitro e in vivo para função de canal KCNQ. Em particular, inibidores, ativadores, e moduladores referem-se a compostos que aumentam função de canal KCNQ, pelo que reduzindo dor em um sujeito. "Inibidores" são compostos que diminuem, bloqueiam, previnem, retardam ativação, inativam, dessensibilizam, ou regulam descendentemente o canal, ou velocidade ou aperfeiçoam desativação. "Ativadores" são compostos que aumentam, abrem, ativam, facilitam, aperfeiçoam ativação, sensibilizam ou regulam ascendentemente atividade de canal, ou retardam ou diminuem inativação. Tais ensaios para inibidores e ativadores também incluem, por exemplo, expressão de KCNQ recombinante em células ou membranas de células e então medição de fluxo de íons através de canal direta ou indiretamente.

O termo "isolado" significa que o material é removido de seu ambiente original ou nativo (por exemplo, o ambiente natural se ele está ocorrendo naturalmente). Por isso, um polinucleotídeo ou polipeptídeo ocorrendo naturalmente presente em um animal vivo não é isolado, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo, separado ou modificado por intervenção humana a partir de alguns ou de todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolado. Por exemplo, um "fragmento de ácido nucléico isolado" é um polímero de ARN ou ADN que é de fita dupla ou simples, opcionalmente contendo bases nucleotídeos sintéticas, não-naturais ou alteradas. Um fragmento de ácido nucléico isolado na forma de um polímero de ADN pode ser compreendido por um ou mais segmentos de ADNc, ADN genômico, ou ADN sintético. Tais polinucleotídeos podem ser parte de um vetor e/ou tais polinucleotídeos ou polipeptídeos podem ser parte de uma composição e ainda serem isolados em que tal vetor ou composição não é parte do ambiente no qual eles são encontrados em natureza. Similarmente, o termo "substancialmente purificado" refere-se a uma substância, que foi separada ou de outro modo removida, através de intervenção humana, do ambiente químico imediato no qual ela ocorre em natureza. Polipeptídeos ou ácidos nucléicos substancialmente purificados podem ser obtidos ou produzidos através de qualquer uma de um número de técnicas e procedimentos genericamente conhecidos no campo (ver, por exemplo, Scopes R (1987) In: Pro-

tein purification: principles and practice, Springer-Verlag, NY. General protein and DNA/RNA purification references: Current Protocols in Molecular Biology, Green publishing associates and John Wiley & Sons).

O termo "mamífero" refere-se a um humano, um primata não-humano, canino, felino, bovino, ovino, suíno, murino, ou outro mamífero veterinário ou de laboratório. Aqueles versados na técnica reconhecem que uma terapia que reduz a severidade de uma patologia em uma espécie de mamífero é anunciadora do efeito da terapia sobre outras espécies de mamíferos.

O termo "modula" refere-se à supressão, aperfeiçoamento, ou indução da função. Por exemplo, "modulação" ou "regulação" de expressão de gene refere-se a uma mudança na atividade de um gene. Modulação de expressão pode incluir, mas não é limitada a, ativação de gene e repressão de gene. "Modula" ou "regula" também refere-se a processos, condições, ou agentes que aumentam ou diminuem a atividade biológica de uma proteína, enzima, inibidor, transdutor de sinal, receptor, ativador de transcrição, cofator, e semelhantes. Esta mudança em atividade pode ser aumentada ou diminuída de tradução de ARNm, transcrição de ADN, e/ou degradação de ARNm ou proteína, que pode por sua vez corresponder a um aumento ou diminuição em atividade biológica. Tal aperfeiçoamento ou inibição pode ser contingente com ocorrência de um específico evento, tal como ativação de um caminho de transdução de sinal e/ou pode ser manifesta somente em particulares tipos de células.

"Atividade modulada" refere-se a qualquer atividade, condição, doença ou fenótipo que é modulado por uma forma biologicamente ativa de uma proteína. Modulação pode ser afetada através de afetação de concentração de proteína biologicamente ativa, por exemplo, através de regulação de expressão ou degradação, ou através de efeito agonístico ou antagonístico direto como, por exemplo, através de inibição, ativação, ligação, ou liberação de substrato, modificação tanto química como estrutural, ou através de interação direta ou indireta que pode envolver adicionais fatores.

Como aqui usado, uma molécula de ácido nucléico "ocorrendo

naturalmente" refere-se a uma molécula de ARN ou ADN tendo uma sequência de nucleotídeos que ocorre em natureza (por exemplo, codifica uma proteína natural).

Como aqui usado, "molécula de ácido nucléico" refere-se à forma polimérica fosfato éster de ribonucleosídeos (adenosina, guanosina, uridina, ou citidina; "moléculas de ARN") ou desoxirribonucleosídeos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, ou desoxicitidina; "moléculas de ADN"), ou quaisquer seus análogos fosfoéster, como fósforotioatos e tioésteres, em forma de fita simples ou uma hélice de fita dupla. Hélices ADN-ADN, ADN-ARN e ARN-ARN de fita dupla são possíveis. O termo molécula de ácido nucléico, e em particular molécula de ADN ou ARN, refere-se somente à estrutura primária e secundária da molécula, e não a limita a quaisquer formas terciárias particulares. Assim, este termo inclui ADN de fita dupla encontrado, inter alia, em moléculas de ADN lineares (por exemplo, fragmentos de restrição) ou circulares, plasmídeos, e cromossomas. Na discussão de estrutura de particulares moléculas de ADN de fita dupla, seqüências podem ser aqui descritas de acordo com a convenção normal de dar-se somente a seqüência na direção 5' para 3' ao longo da fita não-transcrita de ADN (isto é, a fita tendo uma seqüência homóloga ao ARNm).

O termo "operavelmente ligada" significa que uma molécula de ácido nucléico, isto é, ADN, e uma ou mais seqüências reguladoras (por exemplo, um promotor ou sua porção) estão conectadas de modo a permitir transcrição de ARNm a partir da molécula de ácido nucléico ou permitir expressão do produto (isto é, um polipeptídeo) da molécula de ácido nucléico quando as apropriadas moléculas são ligadas às seqüências reguladoras. Dentro de uma construção de fusão, o termo "operavelmente ligado" é pretendido para indicar que o polinucleotídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e um polinucleotídeo não-KCNQ5 ou não-KCNQ5(W270L) estão fundidos em estrutura um ao outro. O polinucleotídeo não-KCNQ5 ou não-KCNQ5(W270L) pode ser fundido 3' ou 5' ao polinucleotídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

O termo "porcentagem de homologia) refere-se à extensão de identidade de seqüência de aminoácidos entre polinucleotídeos ou polipeptí-

deos. A homologia entre quaisquer dois polinucleotídeos ou polipeptídeos é uma função direta do número total de nucleotídeos ou aminoácidos emparelhando em uma dada posição em qualquer seqüência, por exemplo, se metade do número total de nucleotídeos em qualquer das seqüências são os
5 mesmos então as duas seqüências são ditas exibirem 50% de homologia.

Um "polinucleotídeo" ou "seqüência de nucleotídeos" é uma série de bases nucleotídeos (também chamadas "nucleotídeos") em um ácido nucléico, tal como ADN ou ARN, e significa qualquer cadeia de dois ou mais nucleotídeos. Uma seqüência de nucleotídeos tipicamente carrega informa-
10 ção genética, incluindo a informação usada por maquinaria celular para fabricar proteínas e enzimas. Estes termos incluem ADNc e genômico de fita simples e dupla, ARN, qualquer polinucleotídeo sintético e manipulado geneticamente, e ambos polinucleotídeos sentido e anti - sentido. Isto inclui moléculas de fita simples e dupla, isto é, híbridos ADN-ADN, ADN-ARN, e ARN-
15 ARN, assim como "ácidos nucléicos de proteína" (PNA) formados por conjugação de bases a uma cadeia principal de aminoácido. Isto também inclui ácidos nucléicos contendo bases modificadas tais como, por exemplo, tio-uracila, tio-guanina, e flúor uracila.

É contemplado que onde a molécula de ácido nucléico é ARN, a
20 T (timina) em seqüências não-ARN aqui providas é substituída com U (uracila). Por exemplo, SEQ ID NO: 1 é aqui mostrada como uma seqüência ADNc. Assim, pode ser óbvio para aqueles versados na técnica que uma molécula de ARN compreendendo seqüências a partir destas seqüências, por exemplo, podem ter T substituída com U.

25 O termo "polipeptídeo" inclui um composto de dois ou mais aminoácidos subunidades, análogos de aminoácidos, ou peptidomiméticos. As subunidades podem estar ligadas por ligações peptídeo. Em uma outra realização, a subunidade pode ser ligada por outras ligações, por exemplo, éster, éter, etc. Como aqui usado o termo "aminoácido" inclui tanto aminoácidos naturais e/ou não-naturais ou sintéticos, incluindo glicina e ambos isô-
30 meros óticos D ou L, e análogos de aminoácidos e peptidomiméticos. Um peptídeo de três ou mais aminoácidos é comumente referido como um oligo-

peptídeo. Cadeias de peptídeo de mais que três ou mais aminoácidos são referidas como um polipeptídeo ou uma proteína.

Um "primer" inclui um polinucleotídeo curto, genericamente com um grupo 3'-OH livre que se liga a um alvo ou "molde" presente em uma amostra de interesse através de hibridização com o alvo, e a seguir promovendo polimerização de um polinucleotídeo complementar para o alvo. Uma "reação de cadeia polimerase" ("PCR") é uma reação na qual cópias réplicas são feitas de um polinucleotídeo alvo usando um "par de iniciadores" ou "conjunto de iniciadores" consistindo em um iniciador "à montante" e um "à jusante", e um catalisador de polimerização, tal como uma ADN polimerase, e tipicamente uma enzima polimerase termicamente estável. Processos para PCR são bem conhecidos na técnica, e são ensinados, por exemplo, em MacPherson et al., IRL Press at Oxford University Press (1991). Todos os processos de produção de cópias réplicas de um polinucleotídeo, tal como PCR ou clonagem de gene, são coletivamente aqui referidos como "replicação". Um iniciador também pode ser usado como uma sonda em reações de hibridização, tais como análises de Southern ou Northern blot (ver, por exemplo, Sambrook J et al., supra).

Uma "sonda" quando usada no contexto de manipulação de polinucleotídeo inclui um oligonucleotídeo que é provido como uma reagente para detectar um alvo presente em uma amostra de interesse através de hibridização com o alvo. Usualmente, uma sonda compreenderá um marcador ou um meio através do qual um marcador pode ser ligado, tanto antes como subsequente à reação de hibridização. Apropriados marcadores incluem, mas não são limitados a, radioisótopos, fluorocromos, compostos quimioluminescentes, corantes, e proteínas, incluindo enzimas.

Uma "seqüência promotora" é uma região reguladora de ADN capaz de ligação de ARN polimerase em uma célula e iniciação de transcrição de uma seqüência codificante À jusante (direção 3'). Para os presentes propósitos, a seqüência promotora está ligada em seu terminus 3' através de sítio de iniciação de transcrição e estende-se à montante (direção 5') para incluir o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar

transcrição em níveis detectáveis acima de fundo. Dentro de seqüência promotora será encontrado um sítio de iniciação de transcrição (convenientemente definido, por exemplo, através de mapeamento com nuclease S1), assim como domínios de ligação de proteína (seqüências consenso) responsáveis pela ligação de ARN polimerase.

O termo "purificado" como aqui usado refere-se a material que foi isolado sob condições que reduzem ou eliminam a presença de materiais não-relacionados, ou seja, contaminantes, incluindo materiais nativos dos quais o material é obtido. Por exemplo, uma proteína purificada é preferivelmente substancialmente livre de outras proteínas ou ácidos nucleicos com os quais ela está associada em um célula; uma molécula de ácido nucleico purificada está substancialmente livre de proteínas ou outras moléculas de ácidos nucleicos não-relacionadas com as quais ela pode ser encontrada dentro de uma célula. Como aqui usado, o termo "substancialmente livre" é usado operacionalmente, no contexto de testes analíticos do material. Preferivelmente, material purificado substancialmente livre de contaminantes é pelo menos 50% puro; mais preferivelmente, pelo menos 90% puro; e mais preferivelmente ainda pelo menos 99% puro. Pureza pode ser avaliada por cromatografia, eletroforese com gel, ensaio imuno, análise de composição, ensaio biológico, e outros processos conhecidos na técnica.

Processos para purificação são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, ácidos nucleicos podem ser purificados por precipitação, cromatografia (incluindo cromatografia de fase sólida preparativa, hibridização de oligonucleotídeo, e cromatografia de hélice tripla), ultracentrifugação, e outros meios. Polipeptídeos e proteínas podem ser purificados através de vários processos incluindo, sem limitação, eletroforese de disco - gel preparativa, focalização isoeletrica, HPLC, HPLC de fase reversa, filtração com gel, cromatografia de troca de íons e partição, precipitação e cromatografia de dessalinização, extração e distribuição em contra-corrente. Para alguns propósitos, é preferível produzir o polipeptídeo em um sistema recombinante no qual a proteína contem uma adicional seqüência etiqueta que facilita purificação, tal como, mas não limitado a, uma seqüência poli histidina, ou uma

seqüência que especificamente liga-se a um anticorpo, tal como FLAG e GST. O polipeptídeo então pode ser purificado a partir de um lisado bruto da célula hospedeira através de cromatografia sobre uma apropriada matriz de fase sólida. Alternativamente, anticorpos produzidos contra a proteína ou

5 contra peptídeos derivados da mesma podem ser usados como reagentes de purificação. Células podem ser purificadas através de várias técnicas, incluindo, por exemplo, centrifugação, separação com matriz (por exemplo, separação com lã de nylon), panning e outras técnicas de seleção imuno, depleção (por exemplo, depleção complemento de células contaminantes), e

10 classificação de célula (por exemplo, classificação de célula ativada com fluorescência (FACS)). Outros processos de purificação são possíveis. Um material purificado pode conter menos que cerca de 50%, preferivelmente menos que cerca de 75%, e mais preferivelmente menos que cerca de 90%, dos componentes celulares com os quais ele foi originalmente associado. O

15 "substancialmente puro" indica o mais alto grau de pureza que pode ser obtido usando técnicas de purificação padrões conhecidas.

O termo "composto teste" inclui compostos com conhecida estrutura química mas não necessariamente com uma conhecida função ou atividade biológica. Compostos testes também podem ter estruturas não-

20 identificadas ou serem misturas de compostos desconhecidos, por exemplo, a partir de amostras biológicas brutas como extratos de plantas. Grandes números de compostos podem ser randomicamente selecionados a partir de "bibliotecas químicas" que referem-se a coleções de compostos químicos purificados ou coleções de extratos brutos a partir de várias fontes. As biblio-

25 tecas químicas podem conter compostos que foram sintetizados quimicamente ou purificados de produtos naturais. Os compostos podem compreender moléculas pequenas inorgânicas ou orgânicas ou maiores compostos orgânicos tais como, por exemplo, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, esteróides, lipídeos, fosfolipídeos, ácidos nucléicos, e lipoproteínas. A quantidade de composto testado pode variar dependendo da biblioteca química, mas,

30 para bibliotecas de composto purificado (homogêneo), 10 μ M é tipicamente a mais alta dose inicial testada. Processos de introdução de compostos tes-

tes em células são bem conhecidos na técnica.

O termo "transfecção" significa a introdução de um ácido nucléico estranho em uma célula. O termo "transformação" significa a introdução de um gene "estranho" (isto é, extrínseco ou extracelular), seqüência de ADN OU ARN a uma célula hospedeira, de modo que a célula hospedeira expressará o gene ou seqüência introduzida para produzir uma desejada substância, tipicamente uma proteína ou enzima codificada pelo gene ou seqüência introduzida. O gene ou seqüência introduzida também pode ser chamada um gene ou seqüência "clonado" ou "estranho", pode incluir seqüências reguladoras ou controles, tal como partida, parada, promotora, sinal, secreção, e outras seqüências usadas por uma maquinaria genética de célula. O gene ou seqüência pode incluir seqüências não-funcionais ou seqüências com função desconhecida. Uma célula hospedeira que recebe e expressa ADN ou ARN introduzido foi "transformada" e é um "transformante" ou um "clone". O ADN ou ARN introduzido em uma célula hospedeira pode provir de qualquer fonte, incluindo células do mesmo gênero ou espécie como a célula hospedeira, ou células de um gênero ou espécie diferente. Da mesma maneira, ainda uma realização é para uma célula hospedeira transformada com o vetor descrito acima. Em uma realização, a célula hospedeira é uma célula procariótica. Ainda em uma realização, a célula hospedeira é uma célula eucariótica. Em uma realização preferida, a célula hospedeira é uma célula de *E. coli*.

O termo "variante" também pode ser usado para indicar um gene modificado ou alterado, seqüência de ADN, enzima, célula, etc. Abrangidas pelo termo "variante(s)" estão substituições, adições ou supressões de nucleotídeos e aminoácidos. Também, abrangidas pelo termo "variante(s)" estão moléculas de KCNQ5 naturais e sintéticas. Por exemplo, variante pode referir-se a polipeptídeos que diferem de um polipeptídeo referência. Genericamente, as diferenças entre o polipeptídeo referência e o polipeptídeo que difere em seqüência de aminoácidos de polipeptídeo referência são limitadas de modo que as seqüências de aminoácidos da referência e a variante são no total similares de perto e, em algumas regiões, idênticas. Um polipeptídeo

variante e referência podem diferir em seqüência de aminoácidos por uma ou mais substituições, supressões, adições, fusões, e trunicações que podem ser conservativas ou não-conservativas e podem estar presentes em qualquer combinação. Por exemplo, variantes podem ser aquelas nas quais

5 vários, por exemplo, de 50 a 30, de 30 a 20, de 20 a 10, de 10 a 5, de 5 a 3, de 3 a 2, de 2 a 1 aminoácidos são inseridos, substituídos ou suprimidos, em qualquer combinação. Adicionalmente, uma variante pode ser um fragmento de um polipeptídeo que difere de uma seqüência polipeptídeo referência sendo menor que a seqüência referência, tal como através de uma supres-

10 são terminal ou interna. Uma variante de um polipeptídeo também inclui um polipeptídeo que retém essencialmente a mesma função ou atividade biológica como tal polipeptídeo, por exemplo, proteínas precursoras que podem ser ativadas através de clivagem da porção precursora para produzir um polipeptídeo maduro ativo. Estas variantes podem ser variações alélicas caracterizadas por diferenças nas seqüências de nucleotídeos do gene estrutural codificando a proteína, ou podem envolver união diferencial ou modificação pós-traducional. Variantes também incluem uma proteína relacionada tendo substancialmente a mesma atividade biológica, mas obtida de uma espécie diferente. Aqueles versados na técnica podem produzir variantes tendo

15 substituições, supressões, adições de aminoácidos simples ou múltiplas. Estas variantes podem incluir, inter alia: (i) uma na qual um ou mais dos resíduos de aminoácidos estão substituídos com um resíduo de aminoácido conservado ou não-conservado (preferivelmente um resíduo de aminoácido conservado) e tal resíduo de aminoácido substituído pode ou não ser um

20 codificado pelo código genético, ou (ii) uma na qual um ou mais aminoácidos são suprimidos do peptídeo ou proteína, ou (iii) uma na qual um ou mais aminoácidos são adicionados ao polipeptídeo ou proteína, ou (iv) uma na qual um ou mais dos resíduos de aminoácidos incluem um grupo substituinte, ou

25 (v) uma na qual o polipeptídeo maduro está fundido com um outro composto, tal como um composto para aumentar a meia-vida do polipeptídeo (por exemplo, polietileno glicol), ou (vi) uma na qual os adicionais aminoácidos estão fundidos ao polipeptídeo maduro tal como uma seqüência líder ou se-

30

- cretora ou uma seqüência que é empregada para purificação do polipeptídeo maduro ou uma seqüência de proteína precursora. Uma variante do polipeptídeo também pode ser uma variante ocorrendo naturalmente tal como uma variante alélica ocorrendo naturalmente, ou ela pode ser uma variante que não é conhecida ocorrer naturalmente. Todas tais variantes definidas acima são julgadas estarem dentro do escopo de ensinamentos na técnica.

- Os termos "vetor", "vetor de clonagem", e "vetor de expressão" referem-se ao veículo através do qual ADN pode ser introduzido em uma célula hospedeira, resultando em expressão da seqüência introduzida. Um "vetor inter-genérico" é um vetor que permite conjugação inter-genérica, isto é, utiliza um sistema de passagem de ADN a partir de E. coli para uma outra linha de células diretamente. Conjugação inter-genérica tem menos manipulações que transformação.

- Vetores tipicamente compreendem o ADN de um agente transmissível, no qual ADN estranho é inserido. Um meio comum para inserir um segmento de ADN em um outro segmento de ADN envolve o uso de enzimas chamadas enzimas de restrição que clivam ADN em sítios específicos (grupos específicos de nucleotídeos) chamados sítios de restrição. Um "cassete" refere-se a uma seqüência codificando ADN ou segmento de ADN que codifica um produto de expressão que pode ser inserido em um vetor em definidos sítios de restrição. Os sítios de restrição de cassete são desenhados para assegurar inserção do cassete no quadro de leitura próprio. Genericamente, ADN estranho é inserido em um ou mais sítios de restrição do ADN vetor, e então é carregado pelo vetor em uma célula hospedeira junto com o ADN vetor transmissível. Um segmento ou seqüência de ADN tendo ADN inserido ou adicionado, tal como um vetor de expressão, também pode ser chamado uma "construção de ADN". Um tipo comum de vetor é um "plasmídeo", que genericamente é uma molécula auto - contida de ADN de fita dupla, usualmente de origem bacteriana, que pode rapidamente aceitar ADN adicional (estranho) e que pode ser facilmente introduzida em uma apropriada célula hospedeira. Um vetor plasmídeo freqüentemente contém ADN codificante e ADN promotor e tem um ou mais sítios de restrição apro-

priados para inserção de ADN estranho. ADN codificante é uma seqüência de ADN que codifica uma particular seqüência de aminoácidos para uma particular enzima ou proteína. ADN promotor é uma seqüência de ADN que inicia, regula, ou de outro modo media ou controla a expressão do ADN codificante. ADN promotor e ADN codificante podem ser do mesmo gene ou de genes diferentes, e podem ser dos mesmos ou diferentes organismos. Vetores de clonagem recombinantes freqüentemente incluirão um ou mais sistemas de replicação para clonagem ou expressão, um ou mais marcadores para seleção no hospedeiro, por exemplo, resistência a antibiótico, e um ou mais cassetes de expressão. Construções de vetores podem ser produzidas usando técnicas padrões de biologia molecular e ADN recombinante dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são inteiramente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook J et al., supra; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Ausubel FM et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994). Vetores comumente usados, comercialmente disponíveis incluem, por exemplo, vetores pcDNA3 e pCR de Invitrogen (Carlsbad, Calif.) e vetores pGEM de Promega (Madison, Wis.).

Atividade de "voltagem bloqueada" ou "bloqueio de voltagem" ou "dependência de voltagem" referem-se a uma característica de um canal de potássio composto por monômeros ou subunidades polipeptídeo individuais. Genericamente, a probabilidade de uma abertura de canal de potássio de voltagem bloqueada aumenta quando uma célula é despolarizada. Canais de potássio de voltagem bloqueada primariamente permitem efluxo de potássio em potenciais de membrana mais positivos que o potencial reverso para potássio (E_K) em células típicas, porque eles têm maior probabilidade de serem abertos em tais voltagens. E_K é o potencial de membrana no qual não há fluxo líquido de íons potássio porque o potencial elétrico (isto é, potencial de voltagem) dirigindo efluxo de potássio é balanceado pelo gradiente de concentração para potássio. O potencial de membrana de células depende primariamente de seus canais de potássio e está tipicamente entre -60 e -100 mV para células mamíferas. Este valor é também conhecido como o

"potencial reverso" ou o potencial "Nernst" para potássio. Alguns canais de potássio bloqueados com voltagem sofrem inativação, o que pode reduzir efluxo de potássio em maiores potenciais de membrana. Canais de potássio também podem permitir influxo de potássio em certos exemplos quando eles permanecem abertos em potenciais de membrana negativos para E_K (ver, por exemplo, Adams and Nonner, in Potassium Channels, pp. 40-60 (Cook, ed. 1990)). A característica de bloqueio com voltagem pode ser medida através de uma variedade de técnicas para medição de mudanças em fluxo de corrente e fluxo de íons através de um canal, por exemplo, através de mudança de $[K^+]$ da solução externa e medição de potencial de ativação da corrente de canal (ver, por exemplo, patente US 5 670 335), através de medição de corrente com técnicas de grampo de remendo ou grampo de voltagem sob diferentes condições, e através de medição de íons com traçadores marcados com rádio ou corantes sensíveis a voltagem sob diferentes condições.

II. Polinucleotídeos isolados codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou Suas Porções

Na prática de processos aqui mostrados, vários agentes podem ser usados para modular a atividade e/ou expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula. Em uma realização, um agente é uma molécula de ácido nucléico codificando um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou uma sua porção. Tais moléculas de ácido nucléico são descritas em mais detalhes abaixo.

Existe uma conhecida e definida correspondência entre a sequência de aminoácidos de uma particular proteína e as sequências de nucleotídeos que podem codificar a proteína, como definido pelo código genético (mostrado abaixo). Do mesmo modo, há uma conhecida e definida correspondência entre a sequência de nucleotídeos de uma particular molécula de ácido nucléico e a sequência de aminoácidos codificada por aquela molécula de ácido nucléico, como definido pelo código genético.

Código Genético

Alanina (Ala, A) GCA, GCC, GCG, GCT

- Arginina (Arg, R) AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
 Asparagina (Asn, N) AAC, AAT
 Ácido aspártico (Asp, D) GAC, GAT
 Cisteína (Cys, C) TGC, TGT
 5 Ácido glutâmico (Glu, E) GAA, GAG
 Glutamina (Gln, Q) CAA, CAG
 Glicina (Gly, G) GGA, GGC, GGG, GGT
 Histidina (His, H) CAC, CAT
 Isoleucina (Ile, I) ATA, ATC, ATT
 10 Leucina (Leu, L) CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
 Lisina (Lys, K) AAA, AAG
 Metionina (Met, M) ATG
 Fenil alanina (Phe, F) TTC, TTT
 Prolina (Pro, P) CCA, CCC, CCG, CCT
 15 Serina (Ser, S) AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
 Treonina (Thr, T) ACA, ACC, ACG, ACT
 Triptofano (Trp, W) TGG
 Tirosina (Tyr, Y) TAC, TAT
 Valina (Val, V) GTA, GTC, GTG, GTT
 20 Sinal de terminação (fim) TAA, TAG, TGA

- Uma importante e bem conhecida característica do código genético é sua redundância, pelo que, para maior parte dos aminoácidos usados para fabricar proteínas, mais de um codificando tripleto nucleotídeo pode ser empregado (ilustrado acima). Por isso, um número de diferentes se-
- 25 seqüências de nucleotídeos podem codificar uma dada seqüência de aminoácidos. Tais seqüências de nucleotídeos são consideradas funcionalmente equivalentes porque elas resultam na produção da mesma seqüência de aminoácidos em todos os organismos (embora certos organismos possam traduzir algumas seqüências mais eficientemente do que outras). Além dis-
- 30 so, ocasionalmente, uma variante metilada de uma purina ou pirimidina pode ser encontrada em uma dada seqüência de nucleotídeos. Tais metilações não afetam a relação codificante entre o códon trinucleotídeo e o correspon-

dente aminoácido.

Em vista do anterior, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de ADN ou ARN para um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (ou uma sua porção) pode ser usada para derivar a sequência de aminoácido

5 KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), usando o código genético para traduzir a molécula de ADN ou ARN em uma sequência de aminoácidos. Da mesma maneira, para qualquer sequência de aminoácido KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), correspondentes seqüências de polinucleotídeos que podem codificar proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser deduzidas do código genético (que,

10 devido sua redundância, produzirá múltiplas seqüências de polinucleotídeos para qualquer dada seqüência de aminoácidos). Assim, descrição e/ou exposição aqui de uma seqüência de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) deve ser considerada para também incluir descrição e/ou

15 exposição da seqüência de aminoácidos codificada pela seqüência de polinucleotídeos. Similarmente, descrição e/ou exposição de uma seqüência de aminoácidos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) aqui deve ser considerada para também incluir descrição e/ou exposição de todas possíveis seqüências de polinucleotídeos que podem codificar a seqüência de aminoácidos.

Um aspecto pertence a moléculas de ácido nucléico isoladas

20 que codificam proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou suas porções biologicamente ativas, assim como fragmentos de ácidos nucléicos suficientes para uso como sondas de hibridização para identificar polinucleotídeos codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L)) e fragmentos para uso como primers PCR para a amplifi-

25 cação ou mutação de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Porções biologicamente ativas de proteínas KCNQ5 incluem, por exemplo, os seis domínios transmembrana, a região de poro, e a região terminal-C conservada. Será entendido que, na discussão de usos de moléculas de ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), fragmentos de tais polinucleotídeos assim

30 como polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de inteiro comprimento podem ser usados.

Um polinucleotídeo aqui mostrado, por exemplo, SEQ ID NO: 1,

ou uma sua porção, pode ser isolado usando técnicas de biologia molecular padrão e a informação de seqüência aqui provida. Por exemplo, usando toda ou uma porção da seqüência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 como uma sonda de hibridização, polinucleotídeos KCNQ5(W270L) podem ser isolados usando técnicas padrões de hibridização e clonagem (por exemplo, como descrito em Sambrook, J., Fritsh, E.F., e Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Além disso, um polinucleotídeo abrangendo toda ou uma porção de SEQ ID NO: 1 pode ser isolado por PCR usando primers oligonucleotídeos sintéticos desenhados baseado na seqüência de, por exemplo, SEQ ID NO: 1.

Um polinucleotídeo pode ser amplificado usando ADNc, ARNm ou alternativamente, ADN genômico, como um molde e apropriados primers oligonucleotídeos de acordo com técnicas padrões de amplificação de PCR. O polinucleotídeo assim amplificado pode ser clonado em um vetor apropriado e caracterizado por análise de seqüência de ADN. Além disso, oligonucleotídeos correspondendo a seqüências de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser preparados através de técnicas sintéticas padrões, por exemplo, usando um sintetizador de ADN automatizado.

Em uma realização preferida, um polinucleotídeo isolado compreende a seqüência de polinucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1.

Em uma outra realização preferida, um polinucleotídeo isolado compreende um polinucleotídeo que é um complemento da seqüência de polinucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1 ou uma porção desta seqüência de polinucleotídeos. Um polinucleotídeo que é complementar para a seqüência de polinucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1 é um que é suficientemente complementar para a seqüência de polinucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1 de modo que ela pode hibridizar para a seqüência de polinucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1, pelo que formando um duplex estável.

Ainda em uma outra realização preferida, um polinucleotídeo

isolado compreende uma seqüência de polinucleotídeos que é pelo menos cerca de 95%, 98%, ou mais homóloga à seqüência de polinucleotídeos (por exemplo, ao inteiro comprimento da seqüência de nucleotídeos) mostrada em SEQ ID NO: 1 ou uma porção desta seqüência de nucleotídeos.

- 5 Além disso, um polinucleotídeo pode compreender somente uma porção da seqüência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1; por exemplo, um fragmento que pode ser usado como uma sonda ou primer ou um fragmento codificando uma porção biologicamente ativa de uma proteína KCNQ5(W270L), contanto que o fragmento inclua nucleotídeos 808-810 de
- 10 SEQ ID NO:1. A sonda / primer tipicamente compreende um oligonucleotídeo substancialmente purificado. Em uma realização, o oligonucleotídeo compreende uma região de seqüência de nucleotídeos que hibridiza sob condições rigorosas para pelo menos cerca de 12 ou 15, preferivelmente cerca de 20 ou 25, mais preferivelmente cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,
- 15 65, 75, ou 100 polinucleotídeos consecutivos de uma seqüência sentido de SEQ ID NO: 1. Em uma outra realização, um polinucleotídeo compreende uma seqüência de polinucleotídeos que é pelo menos cerca de 100, 200, 300, 400, 500, 600 ou 700 nucleotídeos em comprimento e hibridiza sob condições rigorosas de hibridização a uma seqüência de polinucleotídeos de
- 20 SEQ ID NO: 1 ou os seus complementos.

Em uma outra realização, um polinucleotídeo compreende pelo menos cerca de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO: 1, contanto que o fragmento inclua nucleotídeos 808-810 de SEQ ID NO: 1.

- 25 Em outras realizações, um polinucleotídeo tem pelo menos 95% de identidade, e mais preferivelmente 98% de identidade, com um polinucleotídeo compreendendo pelo menos cerca de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, ou mais polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1, contanto que uma substituição em nucleotídeos 808-810 seja para um códon que produz uma substituição conservativa para o aminoácido leucina (por exemplo, uma substituição
- 30 que codifica para alanina, glicina, isoleucina ou valina).

Em uma outra realização, um polinucleotídeo codifica um poli-

peptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1 no lugar do domínio transmembrana S5-S6 tipo selvagem de KCNQ5. O domínio transmembrana S5-S6 humano foi determinado através de previsão de estrutura secundária usando o programa GCG baseado em hidrofobicidade da sequência de aminoácidos. S5 contém aminoácidos L266 a V287, e S6 contém aminoácidos L326 a L352. Devido à falta de estrutura cristal de KCNQ5, SEQ ID NO: 6 inclui uma região estendida no ligador S4-S5 putativo. Assim, em uma realização, o domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ5 inclui nucleotídeos 769-1062 de SEQ ID NO: 3, correspondendo a aminoácidos 257-354 de SEQ ID NO: 4. Preferivelmente, o domínio transmembrana S5-S6 é de KCNQ1 humano, mais preferivelmente o domínio transmembrana S5-S6 codificado por SEQ ID NO: 5. Em uma realização, o polinucleotídeo é uma sequência de ácido nucléico compreendendo SEQ ID NO: 3, onde nucleotídeos 769-1062 são substituído com SEQ ID NO: 5. Em uma outra realização, o polinucleotídeo codifica SEQ ID NO: 4, onde aminoácidos 257-354 estão substituídos com um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1, preferivelmente o domínio transmembrana S5-S6 representado por SEQ ID NO: 6.

Em uma outra realização, um polinucleotídeo codifica um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1 no lugar do domínio transmembrana S5 tipo selvagem de KCNQ5. O domínio transmembrana S5 em KCNQ5 humano corresponde a polinucleotídeos 769-873 de SEQ ID NO: 3, codificando aminoácidos S257-A291 de SEQ ID NO: 4. Preferivelmente, o domínio transmembrana S5 é de KCNQ1 humano, mais preferivelmente o domínio transmembrana S5 codificado por nucleotídeos 1-105 de SEQ ID NO: 5. Em uma realização, o polinucleotídeo é uma sequência de ácidos nucléicos compreendendo SEQ ID NO: 3, onde nucleotídeos 769-873 estão substituídos com nucleotídeos 1-105 de SEQ ID NO: 5. Em uma outra realização, o polinucleotídeo codifica SEQ ID NO: 4, onde aminoácidos 257-291 são substituídos com um domínio transmembrana S5 de KCNQ1, preferivelmente o domínio transmembrana S5 representado por aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 6.

Sondas baseadas na seqüência de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usadas para detectarem seqüências transcritas ou genômicas codificando as mesmas proteínas ou proteínas homólogas. Em realizações preferidas, a sonda ainda compreende um grupo rótulo ligado à mesma, por exemplo, o grupo rótulo pode ser um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima, ou um co-fator enzima. Tais sondas podem ser usadas como parte de um kit teste diagnóstico para identificação de células ou tecidos, particularmente o cérebro, músculo de esqueleto, e a bexiga urinária, que expressa erroneamente uma proteína KCNQ5 tipo selvagem, tal como através de medição de um nível de um polinucleotídeo codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma amostra de células a partir de um sujeito, por exemplo, detectando níveis de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou determinando se um gene KCNQ5 tipo selvagem sofreu mutação ou foi suprimido.

Um fragmento de ácido nucléico codificando uma "porção biologicamente ativa de uma proteína KCNQ5(W270L) pode ser preparado através de isolamento de uma porção da seqüência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1, contanto que o fragmento inclua nucleotídeos 808-810 de SEQ ID NO: 1, que codifica um polipeptídeo tendo uma atividade biológica KCNQ5(W270L) (isto é, a geração de correntes seletivas de K^+ de ativação lenta, dependentes de voltagem que são insensíveis para o bloqueador de canal K^+ TEA e mostram uma acentuada retificação interna em voltagens positivas de membrana), expressão de porção codificada da proteína KCNQ5(W270L) (por exemplo, através de expressão recombinante in vitro), e avaliação de atividade da porção codificada da proteína KCNQ5(W270L).

Polinucleotídeos que diferem de SEQ ID NO: 1 devido a degenerescência do código genético, e assim codificam a mesma proteína KCNQ5(W270L) como aquela codificada por SEQ ID NO: 1 são abrangidos pela presente exposição. Da mesma maneira, em uma outra realização, um polinucleotídeo isolado tem uma seqüência de polinucleotídeos codificando uma proteína tendo uma seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2.

Moléculas de ácidos nucleicos correspondendo a variantes alélicas naturais e homólogos das moléculas de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser isoladas, por exemplo, baseado em sua homologia aos polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) aqui mostrados usando os ADNcs aqui mostrados, ou suas porções, como uma sonda de hibridização de acordo com técnicas padrões de hibridização. Por exemplo, um ADN KCNQ5(W270L) pode ser isolado de uma biblioteca de ADN genômico usando toda ou uma porção de SEQ ID NO: 1 como uma sonda de hibridização e técnicas padrões de hibridização (por exemplo, como descrito em Sambrook J. et al., supra). Além disso, um polinucleotídeo abrangendo todo ou uma porção de um gene KCNQ5 pode ser isolado através de reação de cadeia polimerase usando iniciadores oligonucleotídeos desenhados baseado na sequência de SEQ ID NO: 1. Por exemplo, ARNm pode ser isolado de células (por exemplo, através do procedimento de extração com guanidínio - tiocianato de Chirgwin et al., Biochemistry 18: 5294-99 (1979)) e ADNc pode ser preparado usando transcriptase reversa (por exemplo, Moloney MLV reverse transcriptase, disponível de Gibco/BRL, Bethesda, Md.; ou AMV reverse transcriptase, disponível de Seikagaku América, Inc., St. Petersburg, Fla.). Iniciadores oligonucleotídeos sintéticos para amplificação PCR podem ser desenhados baseado na sequência de polinucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1. Um polinucleotídeo pode ser amplificado usando ADNc ou, alternativamente, ADN genômico, como um molde e apropriados iniciadores oligonucleotídeos de acordo com técnicas padrões de amplificação PCR. O polinucleotídeo assim amplificado pode ser clonado em um apropriado vetor e caracterizado através de análises de sequência de ADN. Além disso, oligonucleotídeos correspondendo a uma sequência de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser preparados através de técnicas sintéticas padrões, por exemplo, usando um sintetizador de ADN automatizado.

Em uma outra realização, um polinucleotídeo isolado pode ser identificado baseado em identidade de sequência de nucleotídeos compartilhada usando um algoritmo matemático. Tais algoritmos são esboçados em mais detalhes acima (ver, por exemplo, seção I, infra).

Em uma outra realização, um polinucleotídeo isolado é pelo menos 15, 20, 25, 30 ou mais polinucleotídeos em comprimento e hibridiza sob condições rigorosas para a molécula de ácido nucléico compreendendo a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1 ou seus complementos. Em
5 uma outra realização, o polinucleotídeo é pelo menos 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, ou 600 nucleotídeos em comprimento. Preferivelmente, as condições são tais que seqüências pelo menos 95%, preferivelmente pelo menos cerca de 98%, homólogas umas às outras tipicamente permanecem hibridizadas umas às outras. Preferivelmente, uma
10 molécula de ácido nucléico isolada que hibridiza sob condições rigorosas à seqüência de SEQ ID NO: 1 ou seus complementos corresponde a uma molécula de ácido nucléico ocorrendo naturalmente.

Em uma outra realização, menores mudanças podem ser introduzidas através de mutação em seqüências de polinucleotídeos, por exemplo, de SEQ ID NO: 1, pelo que conduzindo a mudanças na seqüência de
15 aminoácido da proteína codificada, sem alteração de atividade funcional de uma proteína KCNQ5(W270L). Por exemplo, substituições de nucleotídeos conduzindo a substituições de aminoácidos em resíduos de aminoácidos "não-essenciais" podem ser feitas na seqüência de SEQ ID NO: 1. Um resí-
20 duo de aminoácido "não-essencial" é um resíduo que pode ser alterado da seqüência de um polinucleotídeo KCNQ5(W270L) (por exemplo, a seqüência de SEQ ID NO: 1) sem alteração der atividade funcional de uma molécula de KCNQ5(W270L). Resíduos exemplares que são não-essenciais e, por isso, suscetíveis a substituição podem ser identificados por aqueles versados na
25 técnica através de realização de um alinhamento de aminoácidos de moléculas relacionadas com KCNQ5(W270L) e determinando resíduos que não são conservados. Tais resíduos, devido não terem sido conservados, são mais provavelmente suscetíveis a substituição.

Da mesma maneira, um outro aspecto pertence a polinucleotí-
30 deos codificando proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que contêm mudanças em resíduos de aminoácidos que não são essenciais para uma atividade KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Tais proteínas KCNQ5(W270L), por exemplo,

diferem em seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ainda retendo uma inerente atividade KCNQ5(W270L). Um polinucleotídeo isolado codificando uma variante não-natural de, por exemplo, uma proteína KCNQ5(W270L) pode ser criado através de introdução de uma ou mais substituições, adições ou supressões de nucleotídeos na seqüência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 de modo que uma ou mais substituições, adições ou supressões de aminoácidos são introduzidas na proteína codificada, contanto que uma substituição em nucleotídeos 808-810 seja para um códon que produza uma substituição conservativa para o aminoácido leucina. Mutações podem ser introduzidas em SEQ ID NO: 1 através de técnicas padrões, como mutagênese direcionada a sítio e mutagênese mediada por PCR. Preferivelmente, substituições conservativas de aminoácidos são feitas em um ou mais resíduos de aminoácidos não-essenciais. Uma "substituição conservativa de aminoácido" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não-carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenil alanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta - ramificadas (por exemplo, troenina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenil alanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácido não-essencial em um polipeptídeo KCNQ5(W270L) é preferivelmente substituído com um outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral.

Alternativamente, em uma outra realização, mutações podem ser introduzidas randomicamente ao longo de toda ou parte de uma seqüência codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), tal como através de mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser selecionados, por exemplo, por sua habilidade para ativar transcrição ou para identificar mu-

tantes que retêm atividade funcional. Seguindo mutagênese, a proteína mutante KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser expressa recombinantemente em uma célula hospedeira e a atividade funcional da proteína mutante pode ser determinada usando ensaios disponíveis na técnica para avaliação de atividade KCNQ5. Os ensaios incluem, mas não são limitados a, gravação de

5 célula integral de grampo remendo usando células mamíferas como hospedeiros ou grampeamento de voltagem de dois eletrodos usando oócitos de *Xenopus laevis* como hospedeiros.

Ainda um outro aspecto pertence a polinucleotídeos isolados codificando proteínas de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Tais polinucleotídeos, compreendendo pelo menos uma primeira seqüência de polinucleotídeos codificando proteína, polipeptídeo ou peptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de inteiro comprimento tendo atividade KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ligado operavelmente a uma segunda seqüência de polinucleotídeo codificando uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo não-KCNQ5 ou

10 não-KCNQ5(W270L) podem ser preparados através de técnicas padrões de ADN recombinante.

Em uma realização preferida, uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser ensaiada para a habilidade para codificar canais de íons funcionais usando processos eletrofisiológicos como descrito acima, por exemplo, gravação de célula integral de grampo de remendo usando células mamíferas como hospedeiros ou grampeamento de voltagem de dois eletrodos usando oócitos de *Xenopus laevis* como hospedeiros. Em um aspecto, o polipeptídeo KCNQ5 contém um domínio transmembrana S5-S6 de

15 KCNQ1. Em um outro aspecto, o polipeptídeo KCNQ5 contém um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

Em adição aos polinucleotídeos codificando proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) descritos acima, um outro aspecto pertence a polinucleotídeos isolados que são anti - sentido. Um ácido nucléico "anti-sentido" compreende uma seqüência de nucleotídeos que é complementar a um ácido nucléico "sentido" codificando uma proteína, por exemplo, complementar à fita codificando de uma molécula de ADNc de fita dupla ou complementar a

20

25

30

uma seqüência de ARNm. Da mesma maneira, um ácido nucléico anti-sentido pode ligar com hidrogênio a um ácido nucléico sentido. O ácido nucléico anti-sentido pode ser complementar a uma inteira fita codificante KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou somente a uma sua porção. Em uma reali-

5 zação, uma molécula de ácido nucléico anti - sentido é anti-sentido para uma "região codificante" da fita codificante de uma seqüência de nucleotídeos codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). O termo "região codificante" refere-se à região da seqüência de nucleotídeos compreendendo códonos que são traduzidos em resíduos de aminoácidos. O termo "região não-codificante"

10 refere-se a seqüências 5' e 3' que flanqueiam a região codificante que não são traduzidas em aminoácidos (isto é, também referidas como regiões não-traduzidas 5' e 3').

Dadas as seqüências de fita codificantes codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) aqui mostradas, ácidos nucléicos anti-sentido podem ser

15 desenhados de acordo com as regras de emparelhamento de bases de Watson e Crick. O polinucleotídeo anti - sentido pode ser complementar para a inteira região codificante de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), mas mais preferivelmente é um oligonucleotídeo que é anti - sentido para somente uma porção da região cidificante ou não-codificante de ARNM de KCNQ5 ou

20 KCNQ5(W270L). Por exemplo, o oligonucleotídeo anti-sentido pode ser complementar para a região circundando o sítio de partida de tradução de ARNm KCNQ5(W270L). Um oligonucleotídeo anti - sentido pode ser, por exemplo, de cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 nucleotídeos em comprimento. Um polinucleotídeo anti - sentido pode ser construído usando

25 síntese química e reações de ligação enzimática usando procedimentos conhecidos na técnica. Por exemplo, um ácido nucléico anti - sentido (por exemplo, um oligonucleotídeo anti-sentido) pode ser quimicamente sintetizado usando nucleotídeos ocorrendo naturalmente ou nucleotídeos variadamente modificados desenhados para aumento de estabilidade biológica das molé-

30 culas ou para aumento de estabilidade física do duplex formado entre os ácidos nucléicos anti - sentido e sentido, por exemplo, derivados de fósforo-tioato e nucleotídeos substituídos com acridina podem ser usados. Exemplos

- de nucleotídeos modificados que podem ser usados para geração de ácido nucléico anti - sentido incluem 5-flúor uracila, 5-bromo uracila, 5-cloro uracila, 5-iodo uracila, hipoxantina, xantina, 4-acetil citoxina, 5-(carboxi hidroxil metil) uracila, 5-carboxi metil amino metil-2-tio uridina, 5-carboxi metil amino metil uracila, diidro uracila, beta-D-galactosil queosina, inosina, N6-isopentenil adenina, 1-metil guanina, 1-metil inosina, 2,2-dimetil guanina, 2-metil adenina, 2-metil guanina, 3-metil citosina, 5-metil citosina, N6-adenina, 7-metil guanina, 5-metil amino metil uracila, 5-metoxi amino metil-2-tio uracila, beta-D-manosil queosina, 5'-metoxi carboxi metil uracila, 5-metoxi uracila, 2-metil tio-N6-isopentenil adenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudo uracila, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tio uracila, 2-tio uracila, 4-tio uracila, 5-metil uracila, metil éster de ácido uracil-5-oxi acético, ácido uracil-5-oxi acético (v), 5-metil-2-tio uracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxi propil) uracila, (acp3)w, e 2,6-diamino purina. Alternativamente, o ácido nucléico anti - sentido pode ser produzido biologicamente usando um vetor de expressão no qual um ácido nucléico foi subclonado em uma orientação anti - sentido (isto é, ARN transcrito do ácido nucléico inserido será de uma orientação anti- sentido para um ácido nucléico alvo de interesse, ainda descrito na sub-seção seguinte).
- Os polinucleotídeos anti - sentido são tipicamente administrados a um sujeito ou gerados in situ de modo que eles hibridizam com ou ligam-se a ARNm celular e/ou ADN genômico codificando uma proteína KCNQ% ou KCNQ5(W270L) para pelo que inibir expressão da proteína , por exemplo, através de inibição de transcrição e/ou tradução. A hibridização pode ser através de complementaridade de nucleotídeo convencional para formar um duplex estável, ou, por exemplo, no caso de um polinucleotídeo anti - sentido que se liga a duplexes ADN, através de específicas interações na ranhura principal da hélice duplex. Um exemplo de uma rota de administração de polinucleotídeos anti - sentido inclui injeção direta em um sítio de tecido. Alternativamente, polinucleotídeos anti - sentido podem ser modificados para alvejar células selecionadas e então administrados sistemicamente. Por exemplo, para administração sistêmica, moléculas anti - sentido podem ser

modificadas de modo que elas liguem-se especificamente a receptores ou antígenos expressos sobre uma superfície de célula selecionada, por exemplo, através de ligação de polinucleotídeos anti - sentido a peptídeos ou anticorpos que se ligam a receptores ou antígenos de superfície de célula. Os polinucleotídeos anti - sentido também podem ser liberados para células usando os vetores aqui descritos. Para obter suficientes concentrações intracelulares das moléculas anti - sentido, construções de vetores nas quais o polinucleotídeo anti - sentido é colocado sob o controle de um promotor pol II ou pol III forte são preferidas.

- 10 Ainda em uma outra realização, o polinucleotídeo anti - sentido é uma molécula de ácido nucléico alfa-anomérica. Uma molécula de ácido nucléico alfa-anomérica forma específicos híbridos de fita dupla com ARN complementar onde, contrário às usuais unidades - beta, as fitas correm paralelas uma à outra (Gaultier C et al., *Nucleic Acids Res.* 15:6625-41 (1987)).
- 15 A molécula de ácido nucléico anti - sentido também pode compreender um 2'-o-metil ribonucleotídeo (Inoue H et al., *Nucleic Acids Res.* 15:61-3148 (1987)), ou um análogo ARN - ADN quimérico (Inoue H et al., *FEBS Lett.* 215:327-30 (1987)).

- 20 Ainda em uma outra realização, um polinucleotídeo anti - sentido é uma ribozima. Ribozimas são moléculas de ARN catalíticas com atividade ribonuclease que são capazes de clivar um ácido nucléico de fita simples, tal como um ARN, para o qual elas têm uma região complementar. Assim, ribozimas (por exemplo, ribozimas cabeça de martelo (descritas em Haselhoff J e Gerlach WL, *Nature* 334:585-91 (1988))) podem ser usadas para clivagem catalítica de transcritos de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para pelo que
- 25 inibir tradução de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Uma ribozima tendo especificidade para um ácido nucléico codificando KCNQ5(W270L) pode ser desenhada baseado na seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1. Por exemplo, um derivado de um ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS pode ser cons-
- 30 truído no qual a seqüência de nucleotídeos do sítio ativo é complementar à seqüência de nucleotídeos a ser clivada em um ARNm codificando KCNQ5(W270L) (ver, por exemplo, patentes US 4 987 071 e 5 116 742).

Alternativamente, ARNm KCNQ5(W270L) pode ser usado para selecionar um ARN catalítico tendo uma específica atividade ribonuclease a partir de uma reunião de moléculas de ARN (ver, por exemplo, Bartel D and Szostak JW, Science 261:1411-18 (1993)).

- 5 Alternativamente, expressão de gene pode ser inibida alvejando seqüências de nucleotídeos complementares para uma região reguladora de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, promotor e/ou aperfeiçoadores KCNQ5(W270L) para formar estruturas de hélice tripla para prevenir trans-
10 crição de um gene KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em células alvos (ver genericamente, Helene C, Anticancer Drug Des. 6:569-84 (1991); Helene C et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36 (1992); Maher LJ, Bioassays 14:807-15 (1992)).

- Ainda em uma outra realização, os polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser modificados na metade base, metade açúcar, ou
15 cadeia principal fosfato para aperfeiçoar, por exemplo, a estabilidade, hibridização, ou solubilidade da molécula. Por exemplo, a cadeia principal fosfato desoxirribose dos polinucleotídeos pode ser modificada para gerar ácidos nucleicos peptídeos (ver Hyrup B et al., Bioorg. Med. Chem. 4:5-23 (1996)). Como aqui usados, os termos "ácidos nucleicos peptídeos" e "PNAs" refe-
20 rem-se a imitações de ácidos nucleicos, por exemplo, imitações de ADN, nas quais a cadeia principal fosfato desoxirribose é substituída por uma cadeia principal pseudo-peptídeo e somente as quatro nucleobases naturais são retidas. A cadeia principal neutra de PNAs foi mostrada permitir específica hibridização para ADN e Arn sob condições de baixa resistência iônica. A
25 síntese de oligômeros PNA pode ser realizada usando protocolos de síntese de peptídeo de fase sólida padrão como descrito em Hyrup B et al., supra; Perry-O'Keefe H et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670-75 (1996).

- PNAs de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usados em aplicações terapêuticas e diagnósticas. Por exemplo, PNAs
30 podem ser usados como agentes anti - sentido ou anti - gene para modulação específica de seqüência de expressão de gene através de, por exemplo, indução de impedimento de transcrição ou tradução ou inibição de replica-

ção. PNAs de moléculas de ácido nucléico também podem ser usados na análise de mutações de par de base simples em um gene (por exemplo, através de grampeamento de PCR direcionada por PNA), como "enzimas de restrição artificiais" quando usados em combinação com outras enzimas (por exemplo, S1 nucleases (Hyrup B et al., supra), ou como sondas ou iniciadores para seqüenciamento ou hibridização de ADN (Hyrup B et al., supra; Perry-O'Keefe H et al, supra).

Em uma outra realização, polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser modificados (por exemplo, para aperfeiçoamento de sua estabilidade ou tomada celular) através de ligação de grupos lipofílicos ou outros auxiliares a PNA, através de formação de quimeras PNA-ADN, ou através do uso de lipossomas ou outras técnicas conhecidas de liberação de droga. Por exemplo, quimeras PNA-ADN de polinucleotídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser geradas as quais podem combinar as vantajosas propriedades de PNA e ADN. Tais quimeras permitem que enzimas de reconhecimento de ADN (por exemplo, RNase H e ADN polimerases) interajam com a porção ADN enquanto a porção PNA pode prover alta afinidade de ligação e especificidade. Quimeras de PNA-ADN podem ser ligadas usando ligadores de apropriados comprimentos selecionados em termos de empilhamento de bases, número de ligações entre as núcleobases, e orientação (Hyrup B et al., supra). A síntese de quimeras de PNA-ADN pode ser realizada como descrito em Hyrup B et al., supra, e Finn PJ et al., *Nucleic Acids Res.* 24:3357-63 (1996). Por exemplo, uma cadeia ADN pode ser sintetizada sobre um suporte sólido usando química de acoplamento de fosforamidito padrão e análogos de nucleosídeos modificados, por exemplo, 5'-(4-metoxi tritil) amino-5'-desoxi timidina fosforamidito, pode ser usado como um entre PNA e a extremidade 5' de ADN (Mag M et al., *Nucleic Acids Res.* 17:5973-88 (1989)). Monômeros PNA são então acoplados em uma maneira em etapas para produção de uma molécula quimérica com um segmento 5' PNA e um segmento 3' ADN (Finn PJ et al., supra). Alternativamente, moléculas quiméricas podem ser sintetizadas com um segmento ADN 5' e um segmento PNA 3' (Petersen KH et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*

5:1119-24 (1995)).

Em outras realizações, o oligonucleotídeo pode incluir outros grupos apostos tais como peptídeos (por exemplo, para alvejar receptores de célula hospedeira *in vivo*), ou agentes facilitando o transporte através de membrana de célula (ver, por exemplo, Letsinger RL *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-56 (1989); Lemaitre M *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-52 (1987); PCT Publication No. WO88/09810) ou a barreira sangue - cérebro (ver, por exemplo, PCT Publication No. WO89/10134). Em adição, oligonucleotídeos podem ser modificados com agentes de clivagem disparados por hibridização (ver, por exemplo, van der Krol AR *et al.*, Biotechniques 6:958-76 (1988)) ou agentes intercalantes (ver, por exemplo, Zon G, Pharm. Res. 5:539-49 (1988)). Para este fim, o oligonucleotídeo pode ser conjugado a uma outra molécula (por exemplo, um peptídeo, agente de reticulação disparado com hibridização, agente de transporte, ou agente de clivagem disparado com hibridização).

Em uma realização, expressão de polinucleotídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser inibida através de ARNs interferentes curtos (siRNA). O siRNA pode ser dsRNA tendo 19-25 nucleotídeos. siRNAs podem ser produzidos endogenamente através de degradação de moléculas de dsRNA maiores por uma nuclease relacionada a RNase III chamada Dicer. SiRNAs também podem ser introduzidos em uma célula exogenamente, ou através de transcrição de uma construção de expressão. Uma vez formado, os siRNAs montam com componentes de proteína em complexos contendo endoribonucleases conhecidos como complexos de silêncio induzido por ARN (RISCs). Desenrolamento gerado por ATP do siRNA ativa os RISCs, que por sua vez alvejam o transcrito ARNm complementar através de emparelhamento de bases de Watson-Crick, pelo que clivando e destruindo o ARNm. Clivagem do ARNm ocorre próximo do meio da região ligada pela fita de siRNA. Esta degradação de ARNm específica de sequência resulta em silenciamento de gene.

Pelo menos duas maneiras podem ser empregadas para obtenção de silenciamento de gene mediado por siRNA. Primeiro, siRNAs podem

ser sintetizados in vitro e introduzidos em células para suprimirem transientemente a expressão de gene. siRNAs sintéticos proporcionam uma maneira fácil e eficiente para obtenção de ARNi. SiRNA são duplexes de oligonucleotídeos mistos, curtos que podem incluir, por exemplo, 19 nucleotídeos ARNs com projeções 3' de dinucleotídeo simétricos. Usando duplexes de siRNA de 21 pb sintéticos (por exemplo, 19 bases ARN seguido por uma projeção 3' UU ou dTdT), silenciamento de gene específico de sequência pode ser obtido em células mamíferas. Estes siRNAs podem especificamente suprimir alvejada tradução de gene em células mamíferas sem ativação de proteína cinase dependente de ADN (PKR) através de ARNs de fita dupla mais longos (dsRNA), que pode resultar em repressão não-específica de tradução de muitas proteínas.

Segundo, siRNAs podem ser expressos in vivo a partir de vetores. Esta abordagem pode ser usada para expressar estavelmente siRNAs em células ou animais transgênicos. Em uma realização, vetores de expressão de siRNA são engenheirados para dirigirem transcrição de siRNA a partir de unidades de transcrição polimerase III (pol III). Unidades de transcrição Pol III são apropriadas para expressão de siRNA grampo porque elas dispõem de um sítio de terminação de transcrição rico em AT curto que conduz à adição de 2 pb de projeções (por exemplo, UU) para siRNAs grampos - uma característica que é útil para função de siRNA. Os vetores de expressão Pol III também podem ser usados para criação de camundongo transgênico que expressa siRNA.

Em uma outra realização, siRNAs podem ser expressos em uma maneira específica de tecido. Sob esta abordagem, longos dsRNAs são primeiro expressos a partir de um promotor (tal como CMV (pol II)) nos núcleos de selecionadas linhas de células ou camundongos transgênicos. Os longos dsRNAs são processados em siRNAs nos núcleos (por exemplo, por Dicer). Os siRNAs deixam os núcleos e mediam silenciamento específico de gene. Uma abordagem similar pode ser usada em conjunção com promotores específicos de tecido (pol II) para criação de camundongo nocaute específico de tecido.

Qualquer projeção de dinucleotídeo 3', tal como UU, pode ser usada para desenho de siRNA. Em alguns casos, resíduos G na projeção são evitados devido ao potencial para o siRNA ser clivado por RNase em resíduos G de fita simples.

- 5 Com relação à própria sequência de siRNA, foi verificado que siRNAs com teor GC de 30-50% podem ser mais ativos que aqueles com um maior teor G/C em certos casos. Além disso, uma vez que um trato poli(T) de 4-6 nucleotídeos pode atuar como um sinal de terminação para pol III ARN, estiramentos de >4 Ts ou As na sequência alvo podem ser evitados
- 10 em certos casos quando desenhando seqüências a serem expressas a partir de um promotor pol III ARN. Em adição, algumas regiões de ARNm podem ser altamente estruturadas ou ligadas por proteínas reguladoras. Assim, pode ser útil selecionar sítios alvos de siRNA em diferentes posições ao longo do comprimento da seqüência de gene. Finalmente, os potenciais sítios alvos
- 15 podem ser comparados à apropriada base de dados de genoma (humano, camundongo, rato, etc.). Quaisquer seqüências alvos com mais que 16-17 pares de bases contíguos de homologia a outras seqüências codificantes podem ser eliminadas de consideração em certos casos.

- Em uma realização, siRNA pode ser desenhado para ter duas
- 20 repetições invertidas separadas por uma seqüência espaçadora curta e termina com uma corda de Ts que serve como um sítio de terminação de transcrição. Este desenho produz um transcrito ARN que é previsto dobrar em um siRNA grampo curto. A seleção de seqüência alvo de siRNA, o comprimento das repetições invertidas que codificam a haste de um grampo putativo, a ordem das repetições invertidas, o comprimento e composição da
- 25 seqüência espaçadora que codifica o laço do grampo, e a presença ou ausência de projeções-5', podem variar para obtenção de desejáveis resultados.

- Os alvos siRNA podem ser selecionados através de exploração
- 30 de uma seqüência de ARNm para dinucleotídeos AA e gravando os 19 nucleotídeos imediatamente à jusante do AA. Outros processos também podem ser usados para seleção de alvos siRNA. Em um exemplo, a seleção da

seqüência alvo siRNA é puramente empiricamente determinada (ver, por exemplo, Sui G et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515-20 (2002)), tanto quanto a seqüência alvo comece com GG e não compartilhe significativa homologia de seqüência com outros genes como analisado por busca BLAST. Em um outro exemplo, um processo mais elaborado é empregado para selecionar as seqüências alvos siRNA. Este procedimento explora uma observação que qualquer sítio acessível em ARNm endógeno pode ser alvo para degradação através do processo de oligodesoxirribonucleotídeo sintético / RNase H (ver, por exemplo, Lee NS et al., Nature Biotechnol. 20:500-05 (2002)).

Em uma outra realização, o cassete de expressão de siRNA é construído para conter a fita sentido do alvo, seguida por um espaçador curto, a fita anti-sentido do alvo, e 5-6 Ts como terminador de transcrição. A ordem das fitas sentido e anti-sentido dentro das construções de expressão de siRNA pode ser alterada sem afetar as atividades de silenciamento de gene do siRNA grampo. Em certos exemplos, a reversão da ordem pode causar redução parcial em atividades de silenciamento de gene.

O comprimento da seqüência de nucleotídeos sendo usada como a haste de cassete de expressão de siRNA pode variar, por exemplo, de 19 a 29. O tamanho de laço pode variar de 3 a 23 nucleotídeos. Outros comprimentos e/ou tamanhos de laços também podem ser usados.

Ainda em uma outra realização, uma projeção 5' na construção de siRNA grampo pode ser usada, contanto que o siRNA grampo seja funcional em silenciamento de gene. Em um exemplo específico, a projeção 5' inclui cerca de 6 resíduos de nucleotídeos.

Ainda em uma outra realização, a seqüência alvo para ARNi é um fragmento de seqüência de 21-meros de SEQ ID NO: 1, preferivelmente incluindo nucleotídeos 808-810 de SEQ ID NO: 1. A extremidade 5' da seqüência alvo tem dinucleotídeo "NA", onde "N" pode ser qualquer base e "A" representa adenina. A restante seqüência de 19-meros tem um teor GC de entre 35% e 55%. Em adição, a restante seqüência de 19-meros não inclui qualquer quatro consecutivas A ou T (isto é, AAAA ou TTTT), três consecuti-

vas G ou C (isto é, GGG ou CCC), ou sete "GC" em uma fila.

Adicionais critérios também podem ser usados para seleção de seqüências alvos ARNi. Por exemplo, o teor GC da restante seqüência de 19 meros pode ser limitado para entre 45% e 55%. Além disso, qualquer seqüência de 19 meros tendo três bases idênticas consecutivas (isto é, GGG, CCC, TTT, ou AAA) ou uma seqüência palíndromo com 5 ou mais bases é excluída. Além disso, a seqüência de 19 meros restante pode ser selecionada para ter baixa homologia de seqüência a outros genes. Em um exemplo específico, potenciais seqüências alvos são buscadas por BLASTN contra base de dados de seqüência cacho UniGene humana de NCBI. A base de dados UniGene humana contém conjuntos não-redundantes de cachos orientados de gene. Cada cacho UniGene inclui seqüências que representam um único gene. Seqüências de 19 meros não produzindo acerto para outros genes humanos sob a busca BLASTN podem ser selecionadas. Durante a busca, o valor-e pode ser fixado em um valor rigoroso (tal como "1").

A eficácia das seqüências de siRNA, assim como qualquer outra seqüência de RNAi derivada, pode ser avaliada usando-se vários processos conhecidos na técnica. Por exemplo, uma seqüência de siRNA pode ser introduzida em uma célula que expressa KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). O nível de ARNm ou polipeptídeo de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na célula pode ser detectado. Uma mudança substancial no nível de expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) antes e após a introdução da seqüência de siRNA é indicativa da eficácia da seqüência de siRNA na supressão de expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). em um exemplo específico, os níveis de expressão de outros genes também são monitorados antes e após a introdução da seqüência de siRNA. Uma seqüência de siRNA que tem efeito inibidor sobre expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) mas não afeta significativamente a expressão de outros genes pode ser selecionada. Em um outro exemplo específico, múltiplos siARN ou outras seqüências de ARNi podem ser introduzidas na mesma célula alvo. Estas seqüências de siRNA ou RNAi inibem especificamente expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) mas não a expressão de outros genes. Ainda em um outro exemplo específico,

seqüências de siRNA ou outras de RNAi que inibem a expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e outro gene ou genes podem ser usadas.

Polinucleotídeos anti - sentido podem ser produzidos a partir de um cassete de expressão heterólogo em uma célula transfectante ou célula transgênica. Alternativamente, os polinucleotídeos anti - sentido podem compreender oligonucleotídeos solúveis que são administrados ao meio externo, tanto no meio de cultura in vitro como no sistema circulatório ou em fluido intersticial in vivo. Polinucleotídeos anti - sentido solúveis presentes no meio externo foram mostrados ganharem acesso ao citoplasma e inibirem tradução de específicas espécies de ARNm.

III. Proteínas, Seus Fragmentos KCNQ5 e KCNQ5(W270L) e Anticorpos anti-KCNQ5 e anti-KCNQ5(W270L)

Um outro aspecto pertence a proteínas KCNQ5 e KCNQ5(W270L), e suas porções biologicamente ativas, assim como fragmentos de polipeptídeos apropriados para uso como imunógenos para elevar anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L). Em uma realização, proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser isoladas de fontes de células ou tecidos através de um apropriado esquema de purificação usando técnicas padrões de purificação de proteína. Em uma outra realização, proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) são produzidas através de técnicas de ADN recombinante. Em alternativa a expressão recombinante, um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser sintetizado quimicamente usando técnicas padrões de síntese de peptídeo. Será entendido que na discussão de usos de proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), por exemplo, como mostrado em SEQ ID NO: 2, que fragmentos de tais proteínas que são polipeptídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de comprimento não-inteiro assim como proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de inteiro comprimento podem ser usadas.

Um outro aspecto pertence a proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) isoladas. Preferivelmente, as proteínas KCNQ5(W270L) compreendem a seqüência de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1 ou uma sua porção. Em uma outra realização preferida, a proteína compreende

a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua porção. Em outras realizações, a proteína tem pelo menos 90%, mais preferivelmente 95%, e mesmo mais preferivelmente 98% de identidade de aminoácidos, com a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2 ou uma sua porção, contanto que uma substituição em aminoácido 270 não reestabeleça sensibilidade de retigabina para o polipeptídeo KCNQ5. Porções preferidas de moléculas de polipeptídeo KCNQ5(W270L) são biologicamente ativas, por exemplo, uma porção do polipeptídeo KCNQ5(W270L) tendo a habilidade de codificar canais de íons seletivos de potássio funcionais em um sistema hospedeiro, por exemplo, linhas de células mamíferas ou oócitos de *Xenopus laevis*.

Porções biologicamente ativas de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) incluem peptídeos compreendendo seqüências de aminoácidos suficientemente homólogas a ou derivadas da seqüência de aminoácidos da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), que inclui menos aminoácidos que as proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de inteiro comprimento, e exibem pelo menos uma atividade de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Um aspecto é para polipeptídeos KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1 no lugar do domínio transmembrana tipo selvagem de KCNQ5. Preferivelmente, o domínio transmembrana S5-S6 é de KICNQ1 humano. Em uma realização, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo KCNQ5 compreende SEQ ID NO: 4 com aminoácidos 257-354 substituídos com o domínio transmembrana de S5-S6 de KCNQ1. Preferivelmente, aminoácidos 257-354 de SEQ ID NO: 4 são substituídos com SEQ ID NO: 6.

Um outro aspecto é para polipeptídeos KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1 no lugar do domínio transmembrana tipo selvagem de KCNQ5. Preferivelmente, o domínio transmembrana S5 é de KCNQ1 humano. Em uma realização, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo KCNQ5 compreende SEQ ID NO: 4 com aminoácidos 257-291 substituídos com o domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Preferivelmente,

aminoácidos 257-291 de SEQ ID NO: 4 são substituídos com 1-35 SEQ ID NO: 6.

Também são providas proteínas de fusão ou quiméricas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Por exemplo, em uma realização, a proteína de fusão é uma proteína de fusão membro GST-KCNQ5(W270L) onde as seqüências de membro KCNQ5(W270L) são fundidas ao terminus-C das seqüências GST. Em uma outra realização, a proteína de fusão é uma proteína de fusão KCNQ5(W270L)-HÁ onde a seqüência de nucleotídeos membro KCNQ5(W270L) é inserida em um vetor tal como vetor pCEP4-HÁ (Herrschel RF et al., Genes Dev. 9:3067-82 (1995)) de modo que as seqüências membros KCNQ5(W270L) estão fundidas em estrutura a uma etiqueta epítopo hemaglutinina de influenza. Tais proteínas de fusão podem facilitar a purificação de um membro KCNQ5(W270L) recombinante.

Proteínas e peptídeos de fusão produzidos através de técnicas recombinantes podem ser secretados e isolados de uma mistura de células e meio contendo a proteína ou peptídeo. Alternativamente, a proteína ou peptídeo pode ser retido citoplasmicamente e as células colhidas, lisadas, e a proteína isolada. A cultura de célula tipicamente inclui células hospedeiras, meios e outros subprodutos. Meios apropriados para cultura de células são conhecidos na técnica. Proteína e peptídeos podem ser isolados dos meios de cultura de células, células hospedeiras, ou ambas usando técnicas conhecidas para purificação de proteínas e peptídeos. Técnicas para transfecção de células hospedeiras e purificação de proteínas e peptídeos são conhecidas.

Preferivelmente, uma proteína de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é produzida através de técnicas de ADN recombinante padrão. Por exemplo, fragmentos de ADN codificando diferentes seqüências de polipeptídeos são ligados em estrutura de acordo com técnicas padrões, por exemplo, empregando termini embotados ou terminados alternados ára ligação, digestão com enzima de restrição para prover apropriados termini, enchimento de extremidades coesivas quando apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar indesejável ligação, e ligação enzimática. Em uma

outra realização, o gene de fusão pode ser sintetizado através de técnicas padrões incluindo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, amplificação com PCR de fragmentos de genes pode ser realizada usando iniciadores âncoras que originam projeções complementares entre dois
5 fragmentos de gene consecutivos que subseqüentemente podem ser anelados e reamplificados para geração de uma seqüência de gene quimérico (ver, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Além disso, muitos vetores de expressão são comercialmente disponíveis que já codificam uma metade de fusão (por e-
10 xemplo, um polipeptídeo GST ou um rótulo epítipo HÁ). Um ácido nucléico codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser clonado em um tal vetor de expressão de modo que a metade de fusão é ligada em estrutura a proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Em uma outra realização, a proteína de fusão é uma proteína
15 KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) contendo uma seqüência sinal heteróloga em seu terminus-N. Em certas células hospedeiras (por exemplo, células hospedeiras mamíferas), expressão e/ou secreção de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser aumentada através do uso de uma seqüência sinal heteróloga. As proteínas de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem
20 ser incorporadas em composições farmacêuticas e administradas a um sujeito in vivo. Uso de proteínas de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser terapeuticamente útil para o tratamento de distúrbios, por exemplo, condições relacionadas a incontinência urinária ou dor neuropática. Além disso, as proteínas de fusão KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usadas como
25 imunógenos para produção de anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) em um sujeito.

Como aqui providos são canais de potássio funcionais onde pelo menos uma das subunidades do canal funcional é uma proteína ou polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) como aqui descrito. Canais KCNQ são
30 conhecidos formarem homodímeros, heterodímeros, homotetrâmeros, e heterotetrâmeros. Por exemplo, uma proteína KCNQ5(W270L) pode formar um homodímero com si própria, um heterodímero com uma proteína KCNQ5 de

outras espécies, um heterodímero com uma variante de proteína KCNQ5(W270L), um heterodímero com KCNQ3, um homotetrâmero com 3 subunidades KCNQ5(W270L) idênticas, um heterotetrâmero com pelo menos uma subunidade KCNQ5 diferente, ou um heterotetrâmero com pelo menos uma proteína KCNQ diferente, por exemplo, KCNQ3.

Um outro aspecto pertence a variantes das proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que funcionam tanto como agonistas (miméticos) de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou como antagonistas de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Variantes das proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser geradas por mutagênese, por exemplo, mutação ou truncação de ponto discreta de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Um agonista das proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode reter substancialmente as mesmas, ou um subconjunto das, atividades biológicas da forma ocorrendo naturalmente de uma proteína KCNQ5. Um antagonista de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode inibir uma ou mais das atividades da forma ocorrendo naturalmente da proteína KCNQ5 através de, por exemplo, modulação competitiva de uma atividade celular de uma proteína KCNQ5 tipo selvagem. Assim, específicos efeitos biológicos podem ser elicitados através de tratamento com uma variante de função limitada. Em uma realização, tratamento de um sujeito com uma variante tendo um subconjunto das atividades biológicas da forma ocorrendo naturalmente da proteína tem menos efeitos colaterais em um sujeito em relação a tratamento com a forma ocorrendo naturalmente da proteína KCNQ5.

Uma realização pertence a derivados de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que podem ser formados através de modificação de pelo menos um resíduo de aminoácido de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) por oxidação, redução, ou outros processos de derivação conhecidos na técnica.

Em uma realização, variantes de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que funcionam como agonistas (miméticos) de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou como antagonistas de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser identificadas através de seleção de bibliotecas combinatoriais de mutantes, por exemplo, mutantes de truncação, de uma proteína KCNQ5 ou

KCNQ5(W270L) ou para atividade agonista ou antagonista de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). O polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1. Alternativamente, o polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Em uma realização, 5 uma variada biblioteca de variantes KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é gerada através de mutagênese combinatorial no nível de ácido nucléico e é codificada por uma variada biblioteca de genes. Uma variada biblioteca de variantes de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser produzida através de, por exemplo, ligação enzimática de uma mistura de oligonucleotídeos sintéticos 10 em seqüências de genes de modo que um conjunto degenerado de potenciais seqüências KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) seja expressável como polipeptídeos individuais, ou alternativamente, como um conjunto de maiores proteínas de fusão (por exemplo, para mostra de fago) contendo ali o conjunto de seqüências de KCNQ5 o KCNQ5(W270L).

15 Existe uma variedade de processo que podem ser usados para a produção de bibliotecas de potenciais variantes KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) a partir de uma seqüência de oligonucleotídeos degenerada. Síntese química de uma seqüência de gene degenerada pode ser realizada em um sintetizador de ADN automatizado, e o gene sintético então ligado em um apropriado vetor de expressão. Uso de um conjunto degenerado de genes permite 20 provisão, em uma mistura, de todas as seqüências codificando o desejado conjunto de potenciais seqüências KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Processos para síntese de oligonucleotídeos degenerados são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Narang AS, Tetrahedron 39:3-22 (1983); Itakura K et al., Annu. Ver. Biochem. 53:323-56 (1984); Itakura K et al., Science 198:1056-63 25 (1977); Ike Y et al., Nucleic Acids Res. 11:477-88 (1983)).

Em adição, bibliotecas de fragmentos de uma seqüência codificando proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usados para geração de uma variada população de fragmentos de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) 30 para separação e subsequente seleção de variantes uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Em uma realização, uma biblioteca de fragmentos de seqüências codificantes pode ser gerada através de tratamento de um frag-

mento de PCR de fita dupla de uma seqüência codificando KCMQ5 ou KCNQ5(W270L) com uma nuclease sob condições onde ocorra entalhe somente cerca de uma vez por molécula, desnaturação de ADN de fita dupla, renaturação de ADN para formar ADN de fita dupla que pode incluir pares
5 sentido / anti-sentido de diferentes produtos entalhados, remoção de porções de fita simples de duplexes reformados através de tratamento com SI nuclease, e ligação de resultante biblioteca de fragmentos em um vetor de expressão. Através deste processo, uma biblioteca de expressão pode ser derivada que codifica fragmentos internos e terminais-C e terminais-N de
10 vários tamanhos da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Várias técnicas são conhecidas para separação de produtos genes de bibliotecas combinatoriais feita por mutações de ponto ou truncação, e para separação de bibliotecas de ADNc para produtos gene tendo uma propriedade selecionada. Tais técnicas são adaptáveis para rápida separação
15 das bibliotecas de genes através de mutagênese combinatorial de proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). As técnicas mais amplamente usadas, que são suscetíveis a análises de alta produtividade, para separação de grandes bibliotecas de genes tipicamente incluem clonagem de biblioteca de genes em vetores de expressão replicáveis, transformação de células apropriadas
20 com a resultante biblioteca de vetores, e expressão de genes combinatoriais sob condições nas quais detecção de uma desejada atividade facilita isolamento do vetor codificando o gene cujo produto foi detectado. Mutagênese de montagem recursiva (REM), uma técnica que aperfeiçoa a frequência de mutantes funcionais nas bibliotecas, pode ser usada em combinação com os
25 ensaios de separação para identificação de variantes de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (Arkin AP and Youvan DC, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-15 (1992); Delgrave S *et al.*, Protein Eng. 6:327-31 (1993)).

Em uma realização, ensaios baseados em célula podem ser explorados para analisar uma variedade de bibliotecas de KCNQ5 ou
30 KCNQ5(W270L). Por exemplo, uma biblioteca de vetores de expressão pode ser transfectada em uma linha de células que sintetizam KCNQ5(W270L). As células transfectadas são então cultivadas de modo que KCNQ5(W270L) e

um particular mutante KCNQ5(W270L) são sintetizados e o efeito de expressão do mutante sobre atividade de KCNQ5(W270L) em sobrenadantes de células pode ser detectado, por exemplo, através de qualquer um de um número de ensaios enzimáticos. ADN plasmídeo então pode ser recuperado das células cujo escore para inibição, ou alternativamente, potencialização de atividade de KCNQ5(W270L), e os clones individuais ainda caracterizados.

Em adição a polipeptídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) consistindo somente em aminoácidos ocorrendo naturalmente, peptidomiméticos de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) também são providos. Análogos de peptídeos são comumente usados na indústria farmacêutica como drogas não-peptídeo com propriedades análogas àquelas do peptídeo molde. Estes tipos de compostos não-peptídeos são chamados "miméticos de peptídeo" ou "peptidomiméticos" (Fauchere J, *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber DF and Freidinger RM, *Trends Neurosci.* 8:392-96 (1985); Evans BE et al., *J. Med. Chem* 30:1229-39 (1987)) e são usualmente desenvolvidos com o auxílio de modelagem molecular computadorizada. Miméticos de peptídeos que são estruturalmente similares a peptídeos terapeuticamente úteis podem ser usados para produção de um efeito terapêutico ou profilático equivalente.

Genericamente, peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipeptídeo paradigma (isto é, um polipeptídeo que tem uma atividade biológica ou farmacológica), tal como KCNQ5(W270L), mas têm uma ou mais ligações peptídeo opcionalmente substituídas com uma ligação selecionada do grupo consistindo em: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂--CH₂--, --CH=CH-- (cis e trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, e --CH₂SO--, através de processos conhecidos na técnica e ainda descritos nas seguintes referências: : Spatola AF in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins," B. Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, AF, *Vega Data* (March 1983), Vol. 1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications" (general review); Morley JS, *Trends Pharmacol. Sci.* 1:463-68 (1980) (general review); Hudson D et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-85 (1979) (--CH₂NH--, CH₂CH₂--); Spatola AF et al., *Life Sci.* 38:1243-49 (1986) (--CH₂--S); Hann

MM, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 307-314 (1982) (--CH--CH--, cis and trans); Almquist RG *et al.*, J. Med. Chem. 23:1392-98 (1980) (--COCH₂--); Jennings-White C *et al.*, Tetrahedron Lett. 23:2533-34 (1982) (--COCH₂--); EP 0 045 665 (--CH(OH)CH₂--); Holladay MW *et al.*, Tetrahedron Lett.,
 5 24:4401-04 (1983) (--C(OH)CH₂--); Hruby VJ, Life Sci. 31:189-99 (1982) (--CH₂--S--). Uma ligação não-peptídeo particularmente preferida é -CH₂NH-. Tais miméticos de peptídeos podem ter excelentes vantagens sobre realizações de polipeptídeos, incluindo, por exemplo: produção mais econômica, maior estabilidade química, aperfeiçoadas propriedades farmacológicas
 10 (meia - vida, absorção, potência, eficácia, etc.), especificidade alterada (por exemplo, um amplo espectro de atividades biológicas), reduzida antigenicidade, e outras. Marcação de peptidomiméticos usualmente envolve ligação covalente de uma ou mais etiquetas, diretamente ou através de um espaçador (por exemplo, um grupo amida), para posição(ões) não-interferente so-
 15 bre o peptidomimético que são previstas por dados de quantitativos de estrutura - atividade e/ou modelagem molecular. Tais posições não-interferentes genericamente são posições que não formam contatos diretos com as macromoléculas às quais o peptidomimético se liga para produzir o efeito terapêutico. Derivação (por exemplo, marcação) de peptidomiméticos não deve
 20 interferir substancialmente com a desejada atividade biológica ou farmacológica do peptidomimético.

Substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de aminoácidos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina no lugar de L-lisina) pode
 25 ser usada para gerar peptídeos mais estáveis. Em adição, peptídeos restrin- gidos compreendendo uma sequência de aminoácidos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou uma variação de sequência substancialmente idêntica pode ser gerada através de processos conhecidos na técnica (Rizo J and Gierasch LM, Ann. Ver. Biochem. 61:387-416 (1992)); por exemplo, através
 30 de adição de resíduos cisteína internos capazes de formarem pontes dissulfeto intramoleculares que ciclizam o peptídeo.

As seqüências de aminoácidos de polipeptídeos KCNQ5 ou

KCNQ(W270L) aqui identificadas permitirão aqueles versados na técnica produzirem polipeptídeos correspondendo a seqüências de peptídeos de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e suas variantes de seqüências. Tais polipeptídeos podem ser produzidos em células procarióticas ou eucarióticas através de expressão de polinucleotídeos codificando uma seqüência de peptídeos KCNQ(W270L), freqüentemente como parte de um polipeptídeo maior. Alternativamente, tais peptídeos podem ser sintetizados através de processos químicos. Processos para expressão de proteínas heterólogas em hospedeiros recombinantes, síntese química de polipeptídeos, e tradução in vitro são bem conhecidos na técnica e são ainda descritos em Sambrook J et al., supra; Berger and Kimmel, *Methods in Enzymology*, Volume 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Gutte B and Merrifield RB, *J. Am. Chem. Soc.* 91:501-02 (1969); Chaiken IM, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11:255-301 (1981); Kaiser ET et al., *Science* 243:187-92 (1989); Merrifield B, *Science*, 232:341-47 (1986); Kent SBH, *Ann. Rev. Biochem.* 57:957-89 (1988); Offord, R. E. (1980) *semisynthetic Proteins*, Wiley Publishing.

Peptídeos tipicamente podem ser produzidos através de síntese química direta. Peptídeos podem ser produzidos como peptídeos modificados, com metades não-peptídeo ligadas por ligação covalente ao terminus-N e/ou terminus-C. Em certas realizações preferidas, tanto o terminus-carboxi como o terminus-amino, ou ambos, são quimicamente modificados. As modificações mais comuns dos grupos terminais amino e carboxila são acetilação e amidação, respectivamente. Modificações de terminal amino como acilação (por exemplo, acetilação) ou alquilação (por exemplo, metilação) e modificações terminais carboxi como amidação, assim como outras modificações terminais, incluindo ciclização, podem ser incorporadas em várias realizações. Certas modificações terminais amino e/ou terminais carboxi e/ou extensões de peptídeos para a seqüência núcleo podem prover vantajosas propriedades físicas, químicas, bioquímicas e farmacológicas, tais como: aperfeiçoada estabilidade, aumentada potência e/ou eficácia, resistência a proteases de soro, desejáveis propriedades fármaco - cinéticas, e outras.

Peptídeos podem ser usados terapeuticamente para tratamento de doenças.

Uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou uma sua porção ou fragmento, também pode ser usada como um imunógeno para gerar anticorpos que se ligam a KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) usando técnicas padrões para preparação de anticorpo policlonal e monoclonal. Uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de inteiro comprimento pode ser usada ou, alternativa-
5 mente, um outro aspecto provê fragmentos de peptídeos antigênicos de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para uso como imunogênios. Um peptídeo anti-
gênico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) compreende pelo menos 8 resíduos
10 de aminoácidos e abrange um epítipo de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de modo que um anticorpo elevado contra o peptídeo forma um específico complexo imuno com KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Preferivelmente, o peptí-
deo antigênico compreende pelo menos 10 resíduos de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos 15 resíduos de aminoácidos, mesmo mais prefe-
15 rivelmente pelo menos 20 resíduos de aminoácidos, e mais preferivelmente pelo menos 30 resíduos de aminoácidos. Em uma realização, o peptídeo antigênico inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

Epítipos preferidos abrangidos pelo peptídeo antigênico são regiões de um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que estão localiza-
20 das sobre a superfície da proteína, por exemplo, regiões hidrofílicas, e que são únicas para um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Em uma reali-
zação, tais epítipos podem ser específicos para proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de uma espécie, tal como humana (isto é, um peptídeo anti-
gênico que atravessa uma região de um polipeptídeo KCNQ5 ou
25 KCNQ5(W270L) que não é conservada através de espécies é usado como imunógeno; tais resíduos não-conservados podem ser determinados usando um alinhamento tal como aquele aqui provido). Uma análise de hidrofobicidade padrão da proteína pode ser realizada para identificar regiões hidrofílicas.

30 Um imunogeno KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) tipicamente é usado para preparar anticorpos através de imunização de um sujeito apropriado (por exemplo, coelho, cabra, camundongo, ou outro mamífero) com o imu-

nógeno. Uma apropriada preparação imunogênica pode conter, por exemplo, uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) expressa recombinantemente ou um peptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) sintetizado quimicamente. A preparação ainda pode incluir um adjuvante, tal como adjuvante completo ou incompleto de Freund, ou agente imuno estimulador similar. Imunização de um 5 sujeito apropriado com uma preparação KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) imunogênica induz uma resposta de anticorpo anti-KCN5 ou anti-KCNQ5(W270L) policlonal.

Da mesma maneira, um outro aspecto pertence ao uso de anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L). Anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) policlonais podem ser preparados como descrito acima através de imunização de um sujeito apropriado com um imunógeno KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). O título de anticorpo anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) no sujeito imunizado pode ser monitorado com o tempo através de técnicas padrões, como com um ensaio imuno - sorvente ligado a 15 enzima (ELISA) usando polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) imobilizado. Se desejado, as moléculas de anticorpos direcionadas contra um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser isoladas a partir do mamífero (por exemplo, a partir do sangue) e ainda purificadas através de técnicas bem conhecidas, como cromatografia de proteína A para obter a fração IgG. 20 Em um momento apropriado após imunização, por exemplo, quando os títulos de anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) são mais altos, células produzindo anticorpos podem ser obtidas a partir do sujeito e usadas para preparar anticorpos monoclonais através de técnicas padrões, como a 25 técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler G and Milstein C, Nature 256:495-97 (1975) (ver também, Brown JP et al., J. Immunol. 127:539-46 (1981); Brown JP et al., J. Biol. Chem. 255:4980-83 (1980); Yeh MY et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31 (1979); Yeh MY et al., Int. J. cancer 29:269-75 (1982)), a técnica de hibridoma de célula B humana mais recente 30 (Kozbor D and Roder JC, Immunol. Today 4:72-79 (1983)), a técnica hibridoma - EBV (Cole et al. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96), ou técnicas trioma. A tecnologia para produção

de hibridomas de anticorpo monoclonal é bem conhecida (ver genericamente Kenneth RH, em *Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); Lerner EA, *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402 (1981); Gefter ML et al., *Somatic Cell Genet.* 3:231-36 (1977)). Em resumo, uma linha de célula imortal (tipicamente um mieloma) é fundida a linfócitos (tipicamente esplenócitos) a partir de um mamífero imunizado com um imunógeno KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) como descrito acima, e os sobrenadantes de cultura das resultantes células hibridomas são separados para identificação de um hibridoma produzindo um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Qualquer um dos protocolos bem conhecidos usados para fusão de linfócitos e linhas de células imortalizadas pode ser aplicado para o propósito de geração de um anticorpo monoclonal anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) (ver, por exemplo, Galfre G et al., *Nature* 266:550-52 (1977); Geifer ML et al., *supra*; Lerner EA, *supra*; Kenneth RH, *supra*). Além disso, aqueles versados na técnica apreciarão que existem muitas variações de tais processos que também podem ser úteis. Tipicamente, a linha de célula imortal (por exemplo, uma linha de célula mieloma) é derivada das mesmas espécies mamíferas como os linfócitos. Por exemplo, hibridomas murinos podem ser fabricados através de fusão de linfócitos de um camundongo imunizado com uma preparação imunogênica com uma linha de célula de camundongo imortalizada. Linhas de células imortais preferidassão linhas de células de mieloma de camundongo que são sensíveis a meio de cultura contendo hipoxantina, aminopterina, e timidina ("meio HAT"). Qualquer uma de um número de linhas de células de mieloma pode ser usada como um parceiro de fusão de acordo com técnicas padrões, por exemplo, as linhas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653, ou p2/O-Ag14. Estas linhas de mieloma são disponíveis de American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. Tipicamente, células mieloma de camundongo sensíveis a HAT são fundidas a esplenócitos de camundongo usando polietileno glicol ("PEG"). Células hibridoma resultantes da fusão são então seleciona-

das usando meio HAT, que mata células de mieloma fundidas improdutivamente e não-fundidas (esplenócitos não fundidos morrem após vários dias porque eles não são transformados). Células hibridoma produzindo um anticorpo monoclonal são detectadas através de separação de sobrenadantes de cultura de hibridoma para anticorpos que ligam uma molécula KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), por exemplo, usando um ensaio ELISA padrão.

Como uma alternativa para preparação de hibridomas secretando anticorpo monoclonal, um anticorpo anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) monoclonal pode ser identificado e isolado através de separação de uma biblioteca de imunoglobulina combinatorial recombinante (por exemplo, uma biblioteca de mostra de fago anticorpo) com KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para pelo que isolar membros de biblioteca de imunoglobulina que se ligam a polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Kits para geração e seleção de bibliotecas de mostra de fago são comercialmente disponíveis (por exemplo, o GE Healthcare Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01). Adicionalmente, exemplos de processos e reagentes particularmente apropriados para uso em geração e seleção de biblioteca de mostra de anticorpo podem ser encontrados em, por exemplo, Patente U.S. No. 5,223,409; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; Fuchs P *et al.*, *Biotechnology* (N.Y.) 9:1370-72 (1991); Hay BN *et al.*, *Hum. Antibodies Hybrids* 3:81-85 (1992); Huse WD *et al.*, *Science* 246:1275-81 (1989); Griffiths AD *et al.*, *EMBO J.* 12:725-34 (1993); Hawkins RE *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-96 (1992); Clarkson T *et al.*, *Nature* 352:624-28 (1991); Gram H *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-80 (1992); Garrard LJ *et al.*, *Biotechnology* (N.Y.) 9:1373-77 (1991); Hoogenboom HR *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:4133-37 (1991); Barbas CF *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-82 (1991); e McCafferty J *et al.*, *Nature* 348:552-54 (1990).

Adicionalmente, anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) recombinantes, tais como anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, compreendendo ambas porções humanas e não-humanas, que podem ser fabricados usando técnicas de ADN recombinante padrão, estão dentro

do escopo da presente exposição. Tais anticorpos monoclonais humanizados e quiméricos podem ser produzidos através de técnicas de ADN recombinante conhecidas, por exemplo, usando processos descritos em WO 87/02671; EP 0 184 187; EP 0 171 496; EP 0 173 494; WO 86/01533; Patente U.S. No. 4,816,567; EP 0 125 023; Better M *et al.*, Science 240:1041-43 (1988); Liu AY *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43 (1987); Liu AY *et al.*, J. Immunol. 139:3521-26 (1987); Sun LK *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-18 (1987); Nishimura Y *et al.*, Cancer Res. 47:999-1005 (1987); Wood CR *et al.*, Nature 314:446-49 (1985); Shaw DR *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-59 (1988); Morrison SL, Science 229:1202-07 (1985); U.S. Patent No. 5,225,539; Verhocyann M *et al.*, Science 239:1534-36 (1988); e Beidler CB *et al.*, J. Immunol. 141:4053-60 (1988).

Em adição, anticorpos humanizados podem ser fabricados de acordo com protocolos padrões tais como aqueles mostrados na patente U.S. 5 565 332. Em uma outra realização, cadeias de anticorpos ou membros de pares de ligação específica podem ser produzidos através de recombinação entre vetores compreendendo moléculas de ácido nucléico codificando uma fusão de uma cadeia de polipeptídeo de um membro de par de ligação específica e um componente de um pacote de mostra genética replicável e vetores contendo moléculas de ácido nucléico codificando uma segunda cadeia de polipeptídeos de um membro de par de ligação simples usando técnicas conhecidas, por exemplo, como descrito nas patentes U.S. 5 565 332; 5 871 907; ou 5 733 743.

Um anticorpo anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) (por exemplo, anticorpo monoclonal) pode ser usado para isolar um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) através de técnicas padrões, tal como cromatografia de afinidade ou imunoprecipitação. O polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1. Alternativamente, o polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) podem facilitar a purificação de polipeptídeos KCNQ5 naturais de células e de polipeptídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) produzidos recombinantemente expressos em células hos-

- pedeiras. Além disso, um anticorpo anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) pode ser usado para detectar uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, em um lisado celular ou sobrenadante de células). O polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1. Alternativamente, o polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Detecção pode ser facilitada através de acoplamento (isto é, ligação física) de anticorpo a uma substância detectável. Da mesma maneira, em uma realização, um anticorpo anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) é marcado com uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, e materiais radioativos. Exemplos de apropriadas enzimas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, beta - galactosidase, ou acetil colinesterase; exemplos de apropriados complexos de grupo protético incluem streptavidina / biotina e avidina / biotina; exemplos de apropriados materiais fluorescentes incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, dicloro triazinil amina fluoresceína, cloreto de dansila, ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de apropriado material radioativo incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ou ^3H .
- Anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) também são obteníveis através de um processo compreendendo:
- imunização de um animal com um polipeptídeo KCNQ5 ou uma sua porção imunogênica única para um polipeptídeo KCNQ5; e
 - isolamento a partir do animal, de anticorpos que se ligam especificamente a um polipeptídeo KCNQ5.
- Preferivelmente, o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em (i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L); (ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e (iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Mais preferivelmente, o polipeptídeo imunogênico é SEQ ID NO: 2.
- Da mesma maneira, em uma realização, anticorpos anti-KCNQ5

ou anti-KCNQ5(W270L) podem ser usados, por exemplo, intracelularmente para inibir atividade de proteína. O uso de anticorpos intracelulares para inibir função de proteína em uma célula é conhecido na técnica (ver, por exemplo, Carlson JR, Mol. Cell. Biol. 8:2638-46 (1988); Biocca S *et al.*, EMBO J. 9:101-08 (1990); Werge TM *et al.*, FEBS Lett. 274:193-98 (1990); Carlson JR, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-28 (1993); Marasco WA *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-93 (1993); Biocca S *et al.*, Biotechnology (N.Y.) 12:396-99 (1994); Chen S-Y *et al.*, Hum. Gene Ther. 5:595-601 (1994); Duan L *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-79 (1994); Chen S-Y *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-36 (1994); Beerli RR *et al.*, J. Biol. Chem. 269:23931-36 (1994); Beerli RR *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-72 (1994); Mhashilkar AM *et al.*, EMBO J. 14:1542-51 (1995); Richardson JH *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-41 (1995); WO 94/02610; e WO 95/03832).

Em uma realização, um vetor de expressão recombinante é preparado o qual codifica as cadeias de anticorpos em uma forma tal que, com introdução do vetor em uma célula, as cadeias de anticorpos são expressas como um anticorpo funcional em um compartimento intracelular da célula. Para inibição de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de acordo com os processos inibidores aqui mostrados, um anticorpo intracelular que se liga especificamente a proteína KCQ5 ou KCNQ5(W270L) é expresso no citoplasma da célula ou extracelularmente. Para preparar um vetor de expressão de anticorpo intracelular, ADNc's de cadeia leve e pesada de anticorpo codificando cadeias de anticorpos específicas para a proteína alvo de interesse, por exemplo, KCNQ5(W270L), são isolados, tipicamente de um hibridoma que secreta um anticorpo monoclonal específico para a proteína KCNQ5(W270L). Hibridomas secretando anticorpos monoclonais anti-KCNQ5(W270L), ou anticorpos monoclonais anti-KCNQ5(W270L) recombinantes, podem ser preparados como descrito acima. Uma vez um anticorpo monoclonal específico para proteína KCNQ5(W270L) tenha sido identificado (por exemplo, tanto um anticorpo monoclonal derivado de hibridoma como um anticorpo recombinante de uma biblioteca combinatorial), ADNs codifi-

- cando as cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal são isolados através de técnicas padrões de biologia molecular. Para anticorpos derivados de hibridoma, ADNc's de cadeia leve e pesada podem ser obtidos, por exemplo, através de amplificação PCR ou seleção de biblioteca de ADNc. Para anti-
- 5 corpos recombinantes, tal como para uma biblioteca de mostra de fago, ADNc codificando as cadeias leve e pesada pode ser recuperado do pacote de mostra (por exemplo, fago) isolado durante o processo de seleção de biblioteca. Sequências de nucleotídeos de genes de cadeia leve e pesada de anticorpo dos quais iniciadores de PCR ou sondas de biblioteca de ADNc
- 10 podem ser preparadas são conhecidas na técnica. Por exemplo, muitas tais seqüências são mostradas em Kabat EA *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 e na "Vbase" human germline sequence database.
- 15 Uma vez obtidas, as seqüências de cadeias leve e pesada de anticorpo são clonadas em um vetor de expressão recombinante usando processos padrões. Para permitir expressão citoplásmica das cadeias leve e pesada, as seqüências de nucleotídeos codificando os líderes hidrofóbicos das cadeias leve e pesada são removidas. Um vetor de expressão de anti-
- 20 corpo intracelular pode codificar um anticorpo intracelular em uma de várias diferentes formas. Por exemplo, em uma realização o vetor codifica cadeias leve e pesada de anticorpo de inteiro comprimento de modo que um anticorpo de inteiro comprimento é expresso intracelularmente. Em uma outra realização, o vetor codifica uma cadeia leve de inteiro comprimento mas somente
- 25 a região VH/CH1 da cadeia pesada de modo que um fragmento Fab é expresso intracelularmente. Na realização mais preferida, o vetor codifica um anticorpo de cadeia simples (scFv) onde as regiões variáveis das cadeias leve e pesada estão ligadas por um ligador peptídeo flexível (por exemplo, (Gly₄Ser)₃) e expresso como uma molécula de cadeia simples. Para inibir
- 30 atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula, o vetor de expressão codificando o anticorpo intracelular anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) é introduzido na célula através de processos padrões de transfecção, como

aqui discutidos.

IV. Vetores de expressão Recombinantes e Células Hospedeiras

Um outro aspecto pertence a vetores, preferivelmente vetores de expressão, contendo um ácido nucléico codificando uma proteína KCNQ5 ou

5 KCNQ5(W270L) (ou uma sua porção). O ácido nucléico pode codificar um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1. Alternativamente, o ácido nucléico pode codificar um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Os vetores de expressão recombinantes compreendem um ácido nucléico em uma forma

10 apropriada para expressão do ácido nucléico em uma célula hospedeira, o que significa que os vetores de expressão recombinantes incluem uma ou mais seqüências reguladoras, selecionadas nas bases das células hospedeiras usadas para expressão, que está operavelmente ligada à seqüência de ácido nucléico a ser expressa. O termo "seqüência reguladora" é pretendido

15 incluir promotores, aperfeiçoadores, e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação). Tais seqüências reguladoras são descritas em, por exemplo, Goeddel, Gene expression Technology: Methods in Enzimology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Seqüências reguladoras incluem aquelas que direcionam expressão constituti-

20 va de uma seqüência de nucleotídeos em muitos tipos de célula hospedeira e aquelas que direcionam expressão da seqüência de nucleotídeos somente em certas células hospedeiras (por exemplo, seqüências reguladoras específicas de tecido). Será apreciado por aqueles versados na técnica que o desenho do vetor de expressão pode ser dependente de fatores tais como a

25 escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, e semelhantes. Os vetores de expressão podem ser introduzidos em células hospedeiras para pelo que produzirem proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas ou peptídeos de fusão, codificados por ácidos nucléicos como aqui descrito (por exemplo, proteínas KCNQ5(W270L); for-

30 mas mutantes de proteínas KCNQ5(W270L), proteínas de fusão, e semelhantes).

Os vetores de expressão recombinantes podem ser desenhados

para expressão de proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou fragmentos de proteínas em células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser expressa em células bacterianas como células de inseto, E.coli (usando vetores de expressão baculovírus),
 5 células de levedura, células anfíbias, ou células mamíferas. Células hospedeiras apropriadas são ainda discutidas em Goeddel, supra. Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito e traduzido in vitro, por exemplo, usando seqüências reguladoras promotor T7 e T7 polimerase.

10 Expressão de proteínas em procariotes é mais freqüentemente realizada em E.coli com vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis direcionando expressão de proteínas de fusão ou não-fusão. Vetores de fusão adicionam um número de aminoácidos a um proteína ali codificada, usualmente ao terminus amino da proteína recombinante. Tais vetores de
 15 fusão servem tipicamente para três propósitos: 1) para aumentar expressão de proteína recombinante, 2) aumentar a solubilidade da proteína recombinante, e 3) para auxiliar na purificação da proteína recombinante através de atuação como um ligante em purificação por afinidade. Frequentemente, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é introdu-
 20 zido na junção da metade de fusão e a proteína recombinante para permitir separação da proteína recombinante da metade de fusão subsequente a purificação da proteína de fusão. Tais enzimas, e suas seqüências de reconhecimento cognatas, incluem Fator Xa, trombina, e enterocinase. Ípicos vetores de expressão de fusão incluem, por exemplo, pGEX (Pharmacia Bio-
 25 tech Inc; Smith DB and Johnson KS, Gene 67:31-40 (1988)) e pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) que fundem glutathione S-transferase (GST) ou proteína de ligação maltose E, respectivamente, à proteína recombinante alvo.

30 Proteínas de fusão purificadas podem ser utilizadas, por exemplo, em ensaios de atividade KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, ensaios diretos ou ensaios competitivos descritos em detalhes abaixo), ou para geração de anticorpos específicos para proteína KCNQ5 ou

KCNQ5(W270L).

Exemplos de apropriados vetores de expressão *E. coli* de não-fusão induzíveis incluem pTrc (amann E et al., *Gene* 69:301-15 (1988)) e pET 11d (Studier et al., *Gene expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) pp. 60-89). Expressão de gene alvo a partir de vetores pTrc baseia-se em transcrição de RNA polimerase a partir de um promotor de fusão trp-lac híbrido. Expressão de gene alvo a partir de vetor pEt 11d baseia-se em transcrição a partir de um promotor de fusão T7 gn10 - lac mediada por uma ARN polimerase viral co-expressa (T7 gn1). Esta polimerase viral é suprida por linhagens hospedeiras BL21(DE3) ou HMS174(DE3) a partir de um pró-fago residente abrigando um gene T7 gn1 sob o controle transcricional do promotor lacUV 5.

Uma estratégia para maximizar expressão de proteína recombinante em *E. coli* é expressar a proteína em bactérias hospedeiras com uma capacidade prejudicada para clivar proteoliticamente a proteína recombinante (Gottesman S, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) pp. 119-28). Uma outra estratégia é alterar a sequência de ácido nucléico do ácido nucléico a ser inserido em um vetor de expressão de modo que os códons individuais para cada aminoácido são aqueles preferencialmente utilizados em *E. coli* (Wada K et al., *Nucleic Acids Res.* 20(Suppl.):2111-18 (1992)). Tal alteração de sequências de ácidos nucléicos podem ser realizadas através de técnicas padrões de síntese de ADN.

Em uma outra realização, o vetor de expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é um vetor de expressão levedura. Exemplos de vetores para expressão em levedura *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari C et al., *EMBO J.* 6:229-34 (1987)), pMFa (Kurjan J and Herskowitz I, *Cell* 30:933-43 (1982)), pJRY88 (Schultz LD et al., *Gene* 54:113-23 (1987)), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), e picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, proteínas ou polipeptídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser expressos em células de inseto usando vetores

de expressão baculovírus. Vetores de expressão baculovírus disponíveis para expressão de proteínas em células de inseto cultivadas (por exemplo, células Sf 9) incluem as séries pAc (Smith GE et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:2156-65 (1983)) e as séries (Lucklow VA and Summers MD, *Virology* 170:31-39 (1989)).

Ainda em uma realização, um ácido nucléico é expresso em células mamíferas usando um vetor de expressão mamífero. Exemplos de vetores de expressão mamíferos incluem pCDMB (Seed B, *Nature* 329:840-41 (1987)) e pMT2PC (Kaufman RJ et al., *EMBO J.* 6:187-95 (1987)). Quando usados em células mamíferas, as funções controles de vetor de expressão são freqüentemente providas por elementos reguladores virais. Por exemplo, promotores comumente usados são derivados de polioma, Adenovírus 2, citomegalovírus e Vírus Símio 40. Para outros sistemas de expressão apropriados para ambas células procarióticas e eucarióticas, ver capítulos 16 e 17 de Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Em uma outra realização, o vetor de expressão mamífero recombinante é capaz de direcionar expressão do ácido nucléico preferencialmente em um particular tipo de célula (por exemplo, elementos reguladores específicos de tecido são usados para expressarem o ácido nucléico). Elementos reguladores específicos de tecido são conhecidos na técnica. Exemplos não-limitantes de apropriados promotores específicos de tecido incluem o promotor de albumina (específico de fígado; Pinkert CA et al., *Genes Dev.* 1:268-77 (1987)), promotores específicos de linfóide (Calame K e Eaton S, *Adv. Immunol.* 43:235-75 (1988)), em particulares promotores de receptores de célula T (Winoto A and Baltimore D, *EMBO J.* 8:729-33 (1989)) e imunoglobulinas (Banerji J et al., *Cell* 33:729-40 (1983); Queen C and Baltimore D, *Cell* 33:741-48 (1983)), promotores específicos de neurônios (por exemplo, o promotor de neurofilamento; Byrne GW e Ruddle FH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-77 (1989)), promotores específicos de pancreas (Edlund T et al., *Science* 230:912-16 (1985)), e promotores específicos de glândula ma-

mária (por exemplo, promotor de soro de leite coalhado; patente U.S. 4 873 316 e EP 0 264 166). Promotores regulados desenvolvimentalmente também são abrangidos, por exemplo, os promotores *hox* murinos (Kessel M and Gruss P. *Science* 249:374-79 (1990)) e o promotor alfa-feto proteína (Camper AS e Tilghman SM, *Genes Dev.* 3:537-46 (1989)).

Além disso, sistemas reguladores induzíveis para uso em células mamíferas são conhecidos na técnica, por exemplo, sistemas nos quais expressão de gene é regulada por íons de metais pesados (ver, por exemplo, Mayo KE *et al.*, *Cell* 29:99-108 (1982); Brinster RL *et al.*, *Nature* 296:39-42 (1982); Searle PF *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:1480-89 (1985)), heat shock (ver, por exemplo, Nouer L *et al.* (1991) in *Heat Shock Response*, ed. Nouer L, CRC, Boca Raton, Fla., pp. 167-220), hormones (ver, por exemplo, Lee F *et al.*, *Nature* 294:228-32 (1981); Hynes NE *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2038-42 (1981); Klock G *et al.*, *Nature* 329:734-36 (1987); Israel DI and Kaufman RJ, *Nucleic Acids Res.* 17:2589-2604 (1989); WO 93/23431), FK506-related molecules (see e.g., WO 94/18317) ou tetraciclina (Gossen M and Bujard H, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-51 (1992); Gossen M *et al.*, *Science* 268:1766-69 (1995); WO 94/29442; WO 96/01313). Da mesma maneira, uma outra realização provê um vetor de expressão recombinante no qual um ADN KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) está operavelmente ligado a um promotor eucariótico induzível, pelo que permitindo expressão induzível de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em células eucarióticas.

Também são conhecidos na técnica processos para expressão de proteínas endógenas usando recombinação homóloga de um braço (ver, por exemplo, pedido de patente U.S. publicado 2005/0003367; Zeh *et al.*, *Assay Drug Dev. Technol.* 1:755-65 (2003); Qureshi *et al.*, *Assay Drug Dev. Technol.* 1:767-76 (2003)). Em resumo, uma construção genômica isolada compreendendo um promotor ligado operavelmente a uma sequência alvejando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é introduzida em uma população homogênea de células (tais como, por exemplo, uma população homogênea de uma linha de células humanas ou uma população homogênea de células de ovário de hamster Chinês (CHO)). O promotor é heterólogo para o gene alvo

KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Seguindo recombinação, o promotor controla transcrição de um ARNm que codifica um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). A população de células é então incubada sob condições que causam expressão do polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

- 5 Ainda um aspecto provê um vetor de expressão recombinante compreendendo uma molécula de ADN clonada no vetor de expressão em uma orientação anti - sentido. Ou seja, a molécula de ADN está operavelmente ligada a uma seqüência reguladora em uma maneira que permite expressão (através de transcrição da molécula de ADN) de uma molécula de
- 10 ARN que é anti - sentido para ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Seqüências reguladoras operavelmente ligadas a um ácido nucléico clonado na orientação anti - sentido podem ser escolhidas as quais direcionam a expressão contínua da molécula de ARN anti - sentido em uma variedade de tipos de células, por exemplo, promotores e/ou aperfeiçoadores virais, ou seqüên-
- 15 cias reguladoras podem ser escolhidas que direcionam expressão constitutiva direta, específica de tecido ou específica de tipo de célula de ARN anti - sentido. O vetor de expressão anti - sentido pode estar na forma de um plasmídeo recombinante, fagemídeo, ou vírus atenuado no qual ácidos nucléicos anti - sentido são produzidos sob o controle de uma região reguladora de alta eficiência, a atividade da qual pode ser determinada através do
- 20 tipo de célula na qual o vetor é introduzido. Para uma discussão da regulação de expressão de gene usando genes anti - sentido, ver Weintraub H et al., Trends Genet. 1:22-25 (1985).

- Um outro aspecto pertence a células hospedeiras nas quais um
- 25 vetor de expressão recombinante foi introduzido. Por exemplo, uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser expressa em células bacterianas (como, por exemplo, E.coli), células de insetos, células de leveduras, células anfíbias (como, por exemplo, oócitos de *Xenopus laevis*), ou células mamíferas (como, por exemplo, células CHO ou células COS). Outras células hospedeiras apropriadas são conhecidas por aqueles versados na técnica.
- 30

ADN vetor pode ser introduzido em células procarióticas ou eucarióticas via técnicas de transformação ou transfecção padrões. Como aqui

usados, os termos "transformação" e "transfecção" são pretendidos referirem-se a uma variedade de técnicas reconhecidas para introdução de ácido nucléico estranho (por exemplo, ADN) em uma célula hospedeira, incluindo, por exemplo, co-precipitação com cloreto de cálcio ou fosfato de cálcio, 5 transfecção mediada por DEAE-dextrano, lipofecção, ou eletroporação. Processos apropriados para transformação ou transfecção de células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook J et al. (supra), e outros manuais de laboratório.

Para transfecção estável de células mamíferas, é conhecido 10 que, dependendo de vetor de expressão e técnica de transfecção usada, somente uma pequena fração de células pode integrar o ADN estranho em seu genoma. De modo a identificar e selecionar estes integrantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, resistência a antibióticos) é genericamente introduzido nas células hospedeiras junto com o gene 15 de interesse. Marcadores selecionáveis preferidos incluem aqueles que conferem resistência a drogas, tais como G418, higromicina, e metotrexato. Ácido nucléico codificando um marcador selecionável pode ser introduzido em uma célula hospedeira a no mesmo vetor como aquele codificando proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou pode ser introduzido em um vetor separado. 20 Células estavelmente transfectadas com o ácido nucléico introduzido podem ser identificadas por seleção de droga (por exemplo, células que incorporaram o gene marcador selecionável sobreviverão, enquanto as outras células morrem).

No caso de E.coli que são estavelmente transfectadas com 25 KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), tais linhas podem ser obtidas de modo que o gene KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) seja induzível. Por exemplo, a regulação do gene expresso pode ser efetuada através de expressão estável dupla primeiro de um plasmídeo "regulador", que contém o transativador controlado - tet (tTA) e um segundo plasmídeo "resposta", que contém KCNQ5 ou 30 KCNQ5(W270L), sob o controle de uma sequência promotora que inclui o elemento de resposta de tetraciclina (TER). Os plasmídeos reguladores comercialmente disponíveis estão em vetores engenheirados para seleção de

neomicina, necessitando que vetores resposta sejam construídos para incluir um segundo marcador selecionável. Usando tais processos, expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser desligada na presença de um agente, por exemplo, tetraciclina, ou um composto relacionado com tetraciclina (por exemplo, doxiciclina) e ligada quando o agente, por exemplo, tetraciclina, não é adicionado ao meio de cultura. Construção deste tipo de linha de células permite a expressão estável de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em células nas quais ele é normalmente tóxico.

Uma célula hospedeira, tal como uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, pode ser usada para produzir (isto é, expressar) uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Da mesma maneira, ainda um aspecto provê processos para produção de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) usando as células hospedeiras. Em uma realização, o processo compreende cultura de célula hospedeira (na qual um vetor de expressão recombinante codificando uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) foi introduzido) em um meio apropriado de modo que uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) seja produzida. Em uma outra realização, o processo ainda compreende isolamento de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) a partir do meio ou célula hospedeira.

Certas células hospedeiras também podem ser usadas para produção de animais transgênicos não-humanos. Por exemplo, em uma realização, a célula hospedeira é um oócito fertilizado ou uma célula tronco embrionária na qual seqüências codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) foram introduzidas. Tais células hospedeiras então podem ser usadas para criação de animais transgênicos não-humanos nos quais seqüências de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) exógenas foram introduzidas em seus genomas ou animais recombinantes homólogos nos quais seqüências de KCNQ5 endógenas foram alteradas. Tais animais são úteis para estudo de função e/ou atividade de um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e para identificação e/ou avaliação de moduladores de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Como aqui usado, um "animal transgênico" é um animal não-humano, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um roedor tal como um rato ou

camundongo, no qual uma ou mais das células do animal inclui um transgene. Outros exemplos de animais transgênicos incluem primatas não-humanos, ovelha, cães, vacas, cabras, galinhas, anfíbios, e semelhantes. Um transgene é ADN exógeno que é integrado no genoma de uma célula a partir da qual um animal transgênico se desenvolve e que permanece no genoma do animal maduro, pelo que dirigindo a expressão de um produto gene codificado em um ou mais tipos de células ou tecidos no animal transgênico. Como aqui usado, um "animal recombinante homólogo" é um animal não-humano, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um camundongo, no qual um gene KCNQ5 endógeno foi alterado através de recombinação homóloga entre o gene endógeno e uma molécula de ADN exógena introduzida em uma célula do animal, por exemplo, uma célula embrionário do animal, antes de desenvolvimento do animal.

Um animal transgênico pode ser criado através de introdução de um ácido nucléico codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) no pró-núcleo macho de um oócito fertilizado, por exemplo, através de microinjeção ou infecção retroviral, e permitindo que o oócito se desenvolva em um animal adotado fêmea pseudo-grávida. A seqüência de KCNQ5(W270L) de SEQ ID NO: 1 ou uma sua porção pode ser introduzida como um transgene no genoma de um animal não-humano. Alternativamente, um homólogo de gene KCNQ5(W270L), tal como um outro membro de família KCNQ, pode ser isolado baseado na hibridização das seqüências de ADNc de família KCNQ5(W270L) de SEQ ID NO: 1 (descrita acima) e usado como um transgene.

Seqüências intrônicas e sinais de poliadenilação também podem ser incluídos no transgene para aumentar a eficiência de expressão do transgene. Uma seqüência reguladora específica de tecido pode ser operavelmente ligada a um transgene KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para direcionar a expressão de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para células particulares. Processos para geração de animais transgênicos via manipulação e embrião e microinjeção, particularmente animais tais como camundongos, tornaram-se padrões na técnica e são descritos, por exemplo, em patentes

U.S. 4,736,866; 4,870,009; 4,873,191; and in Hogan B, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Processos similares são usados para produção de outros animais transgênicos. Um animal fundador transgênico pode ser identificado
 5 baseado na presença de um transgene KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em seu genoma e/ou expressão de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em tecidos ou células dos animais. Um animal fundador transgênico então pode ser usado para reproduzir animais adicionais transportando o transgene. Além disso, animais transgênicos carregando um transgene codificando uma prote-
 10 ína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser ainda reproduzidos para outros animais transgênicos transportando outros oncogenes.

Para criar um animal recombinante homólogo, um vetor é preparado o qual contem pelo menos uma porção de um gene KCNQ5 no qual uma supressão, adição, ou substituição foi introduzida para através do que
 15 alterar, por exemplo, interromper funcionalmente, o gene KCNQ5. Em uma realização preferida, o vetor é desenhado de modo que, com recombinação homóloga, o gene KCNQ5 endógeno é funcionalmente interrompido (isto não codifica mais uma proteína funcional; também referido como um vetor "nocaute"). Alternativamente, o vetor pode ser desenhado de modo que, com
 20 recombinação homóloga, o gene KCNQ5 endógeno sofre mutação ou de outro modo alterado mas ainda codifica uma proteína funcional (por exemplo, nucleotídeos 808-810 de SEQ ID NO: 1 podem ser alterados para pelo que alterar o aminoácido 270 da proteína KCNQ5 endógena). Em um vetor de recombinação homólogo, a porção alterada do gene KCNQ5 é flanquea-
 25 da por suas extremidades 5' e 3' através de adicional seqüência de ácido nucléico do gene KCNQ5 para permitir ocorrência de recombinação homóloga entre o gene KCNQ5 exógeno carregado pelo vetor e um gene KCNQ5 endógeno em uma célula tronco embriônica. A seqüência de ácido nucléico KCNQ5 flanqueante adicional é de comprimento suficiente para recombina-
 30 ção homóloga bem sucedida com o gene endógeno. Tipicamente, vários quilobases de ADN flanqueante (em ambas extremidades 5' e 3') são incluídas no vetor (ver, por exemplo, Thomas KR and capecchi MR, Cell 51:503-

12 (1987) para uma descrição de vetores de recombinação homóloga). O vetor é introduzido em uma linha de célula tronco embrionária (por exemplo, através de eletroporação) e células nas quais o gene KCNQ5 introduzido recombinau homologamente com o gene KCNQ5 endógeno são selecionadas (ver, por exemplo, Li E et al., Cell 69:915-26 (1992)). As células selecionadas são então injetadas em um blastocisto de um animal (por exemplo, um camundongo) para formação de quimeras de agregação (ver, por exemplo, Bradley A, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson EJ, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). Um embrião quimérico então pode ser implantado em um animal adotado fêmea pseudo-grávida apropriado, e o embrião levado a termo. Progenie abrigando o ADN recombinado homologamente em suas células germe pode ser usada para reproduzir animais nos quais todas as células do animal contêm o ADN recombinado homologamente através de transmissão de linha germe do transgene. Processos para construção de vetores de recombinação homóloga e animais recombinantes homólogos são ainda descritos em, por exemplo, Bradley A, Curr. Opin. Biotechnol. 2:823-29 (1991); WO 90/11354; WO 91/01140; e WO 93/04169.

Em adição ao anterior, aqueles versados na técnica apreciarão que outras abordagens conhecidas na técnica para recombinação homóloga podem ser aplicadas à presente exposição. Sistemas de integração específica de sítio assistida por enzima são conhecidos na técnica e podem ser aplicados para integrar uma molécula de ADN em uma localização predeterminada em uma segunda molécula de ADN alvo. Exemplos de tais sistemas de integração assistida por enzima incluem o sistema alvo Cre recombinase-lox (por exemplo, como descrito por Baubonis W and Sauer B, Nucleic Acids Res. 21:2025-29 (1993); and Fukushima S and Sauer B, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7905-09 (1992)) e o FLP recombinase-FRT target system (por exemplo, como descrito em Dang DT and Perrimon N, Dev. Genet. 13:367-75 (1992); e Fiering S et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8469-73 (1993)). Sistemas de recombinação homóloga induzível regulada com tetraciclina, tais como aqueles descritos em WO 94/29442 e WO 96/01313, também po-

dem ser usados.

Por exemplo, em uma outra realização, animais não-humanos transgênicos podem ser produzidos os quais contêm sistemas selecionados que permitem expressão regulada do transgene. Um exemplo de um tal sistema é o sistema cre/loxP recombinase de bacteriófago P1. Para uma descrição do sistema cre/loxP recombinase, ver, por exemplo, Lakso M et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-36 (1992). Um outro exemplo de um sistema recombinase é o sistema recombinase FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman S et al., Science 251:1351-55 (1991)). Se um sistema cre/loxP recombinase é usado para regular expressão do transgene, animais contendo transgenes codificando ambas a Cre recombinase e uma selecionada proteína são requeridos. Tais animais podem ser providos através de construção de animais transgênicos "duplos", por exemplo, através de acasalamento de dois animais transgênicos, um contendo um transgene codificando uma proteína selecionada e o outro contendo um transgene codificando uma recombinase.

Clones dos animais transgênicos não-humanos aqui descritos também podem ser produzidos de acordo com os processos descritos em, por exemplo, Wilmut I et al., Nature 385:810-13 (1997); WO 97/07668; e WO 97/07669. Em resumo, uma célula, por exemplo, uma célula somática, de um animal transgênico pode ser isolada e induzida a deixar o ciclo de crescimento e entrar em fase G₀. A célula quiescente então pode ser fundida, por exemplo, através de uso de pulsos elétricos, a um oócito enucleado de um animal da mesma espécie da qual a célula quiescente é isolada. O oócito reconstruído é então cultivado de modo que ele desenvolve para mórula ou blastócito e então transferido para animal adotado fêmea pseudo-grávida. A descendência nascida deste animal adotado fêmea será um clone do animal do qual a célula, por exemplo, a célula somática, é isolada.

V. Usos e Processos da Invenção

Canais de íons são excelentes alvos para drogas. Os polinucleotídeos aqui mostrados codificam canais de potássio bloqueados com voltagem mutantes, moduladores dos quais podem ser úteis para identificação de

compostos para diagnóstico, tratamento, prevenção ou alívio de doenças relacionadas com ou condições adversas do sistema nervoso central (CNS) e sistemas periféricos, incluindo vários tipos de dor tais como, por exemplo, dor somática, cutânea ou visceral causada por exemplo, por queimadura, hematoma, abrasão, laceração, osso quebrado, ligamento rompido, tendão rompido, músculo lacerado, infecção viral, bacteriana, de protozoário ou de fungos, dermatite de contato, inflamação (causada por exemplo, por trauma, infecção, cirurgia, queimaduras ou doenças com um componente inflamatório), câncer, dor de dente; dor neuropática causada por exemplo, por dano ao sistema nervoso central ou periférico devido a câncer, infecção de HIV (vírus de imunodeficiência humana), trauma de tecido, infecção, doença autoimune, diabetes, artrite, neuropatia diabética, neuralgia trigeminal, ou administração de droga; tratamento de ansiedade causada por exemplo, por distúrbio de pânico, distúrbio de ansiedade generalizada, ou distúrbio de tensão, particularmente distúrbio de tensão aguda, distúrbios afetivos, mal de Alzheimer, ataxia, dano de CNS causado por trauma, acidente vascular cerebral ou doença neurodegenerativa, déficits cognitivos, comportamento compulsivo, demência, depressão, doença de Huntington, mania, prejuízo de memória, distúrbios de memória, disfunção de memória, distúrbios de movimento, distúrbios motores, perda de memória relacionada com idade, doenças neurodegenerativas, mal de Parkinson e distúrbios motores semelhantes a Parkinson, fobias, doença de Pick, psicose, esquizofrenia, dano de cordão espinhal, tremor, ataques, convulsões, epilepsia, distrofia macular semelhante a Stargardt, distrofia macular de cone - bastão, doença de Salla, epilepsia, relaxantes musculares, redutores de febre, ansiolíticos, agentes anti-enxaqueca, analgésicos, distúrbios bipolares, depressão unipolar, distúrbios funcionais de intestino (por exemplo, dispepsia e síndrome de intestino irritável), diarreia, constipação, vários tipos de incontinência urinária (por exemplo, incontinência urinária de desejo, incontinência urinária de tensão, incontinência urinária de transbordamento ou incontinência urinária inconsciente, e incontinência urinária mista), urgência urinária, instabilidade de bexiga, bexiga neurogênica, perda de audição, tinido, glaucoma, distúrbios cogniti-

vos, dor neurálgica e inflamatória crônica; para prevenção e redução de dependência de droga ou tolerância para tratamento de, por exemplo, câncer, inflamação, doenças oftálmicas, e vários distúrbios de CNS.

As moléculas de ácido nucléico, proteínas, homólogos de proteínas, e anticorpos aqui descritos podem ser usados em um ou mais dos seguintes processos: a) processos de tratamento, preferivelmente no cérebro, músculo de esqueleto, ou bexiga urinária; b) ensaios de seleção; c) medicamentos anunciadores, ensaios prognósticos, experimentos clínicos de monitoração, ou fármaco - genéticos). As moléculas de ácidos nucléicos isoladas podem ser usadas, por exemplo, para expressão de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, via um vetor de expressão recombinante em uma célula hospedeira em aplicações de terapia de gene), para detecção de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, em uma amostra biológica) ou uma alteração genética em um gene KCNQ5, e para modular atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), como ainda descrito abaixo. Em adição, as proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usadas para selecionar proteínas de ligação KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ocorrendo naturalmente, para seleção de drogas ou compostos que modulam atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), assim como para tratamento de distúrbios que podem se beneficiar de modulação de KCNQ5, por exemplo, caracterizados por insuficiente ou excessiva produção de proteína KCNQ5 ou produção de formas de proteína KCNQ5 que tem atividade diminuída ou aberrante comparadas a proteína KCNQ5 tipo selvagem. Além disso, os anticorpos anti- KCNQ5 ou anti - KCNQ5(W270L) podem ser usados para detecção e isolamento de proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), regulação da biodisponibilidade de proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), e modulação de atividade de KCNQ5 (por exemplo, redução de atividade de KCNQ5 no cérebro aumentará a excitabilidade neuronal no CNS). Em realizações preferidas os processos aqui mostrados, por exemplo, detecção, modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), etc., são realizados no CNS, músculo de esqueleto, ou músculo liso de bexiga urinária.

A. Processos de Modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L)

Um aspecto provê processos de modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula, por exemplo, para o propósito de identificação de agentes que modulam expressão e/ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), assim como ambos processos profilático e terapêutico de
5 tratamento de um sujeito em risco de (ou suscetível a) um distúrbio ou tendo um distúrbio associado com aberrante expressão ou atividade de KCNQ5 ou um distúrbio que pode se beneficiar de modulação de atividade de KCNQ5.

Ainda um outro aspecto pertence a processos de modulação de expressão e/ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula. Os
10 processos moduladores envolvem contato de célula com um agente que modula expressão e/ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de modo que expressão e/ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) são moduladas. O agente pode atuar através de modulação de atividade de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na célula ou através de modulação de transcri-
15 ção do gene KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou tradução de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Da mesma maneira, em uma realização, o agente inibe atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Um agente inibidor pode funcionar, por exemplo, através de inibição direta de atividade de KCNQ5 ou
20 KCNQ5(W270L) ou através de modulação de um caminho sinalizante que regula negativamente KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). em uma outra realização, o agente estimula atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Um agente estimulador pode funcionar, por exemplo, através de estimulação direta de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou através de modulação de um ca-
25 minho sinalizante que conduz a estimulação de atividade KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Agentes inibidores exemplares incluem moléculas de ácidos nucléicos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) anti - sentido (por exemplo, para inibição de tradução de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), anticorpos anti - KCNQ5 ou anti - KCNQ5(W270L) (por exemplo, para inibição de atividade
30 de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L)), e mutantes negativos dominantes da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Outros agentes inibidores que podem ser usados para inibição de atividade de uma proteína KCNQ5 ou

KCNQ5(W270L) são compostos químicos que inibem atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Tais compostos podem ser identificados usando ensaios de seleção que selecionam tais compostos, como aqui descrito. Adicionalmente ou alternativamente, compostos que inibem atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser desenhados usando-se abordagens conhecidas na técnica.

De acordo com um outro processo modulador, atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é estimulada em uma célula através de contato de célula com um agente estimulador. Exemplos de tais agentes estimuladores incluem moléculas ativas de proteína e ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) codificando KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que são introduzidos na célula para aumentar atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na célula. Um agente estimulador preferido é uma molécula de ácido nucléico codificando uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), onde a molécula de ácido nucléico é introduzida na célula em uma forma apropriada para expressão da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ativa na célula. Para expressar uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula, tipicamente um ADNc KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é primeiro introduzido em um vetor de expressão recombinante usando técnicas padrões de biologia molecular, como aqui descrito. Um ADNc KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser obtido, por exemplo, através de amplificação usando a PCR ou através de seleção de uma apropriada biblioteca de ADNc's como aqui descrito. Seguindo isolamento ou amplificação de ADNc KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), o fragmento de ADN é introduzido em um vetor de expressão e transfectado em células alvos através de processos padrões, como aqui descrito. Outros agentes estimuladores que podem ser usados para estimulação de atividade e/ou expressão de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) são compostos químicos que estimulam atividade e/ou expressão de KCNQ5 em células, tais como compostos que aperfeiçoam atividade de KCNQ5. Tais compostos podem ser identificados usando-se ensaios de seleção que selecionam tais compostos, como aqui descrito em detalhes.

Os processos moduladores podem ser realizados in vitro (por

exemplo, através de cultura de célula com o agente ou através de introdução de agente em células em cultura) ou, alternativamente, in vivo (por exemplo, através de administração de agente a um sujeito ou através de introdução de agente em células de um sujeito, tal como através de terapia de gene). Para

- 5 prática de processo modulador in vitro, células podem ser obtidas de um sujeito através de processos padrões e incubadas (isto é, cultivadas) in vitro com um agente modulador para modular atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) nas células.

- Para agentes estimuladores ou inibidores que compreendem
- 10 ácidos nucleicos (incluindo vetores de expressão recombinantes codificando proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ARN anti - sentido, anticorpos intracelulares, ou inibidores negativos dominantes), os agentes podem ser introduzidos nas células do sujeito usando processos conhecidos na técnica para introdução de ácido nucleico (por exemplo, ADN) em células in vivo. Exemplos de tais processos abrangem ambos processos não-vital e viral, incluindo:
- 15

Injeção Direta: ADN nú pode ser introduzido em células in vivo através de injeção direta de ADN nas células (ver, por exemplo, Acsadi G et al., Nature 332:815-18 (1991); Wolff JÁ et al., Science 247:1465-68 (1990)).

- 20 Por exemplo, uma aparelhagem de liberação (por exemplo, uma "pistola de gene") para injeção de ADN em células in vivo pode ser usada. Uma tal aparelhagem é comercialmente disponível (por exemplo, de Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.).

- Lipídeos Catiônicos: ADN nú pode ser introduzido em células in vivo através de complexação de ADN com lipídeos catiônicos ou encapsulação de ADN em lipossomas catiônicas. Exemplos de apropriadas formulações de lipídeo catiônico incluem cloreto de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N,N-trietil amônio (DOTMA) e uma razão molar 1:1 de brometo de 1,2-dimiristiloxi propil-3-dimetil hidroxi etil amônio (DMRIE) e dioleoil fosfatidil
- 25
- 30 etanol amina (DOPE) (ver, por exemplo, Logan JJ et al., Gene Ther. 2:38-49 (1995); San H et al., Hum. Gene Ther. 4:781-88 (1993)).

Tomada de ADN Mediada Por Receptor: ADN nú também pode

ser introduzido em células in vivo através de complexação de ADN a um cá-
 tion, tal como poli lisina, que é acoplado a um ligante para um receptor de
 superfície de célula (ver, por exemplo, Wu GY and Wu CH, J. Biol. Chem.
 263:14621-24 (1988); Wilson JM *et al.*, J. Biol. Chem. 267:963-67 (1992);
 5 and U.S. Patent No. 5,166,320). Ligação do complexo de AND - ligante ao
 receptor facilita tomada do AND através de endocitose mediada por recep-
 tor. Um complexo de ADN - ligante ligado a capsídeos de adenovírus que
 naturalmente rompem endossomas, pelo que liberando material no citoplas-
 ma pode ser usado para evitar degradação do complexo através de liposso-
 10 mas intracelulares (ver, por exemplo, Curiel DT *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.
 USA 88:8850-54 (1991); Cristiano RJ *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 90:2122-26 (1993)).

Retrovírus: Retrovírus defectives são bem caracterizados pa-
 ra uso em transferência de gene para propósitos de terapia de gene (para
 15 uma revisão, ver Miller AD, Blood 76:271-78 (1990)). Um retrovírus recombi-
 nante pode ser construído tendo uma sequência de nucleotídeos de interes-
 se incorporada no genoma retroviral. Adicionalmente, porções do genoma
 retroviral podem ser removidas para tornar o retrovírus defeituoso em repli-
 cação. O retrovírus de replicação defeituosa é então empacotado em virions
 20 que podem ser usados para infectar a célula alvo através de uso de um vírus
 auxiliar através de técnicas padrões. Protocolos para produção de retrovírus
 recombinantes e para infecção de células in vitro ou in vivo com tais vírus
 podem ser encontrados em Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel
 FM *et al.* (eds.) Greene Publishing Associates (1989), Sections 9.10-9.14 e
 25 outros manuais padrões de laboratório. Exemplos de apropriados retrovírus
 incluem pLJ, pZIP, pWE e pEM que são bem conhecidos por aqueles versa-
 dos na técnica. Exemplos de apropriadas linhas de vírus de embalagem in-
 cluem Ψ Crip, Ψ Cre, Ψ 2 Ψ Am. Retrovírus têm sido usados para introdução
 de uma variedade de genes em muitos tipos diferentes de células, incluindo
 30 células epiteliais, células endoteliais, linfócitos, mioblastos, hepatócitos, célu-
 las de medula óssea, in vitro ou in vivo (ver, por exemplo, Eglitis MA *et al.*,
 Science 230:1395-98 (1985); Danos O and Mulligan RC, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 85:6460-64 (1988); Wilson JM *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-18 (1988); Armentano D *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-45 (1990); Huber BE *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-43 (1991); Ferry N *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-81 (1991); Chowdhury JR *et al.*, Science 254:1802-05 (1991); van Beusechem VW *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-44 (1992); Kay MA *et al.*, Hum. Gene Ther. 3:641-47 (1992); Dai Y *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-95 (1992); Hwu P *et al.*, J. Immunol. 150:4104-15 (1993); U.S. Patent No. 4,868,116; U.S. Patent No. 4,980,286; WO 89/07136; WO 89/02468; WO 89/05345; and WO 92/07573. Vetores retrovirais requerem divisão de célula alvo de modo que o genoma retroviral (e ácido nucléico estranho inserido no mesmo) seja integrado no genoma hospedeiro para introduzir estavelmente ácido nucléico na célula. Assim, pode ser necessário estimular replicação da célula alvo.

Adenovírus: O genoma de um adenovírus pode ser manipulado de modo que ele codifique e expresse um produto de gene de interesse mas seja inativado em termos de sua habilidade para replicar em um ciclo de vida viral lítico normal (ver, por exemplo, Berkner KL, Biotechniques 6:616-29 (1988); Rosenfeld MA *et al.*, Science 252:431-34 (1991); e Rosenfeld MA *et al.*, Cell 68:143-55 (1992)). Apropriados vetores adenovirais derivados de linhagem de adenovírus Ad tipo 5 d1324 ou outras linhagens de adenovírus (por exemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Adenovírus recombinantes são vantajosos em que eles não requerem células se dividindo para serem efetivos veículos de liberação de gene e podem ser usados para infectarem uma ampla variedade de tipos de células, incluindo epitélio de vias aéreas (Rosenfeld MA *et al.*, Cell 68:143-55 (1992)), células endoteliais (Lemarchand P *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-86 (1992)), hepatócitos (Herz J and Gerard RD, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-16 (1993)), e células de músculo (Quantin B *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-84 (1992)). Adicionalmente, ADN adenoviral introduzido (e ADN estranho ali contido) não é integrado no genoma de uma célula hospedeira mas permanece episomal, pelo que evitando potenciais problemas que podem ocorrer como um resultado de mutagênese de inser-

ção em situações onde ADN introduzido torna-se integrado no genoma hospedeiro (por exemplo, ADN retroviral). Além disso, a capacidade de carregamento do genoma adenoviral para ADN estranho é grande (até 8 quilobases) em relação a outros vetores de liberação de gene (Berkner KL et al., supra; Haj-Ahmad Y and Graham FL, J. Virol. 57:267-74 (1986)). Maioria de vetores adenovirais de replicação defeituosa correntemente em uso são suprimidos de todos ou partes dos genes E1 e E3 virais mas retêm tanto quanto 80% do material genético adenoviral.

Vírus Adeno-Associados: Vírus adeno - associado (AAV) é um vírus defeituoso ocorrendo naturalmente que requer um outro vírus, tal como um adenovírus, ou um vírus de herpes, ou um vírus auxiliar para eficiente replicação e um ciclo de vida produtivo (para uma revisão, ver Muzyczka N, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129 (1992)). Ele é também um dos poucos vírus que pode integrar seu ADN em células não se dividindo, e exibe uma alta frequência de integração estável (ver, por exemplo, Flotte TR et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-56 (1992); Samulski RJ et al., J. Virol. 63:3822-28 (1989); e McLaughlin SK et al., J. Virol. 62:1963-73 (1988)). Vetores contendo tão pouco quanto 300 pares de bases de AAV podem ser embalados e podem integrar. Espaço para ADN exógeno é limitado a cerca de 4,5 kb. Um vetor AAV tal como aquele descrito por Tratschin JD et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-60 (1985), pode ser usado para introduzir ADN em células. Uma variedade de ácidos nucleicos foram introduzidos em diferentes tipos de células usando vetores AAV (ver, por exemplo, Hermonat PL and Muzyczka N, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-70 (1984); Tratschin JD et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-81 (1985); Wondisford FE et al., Mol. Endocrinol. 2:32-39 (1988); Tratschin JD et al., J. Virol. 51:611-19 (1984); and Flotte TR et al., J. Biol. Chem. 268:3781-90 (1993)).

A eficácia de um particular sistema de vetor de expressão e processo de introdução de ácido nucleico em uma célula pode ser avaliado através de abordagens padrões rotineiramente usadas na técnica. Por exemplo, ADN introduzido em uma célula pode ser detectado por uma técnica de hibridização de filtro (por exemplo, Southern blotting), e ARN produzido por

transcrição de ADN introduzido pode ser detectado, por exemplo, por Northern blot, proteção com RNase, ou reação de cadeia polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR). O produto gene pode ser detectado através de um ensaio apropriado, por exemplo, através de detecção imunológica de uma

5 proteína produzida, tal como com um anticorpo específico, ou através de um ensaio funcional para detectar uma atividade funcional do produto de gene.

Existe uma variedade de condições patológicas para as quais agentes de modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usados em tratamento (ver, por exemplo, seção V, aqui).

10 1. Processos Profiláticos

Um aspecto provê um processo para prevenção em um sujeito, de uma doença ou condição que pode se beneficiar de modulação de uma atividade e/ou expressão de KCNQ5, por exemplo, um distúrbio associado com uma expressão ou atividade aberrante de KCNQ5 (tal como por exemplo,

15 incontinência urinária e dor neuropática), através de administração ao sujeito de um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou um agente que modula expressão de polipeptídeo KCNQ5 ou pelo menos uma atividade de KCNQ5. Em um aspecto, o polipeptídeo KCNQ5 pode conter um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1. Alternativamente, o polipeptídeo KCNQ5 pode con-

20 ter um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Sujeitos em risco para uma doença que é causada ou contribuída por expressão ou atividade aberrante de KCNQ5 podem ser identificados através de, por exemplo, qualquer um ou uma combinação de ensaios diagnósticos ou prognósticos como aqui descritos. Administração de um agente profilático pode ocorrer antes da manifes-

25 tação de sintomas característicos de aberração de KCNQ5, de modo que a doença ou distúrbio é prevenida ou, alternativamente, retardada em sua progressão. Dependendo do tipo de aberração ou condição de KCNQ5, por exemplo, um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), agonista de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou agente antagonista de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L)

30 pode ser usado para tratamento do sujeito. O apropriado agente pode ser determinado baseado em ensaios de seleção aqui descritos.

2. Processos Terapêuticos

Um outro aspecto pertence a processos de modulação de expressão ou atividade de KCNQ5 para propósitos terapêuticos. Da mesma maneira, em uma realização exemplar, o processo modulador envolve contato de uma célula com um polipeptídeo ou agente KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que modula uma ou mais das atividades de proteína KCNQ5 associada com a célula. Um agente que modula atividade de proteína KCNQ5 pode ser um agente como aqui descrito, tal como um ácido nucleico ou uma proteína, uma molécula alvo ocorrendo naturalmente de uma proteína KCNQ5 (por exemplo, uma proteína de ligação KCNQ5), um anticorpo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), um agonista ou antagonista de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), um peptidomimético de um agonista ou antagonista de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou outra molécula pequena. Em uma realização, o agente estimula uma ou mais atividades de KCNQ5. Exemplos de tais agentes estimuladores incluem proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ativa e uma molécula de ácido nucleico codificando polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) que foi introduzido na célula. Em uma outra realização, o agente inibe uma ou mais atividades KCNQ5. Exemplos de tais agentes inibidores incluem moléculas de ácido nucleico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) anti - sentido, anticorpos anti - KCNQ5 ou anti - KCNQ5(W270L), e inibidores de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Estes processos moduladores podem ser realizados in vitro (por exemplo, através de cultura de célula com o agente) ou, alternativamente, in vivo (por exemplo, através de administração de agente a um sujeito). Como tal, ainda um aspecto provê processos de tratamento de um indivíduo afligido com uma doença ou distúrbio que pode se beneficiar de modulação de uma proteína KCNQ5 (por exemplo, como descrito em seção V, aqui), ou que é caracterizada por expressão ou atividade aberrante de uma molécula de ácido nucleico ou proteína KCNQ5. Em uma realização, o processo envolve administração de um agente (por exemplo, um agente identificado através de um ensaio de seleção aqui descrito), ou combinação de agentes que modula (por exemplo, regula ascendentemente ou regula descendentemente) expressão ou atividade de KCNQ5. Em uma outra realização, o processo en-

volve administração de uma molécula de ácido nucléico ou proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) como terapia para compensar reduzida ou aberrante expressão ou atividade de KCNQ5.

Estimulação de atividade de KCNQ5 é desejável em situações nas quais KCNQ5 é anormalmente regulado descendentemente e/ou onde aumentada atividade de KCNQ5 é provável de ter um efeito benéfico. Da mesma maneira, inibição de atividade de KCNQ5 é desejável em situações nas quais KCNQ5 é anormalmente regulada ascendentemente e/ou onde diminuída atividade de KCNQ5 é provável de ter um efeito benéfico. Situações exemplares nas quais modulação de KCNQ5 será desejável estão no tratamento de distúrbios associados com KCNQ5 (ver, por exemplo, seção V, aqui).

Agentes identificados pelos processos aqui mostrados são úteis para indução, auxílio ou manutenção de desejável controle de bexiga em um mamífero experimentando ou suscetível a instabilidade de bexiga ou incontinência urinária. Estes processos incluem prevenção, tratamento ou inibição de condições urinárias relacionadas com bexiga e instabilidade de bexiga, incluindo instabilidade de bexiga idiopática, enurese noturna, notúria, disfunção de esvaziamento e incontinência urinária. Também tratável ou prevenível com os processos desta invenção é instabilidade de bexiga secundária para hipertrofia de próstata. Os agentes identificados pelos processos aqui mostrados também são úteis na promoção de retardo temporário de micção quando desejável. Os agentes também podem ser usados para estabilização de bexiga e tratamento ou prevenção de incontinência urinária de desejo, incontinência urinária de tensão ou uma combinação de incontinência de tensão e desejo em um mamífero, que também pode ser referida como incontinência de tensão e desejo mista. Estes processos incluem auxílio em prevenção ou tratamento de incontinência urinária associada com condições secundárias como hipertrofia de próstata.

Estes processos podem ser utilizados para permitir um receptor controlar a urgência e frequência de micção. Os processos desta invenção incluem o tratamento, prevenção, inibição e melhora de incontinência urinária.

ria de desejo também conhecida como instabilidade de bexiga, bexiga neurogênica, disfunção de esvaziamento, bexiga hiperativa, superatividade de detrusor, hiper-reflexia de detrusor ou bexiga não-inibida.

Como descrito acima, processos úteis incluem tratamentos, prevenção, inibição ou melhora de bexiga hiperativa ou instável, bexiga neurogênica, urgência de bexiga sensória, ou bexiga hiper-reflexiva. Estes usos incluem, mas não são limitados àqueles para atividades e instabilidades de bexiga nas quais a urgência urinária está associada com prostatite, hipertrofia prostática, cistite intersticial, infecções de trato urinário ou vaginite. Os agentes também podem ser usados para auxiliarem em inibição ou correção das condições de Síndrome de Frquência - Urgência, e bexiga preguiçosa, também conhecida como síndrome de esvaziamento infreqüente.

Os agentes também podem ser usados para tratamento, prevenção, inibição ou limitação de incontinência urinária, instabilidade urinária ou urgência urinária associada com ou resultante de administrações de outras medicações, incluindo diuréticos, antagonistas de vasopressina, agentes anticolinérgicos, sedativos ou agentes hipnóticos, narcóticos, agonistas alfa-adrenérgicos, antagonistas alfaadrenérgicos, ou bloqueadores de canal de cálcio.

Os agentes identificados pelos processos aqui mostrados podem ser úteis para indução ou auxílio em controle de bexiga urinária ou prevenção ou tratamento de doenças aqui descritas em humanos em necessidade de tal alívio, incluindo usos adulto e pediátrico. Entretanto, eles também podem ser utilizados para aplicações veterinárias, particularmente incluindo processos de controle de bexiga de caninos e felinos. Se desejado, os presentes processos também podem ser usados com animais de fazenda, como criações de ovinos, bovinos, porcos e eqüinos.

B. Ensaios de Seleção:

Um aspecto provê um processo (também referido aqui como um "ensaio de seleção") para identificação de moduladores, ou seja, compostos candidatos ou testes ou agentes (por exemplo, peptídeos, peptidomiméticos, moléculas pequenas e outras drogas) que se ligam a proteínas KCNQ5 ou

KCNQ5(W270L), têm um efeito estimulador ou inibidor sobre, por exemplo, expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Os compostos testes podem ser obtidos usando qualquer uma de numerosas abordagens em processos de biblioteca combinatorial conhecidos na técnica, incluindo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida ou fase solução paralelas espacialmente endereçáveis; processos de biblioteca sintética requerendo desconvolução; o processo de biblioteca de "uma-pérola um-composto"; e processos de biblioteca sintéticos usando seleção de cromatografia de afinidade. A abordagem de biblioteca biológica é limitada a bibliotecas de peptídeos, enquanto as outras quatro abordagens são aplicáveis a bibliotecas de moléculas pequenas ou, não-peptídeo oligômero, peptídeo de compostos (Lam KS, *Anticancer Drug Des.* 12:145-67 (1997)).

Exemplos de processos para a síntese de bibliotecas moleculares podem ser encontrados na técnica, por exemplo em: DeWitt SH *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-13 (1993); Erb E *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-26 (1994); Zuckermann RN *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:2678-85 (1994); Cho CY *et al.*, *Science* 261:1303-05 (1993); Carrell T *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059-61 (1994); Carrell T *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061-64 (1994); e Gallop MA *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:1233-51 (1994).

Bibliotecas de compostos podem ser apresentadas, por exemplo, em solução (por exemplo, Houghten RA *et al.*, *Biotechniques* 13:412-21 (1992)), ou sobre pérolas (Lam KS *et al.*, *Nature* 354:82-84 (1991)), chips (Fodor SPA *et al.*, *Nature* 364:555-56 (1993)), bactérias (Patente U.S. No. 5,223,409), esporos (Patente U.S. No. 5,223,409), plasmídeos (Cull MG *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-69 (1992)), ou sobre fago (Scott JK and Smith GP, *Science* 249:386-90 (1990); Devlin JJ *et al.*, *Science* 249:404-06 (1990); Cwirla SE *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-82 (1990); Felici F *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:301-10 (1991); Patente U.S. No. 5,223,409).

Em muitos programas de seleção de drogas que testam bibliotecas de agentes de modulação e extratos naturais, ensaios de alta produtivi-

dade são desejáveis de modo a maximizar o número de agentes de modulação sobreviventes em um dado período de tempo. Ensaios que são realizados em sistemas livres de células, tal como pode ser derivado com proteínas purificadas ou semi - purificadas, são frequentemente preferidos como

5 seleções "primárias" em que elas podem ser geradas para permitirem rápido desenvolvimento e detecção relativamente fácil de uma alteração em um alvo molecular que é mediada por um agente de modulação teste. Além disso, os efeitos de toxidez celular e/ou biodisponibilidade do agente de modulação teste podem ser genericamente ignorados no sistema in vitro, o ensaio

10 ao invés sendo focalizado primariamente sobre o efeito da droga sobre o alvo molecular como pode ser manifesto em uma alteração de afinidade de ligação com elementos à montante ou à jusante.

Em um aspecto, um agente é selecionado através de contato de agente com uma molécula de KCNQ5 e detectando o efeito do agente sobre

15 atividade de KCNQ5. Detecção de um aumento ou uma diminuição de atividade de KCNQ5 é indicativa de um agente sendo um modulador de KCNQ5. A molécula de KCNQ5 pode ser um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L), um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de

20 KCNQ1, ou um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Alternativamente, a molécula de KCNQ5 pode ser um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L), um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1, ou um polipeptídeo

25 KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

Em um outro aspecto, um agente é selecionado através de contato de uma célula com um agente e determinando o nível de expressão de uma molécula de KCNQ5. Detecção de uma diminuição ou um aumento em expressão de KCNQ5 é indicativa de um agente sendo um modulador de

30 KCNQ5. A molécula de KCNQ5 pode ser um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L), um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana

S5-S6 de KCNQ1, ou um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Alternativamente, a molécula de KCNQ5 pode ser um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L), um
5 polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1, ou um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

Uma realização provê ensaios para seleção de compostos candidatos ou testes que se ligam a ou modulam a atividade de uma proteína ou
10 polipeptídeo KCNQ5 ou sua porção biologicamente ativa, por exemplo, modula a habilidade de polipeptídeo KCNQ5 para reduzir excitabilidade neuronal ansiedade e/ou dor neuropática, ou para "acalmar" atividade de músculo liso de bexiga para incontinência urinária. Por "acalmar" é pretendido suprimir contrações anormais de células de músculo liso de bexiga em pacientes
15 de incontinência.

Ensaio podem ser usados para seleção de agentes modulantes, incluindo homólogos de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), que são agonistas ou antagonistas da função celular normal dos polipeptídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de sujeito. Por exemplo, um aspecto provê um processo no
20 qual uma composição indicadora é provida que tem uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) tendo uma atividade KCNQ5. A composição indicadora pode ser contactada com um composto teste. O efeito do composto teste sobre atividade de KCNQ5, como medido através de uma mudança na composição indicadora, então pode ser determinado para através do que identificar um
25 composto que modula a atividade de uma proteína KCNQ5. Uma mudança estatisticamente significativa, tal como uma diminuição ou aumento, no nível de atividade de KCNQ5 na presença do composto teste (em relação ao que é detectado na ausência do composto teste) é indicativa do composto teste sendo um agente de modulação de KCNQ5. A composição indicadora pode
30 ser, por exemplo, uma célula ou um extrato de célula.

A eficácia do agente de modulação pode ser avaliada através de geração de curvas de dose resposta a partir de dados obtidos usando várias

concentrações do agente de modulação teste. Além disso, um ensaio controle também pode ser realizado para prover uma linha base para comparação. No ensaio controle, proteína ou KCNQ5(W270L) isolada e purificada é adicionada a uma composição contendo um elemento de ligação de KCNQ5, e a formação de um complexo é quantificada na ausência do agente de modulação teste.

Ainda em uma outra realização, um ensaio é um ensaio isento de célula no qual uma proteína ou KCNQ5(W270L) ou sua porção biologicamente ativa é contactada com um composto teste e a habilidade do composto teste para se ligar à proteína ou KCNQ5(W270L) ou sua porção biologicamente ativa é determinada. Ligação do composto teste à proteína ou KCNQ5(W270L) pode ser determinada direta ou indiretamente como descrito acima. Em uma realização, o ensaio inclui contato de proteína ou KCNQ5(W270L) ou sua porção biologicamente ativa com um composto conhecido que liga KCNQ5 tipo selvagem para formar uma mistura de ensaio, contato de mistura de ensaio com um composto teste, e determinação de habilidade do composto teste para interagir com uma proteína ou KCNQ5(W270L), onde determinação de habilidade do composto teste para interagir com uma proteína ou KCNQ5(W270L) compreende determinação de habilidade do composto teste ligar-se preferencialmente a polipeptídeo ou KCNQ5(W270L) ou sua porção biologicamente ativa comparado ao composto conhecido.

A proteína ou KCNQ5(W270L) pode ser provida como um lisado de células que expresam ou KCNQ5(W270L), como um polipeptídeo purificado ou semi - purificado, ou como um polipeptídeo expresso recombinantemente. Em uma realização, um sistema de ensaio isento de células ainda compreende pelo menos uma molécula alvo com a qual KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) interage, e a habilidade do composto teste para modular a interação da KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) com a molécula(s) alvo é monitorada para pelo que identificar o composto teste como um modulador de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Determinação de habilidade do composto teste para modular a atividade de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode

ser realizada, por exemplo, através de determinação de habilidade da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) se ligar a uma molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) através de um dos processos descritos acima para determinação de ligação direta. Determinação de habilidade da proteína KCNQ5(W270L) para ligar-se a uma molécula alvo KCNQ5(W270L) também pode ser realizada usando uma tecnologia tal como Análise de Interação Biomolecular de tempo real (BIA) (ver, por exemplo, Sjolander S and Urbaniczky C, *Anal. Chem.* 63:2338-45 (1991) and Szabo A *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 (1995)). Como aqui usado, "BIA" é uma tecnologia para estudo de interações bioespecíficas em tempo real, sem marcação de qualquer dos inter-atuantes (por exemplo, BIAcore). Mudanças no fenômeno ótico de ressonância plasmon de superfície (SPR) podem ser usadas como uma indicação de reações em tempo real entre moléculas biológicas.

Ainda em uma outra realização, o ensaio livre de células envolve contato de uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou sua porção biologicamente ativa com um composto conhecido que se liga com a proteína KCNQ5 tipo selvagem para formar uma mistura de ensaio, contato de mistura de ensaio com um composto teste, e determinação de habilidade do composto teste interagir com a proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), onde determinação de habilidade do composto teste de interagir com a proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) compreende determinação de habilidade da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para ligar preferencialmente a ou modular a atividade de uma molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Os ensaios isentos de células são suscetíveis ao uso de ambas formas de proteínas, solúveis e/ou ligadas a membrana. No caso de ensaios isentos de células onde é usada uma forma de proteína ligada a membrana (por exemplo, proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L)) pode ser desejável utilizar um agente solubilizante de modo que a forma de proteína ligada a membrana seja mantida em solução. Exemplos de tais agentes solubilizantes incluem detergentes não-iônicos como n-octil glicosídeo, n-dodecil glicosídeo, n-dodecil maltosídeo, octanoil-N-metil glucamida, decanoil-N-metil glucamida, Triton X-100, Triton X-114, Thesit, Istotridecil poli(etileno glicol

éter)_n, sulfonato de 3-[(3-colamido propil) dimetil amminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamido propil) dimetil amminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), ou sulfonato de N-dodecil=N,N-dimetil-3-amônio-1-propano.

- 5 Uma molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser, por exemplo, uma proteína. Apropriados ensaios são conhecidos na técnica que permitem a detecção de interações proteína - proteína (por exemplo, imunoprecipitações, ensaios de dois híbridos, e semelhantes). Através de realização de tais ensaios na presença e ausência de compostos testes, estes ensaios
- 10 podem ser usados para identificação de compostos que modulam (por exemplo, inibem ou aperfeiçoam) a interação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) com uma molécula(s) alvo.

 Determinação de habilidade da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para ligar-se a ou interagir com um ligante de uma molécula

15 de KCNQ5 o KCNQ5(W270L) pode ser realizada, por exemplo, através de ligação direta. Em um ensaio de ligação direta, a proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser acoplada com radioisótopo ou marcador enzimático de modo que ligação da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) a uma molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser determinada através de

20 detecção de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em um complexo. Por exemplo, moléculas de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), por exemplo, proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), podem ser marcadas com, por exemplo, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ou ³H, tanto diretamente como indiretamente, e o radioisótopo detectado através de contagem direta de rádio - emissão ou através de con-

25 tagem de cintilação. Alternativamente, moléculas de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser enzimaticamente marcadas com, por exemplo, peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, ou luciferase, e o marcador enzimático detectado através de determinação de conversão de um substrato apropriado para produto.

- 30 Tipicamente, será desejável imobilizar KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou suas proteínas ligantes para facilitar separação de complexos de formas não complexadas de uma ou ambas das proteínas, assim

como acomodar automação do ensaio. Ligação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) a um elemento de ligação à montante ou à jusante, na presença e ausência de um agente candidato, pode ser realizada em qualquer vaso apropriado para conter os reagentes. Exemplos incluem placas de micro - titulação, tubos de ensaio, e tubos de micro - centrífuga. Em uma realização, uma proteína de fusão pode ser provida que adiciona um domínio que permite que a proteína seja ligada a uma matriz. Por exemplo, proteínas de fusão glutathione-S-transferase / KCNQ5(W270L) (GST / KCNQ5(W270L)) podem ser adsorvidas sobre pérolas de glutathione sefarose (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) ou placas de microtitulação derivadas de glutathione, que são então combinadas com os lisados de células e o agente de modulação teste, e a mistura incubada sob condições que conduzem a formação de complexo, por exemplo, em condições fisiológicas para sal e pH, embora condições levemente mais rigorosas possam ser desejadas. Seguindo incubação, as pérolas são lavadas para remoção de qualquer marcador não - ligado, e a matriz imobilizada e radio - marcador determinado diretamente (por exemplo, pérolas colocadas em cintilante), ou no sobrenadante após os complexos serem subsequentemente dissociados. Alternativamente, os complexos podem ser dissociados da matriz, separados por SDS-PAGE, e o nível de proteína de ligação de KCNQ5-(W270L) encontrado na fração de pérolas quantificado a partir do gel usando técnicas eletroforéticas padrões.

Outras técnicas para imobilização de proteínas ou matrizes também são disponíveis para uso no ensaio objeto. Por exemplo, KCNQ5(W270L) ou sua proteína ligante cognata pode ser imobilizada utilizando conjugação de biotina e streptavidina. Por exemplo, moléculas KCNQ5(W270L) biotiniladas podem ser preparadas a partir de biotina-NHS-(N-hidroxi succinimida) usando-se técnicas bem conhecidas (por exemplo, kit de biotinylation, Pierce Biotechnology, Rockford, Ill.), e imobilizadas nas cavidades de placas de 96 cavidades revestidas com streptavidina (Pierce Technology). Alternativamente, anticorpos reativos com KCNQ5(W270L) mas que não interferem com ligação de elementos à montante ou à jusante podem ser derivados para as cavidades da placa, e KCNQ5(W270L) arras-

tado para as cavidades através de conjugação de anticorpo. Como acima, preparações de uma proteína de ligação de KCNQ5(W270L) (KCNQ5(W270L)-BP) e um agente de modulação teste são incubadas nas cavidades apresentando KCNQ5(W270L) da placa, e a quantidade de complexo arrastada na cavidade pode ser quantificada. Processos exemplares para detecção de tais complexos, em adição àqueles descritos acima para os complexos imobilizados em GST, incluem imuno - detecção de complexos usando anticorpos reativos com o elemento de ligação de KCNQ5(W270L), ou que são reativos com proteína KCNQ5(W270L) e competem com o elemento de ligação; assim como ensaios ligados a enzima que se baseiam na detecção de uma atividade enzimática associada com o elemento de ligação, atividade tanto intrínseca como extrínseca. No exemplo da última, a enzima pode ser quimicamente conjugada ou provida como uma proteína de fusão com a proteína de ligação de KCNQ5(W270L). Para ilustrar, a proteína de ligação de KCNQ5(W270L) pode ser quimicamente reticulada ou geneticamente fundida com peroxidase de raiz forte, e a quantidade de proteína arrastada no complexo pode ser avaliada com um substrato cromogênico da enzima, por exemplo, tetra cloridrato de 3,3'-diamino benzadina ou 4-cloro-1-naftol. Da mesma maneira, uma proteína de fusão compreendendo a proteína e glutathione-S-transferase pode ser provida, e formação de complexo quantificada através de detecção de atividade GST usando 1-cloro-2,4-dinitro benzeno (Habig WH et al., J. Biol. Chem. 249:7130-39 (1974)).

Para processos que baseiam-se em imuno - detecção para quantificação de uma das proteínas arrastadas no complexo, anticorpos contra a proteína, tais como anticorpos anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L), podem ser usados. Alternativamente, a proteína a ser detectada no complexo pode ser "etiquetada em epítopo" na forma de uma proteína de fusão que inclui, em adição à seqüência KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), uma segunda proteína para a qual anticorpos são facilmente disponíveis (por exemplo, de fontes comerciais). Por exemplo, as proteínas de fusão GST descritas acima também podem ser usadas para quantificação de ligação usando anticorpos

contra a metade GST. Outras etiquetas epítomos úteis incluem myc - epítomos (ver, por exemplo, Ellison MJ and Hochstrasser M, J. Biol. Chem. 266:21150-57 (1991)) que inclui uma sequência de 10 resíduos a partir de c-myc, assim como o sistema pFLAG (SigmaAldrich, St. Louis, Mo.) ou o sistema pEZZ-protein A (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Também está dentro do escopo da presente exposição determinar a habilidade de um composto modular a interação entre KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e suas respectivas moléculas alvos sem a marcação de qualquer um dos inter-atuantes. Por exemplo, um microfisiômetro pode ser usado para detectar a interação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) com suas respectivas moléculas alvos sem a marcação de KCNQ5, KCNQ5(W270L), ou as moléculas alvos (ver, por exemplo, McConnell HM et al., Science 257:1906-12 (1992)). Como aqui usado, um "microfisiômetro" (por exemplo, Cytosensor) é um instrumento analítico que mede a taxa na qual uma célula acidula seu ambiente usando um sensor potenciométrico enderável à luz (LAPS). Mudanças nesta taxa de acidulação podem ser usadas como uma indicação da interação entre composto e receptor.

Em adição a ensaios isentos de células, a presente exposição de proteínas KCNQ5 e KCNQ5(W270L) facilita a geração de ensaios baseados em células para identificação de agonistas / antagonistas de molécula pequena e semelhantes. Por exemplo, células podem ser feitas expressarem ou super-expressarem uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na presença e ausência de um agente de modulação teste de interesse, com o ensaio classificando para modulação em respostas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) através de célula alvo mediada pelo agente teste. Por exemplo, como com os ensaios isentos de células, agentes de modulação que produzem uma mudança estatisticamente significativa em respostas dependentes de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (tanto um aumento como diminuição) podem ser identificados.

Vetores de expressão recombinante que podem ser usados para expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) são conhecidos na técnica (ver discussão acima). Em uma realização, dentro de vetor de expressão, as se-

qüências codificantes KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) estão operavelmente ligadas a seqüências reguladoras que permitem expressão constitutiva ou induzível de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na célula(s) indicadora. Uso de um vetor de expressão recombinante que permite expressão constitutiva ou induzível de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula é preferido para identificação de compostos que aperfeiçoam ou inibem a atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Em uma realização alternativa, dentro de vetor de expressão, as seqüências codificantes de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) estão operavelmente ligadas a seqüências reguladoras do gene KCNQ5 endógeno (isto é, a região reguladora promotora derivada do gene endógeno). Uso de um vetor de expressão recombinante no qual expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é controlada pelas seqüências reguladoras endógenas é preferido. Em uma realização, um ensaio é um ensaio baseado em célula compreendendo contato de uma célula expressando uma molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, uma molécula de inter-atuação intracelular KCNQ5) com um composto teste e determinando a habilidade do composto teste para modular (por exemplo, estimular ou inibir) a atividade da molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Determinação de habilidade do composto teste para modular a atividade de uma molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser realizada, por exemplo, através de determinação da habilidade da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ligar a ou interagir com a molécula alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou seu ligante.

Em uma realização ilustrativa, a expressão ou atividade de KCNQ5(W270L) é modulada em células e os efeitos de agentes de modulação de interesse na leitura de interesse pode ser medida (tal como, por exemplo, a magnitude de corrente de íons pode ser medida eletrofisiologicamente a partir de oócitos de *Xenopus laevis* expressando os canais KCNQ5(W270L)).

Em uma outra realização, moduladores de expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) são identificados em um processo onde uma célula é contactada com um composto candidato e a expressão de ARNm ou proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na célula é determinada. O nível de expres-

- são de ARNm ou proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na presença do composto candidato é comparado ao nível de expressão de ARNm ou proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na ausência do composto candidato. O composto candidato então pode ser identificado como um modulador de expressão
- 5 de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) baseado nesta comparação. Por exemplo, quando expressão de ARNm ou proteína de KCNQ5(W270L) é maior (por exemplo, maior estatisticamente significativamente) na presença do composto candidato que em sua ausência, o composto candidato é identificado como um estimulador de expressão de ARNm ou proteína KCNQ5(W270L).
- 10 Alternativamente, quando expressão de ARNm ou proteína KCNQ5(W270L) é menor (por exemplo, menor estatisticamente significativamente) na presença do composto candidato que em sua ausência, o composto candidato é identificado como um inibidor de expressão de ARNm ou proteína KCNQ5(W270L). O nível de expressão de ARNm ou proteína
- 15 KCNQ5(W270L) nas células pode ser determinado através de processos aqui descritos para detecção de ARNm ou proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

- Em uma realização preferida, determinação de habilidade da proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ligar-se a ou interagir com uma molécula
- 20 alvo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser realizada através de medição de uma leitura da atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou da molécula alvo. Por exemplo, a atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou uma molécula alvo pode ser determinada através de detecção de indução de um segundo mensageiro celular do alvo, detectando atividade catalítica / enzimática
- 25 do alvo de um substrato apropriado, detectando a indução de um gene repórter (compreendendo um elemento regulador responsivo alvo ligado operavelmente a um ácido nucléico codificando um marcador detectável, por exemplo, cloranfenicol acetil transferase), ou detectando uma resposta celular regulada - alvo, por exemplo, influxo de Ca^{2+} induzido por bloqueio dos
- 30 canais KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

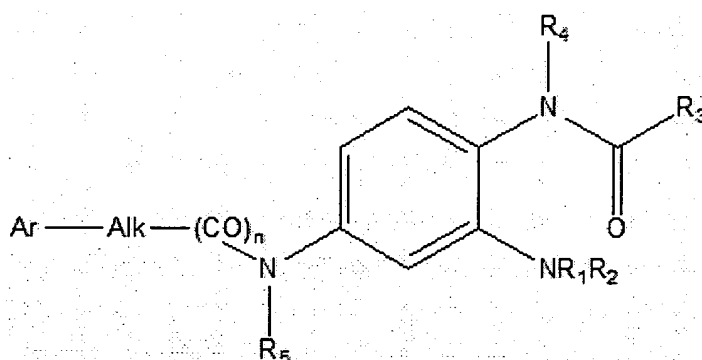
Ainda em um outro aspecto, proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou suas porções podem ser usadas como "proteínas iscas"

em um ensaio de dois híbridos ou um ensaio de três híbridos (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5,283,317; Zervos AS *et al.*, Cell 72:223-32 (1993); Madura K *et al.*, J. Biol. Chem. 268:12046-54 (1993); Bartel P *et al.*, Biotechniques 14:920-24 (1993); Iwabuchi K *et al.*, Oncogene 8:1693-96 (1993); e
5 WO 94/10300) para identificar outras proteínas que se ligam ou interagem com KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e/ou estão envolvidas em atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Tais proteínas de ligação de KCNQ5 também são prováveis de estarem envolvidas na propagação de sinais pelas proteínas KCNQ5 ou alvos KCNQ5 como, por exemplo, elementos à jusantes de
10 um caminho de sinalização mediado por KCNQ5. Alternativamente, tais proteínas de ligação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser inibidores de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

O sistema de dois híbridos é baseado na natureza modular de maioria de fatores de transcrição, que consistem em domínios de ativação e
15 ligação de ADN separáveis. Em resumo, o ensaio utiliza duas diferentes construções de ADN. Em uma construção, o gene que codifica uma proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é fundido a um gene codificando o domínio de ligação de ADN de um fator de transcrição conhecido (por exemplo, GAL-4). A proteína KCNQ5 pode ser um polipeptídeo KCNQ5 que contem um domí-
20 nio transmembrana S5-S6 de KCNQ1. Alternativamente, a proteína KCNQ5 pode ser um polipeptídeo KCNQ5 que contem um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Na outra construção, uma sequência de ADN, de uma biblioteca de seqüências de ADN, que codifica uma proteína não-identificada ("presa" ou "amostra") é fundida a um gene que codifica o domínio de ativa-
25 ção do fator de transcrição conhecido. Se as proteínas "isca" e a "presa" são capazes de interagirem, in vivo, formando um complexo dependente de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), os domínios de ativação e ligação de ADN do fator de transcrição são colocados em proximidade. Esta proximidade permite transcrição de um gene repórter (por exemplo, LacZ) que é operavelmente
30 ligado a um sítio regulador transcricional responsivo ao fator de transcrição. Expressão do gene repórter pode ser detectada e colônias de células contendo o fator de transcrição funcional podem ser isoladas e usadas para ob-

ter o gene clonado que codifica a proteína que interage com a proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Em um aspecto, os agentes identificados são novos análogos de bloqueadores ou ativadores de canal KCNQ conhecidos. Por exemplo, em
 5 uma realização, os agentes identificados são análogos de retigabina. Em uma outra realização exemplar, os agentes identificados são análogos de XE991. Em uma realização exemplar, os agentes são novos análogos de um composto da fórmula:



onde:

10 R_1 é selecionado de hidrogênio, C_1 - C_6 -alquila, C_2 - C_6 -alcanoíla ou o radical Ar;

R_2 é selecionado de hidrogênio ou C_1 - C_6 -alquila;

R_3 é selecionado de C_1 - C_6 -alcoxi, NH_2 , C_1 - C_6 -alquil amino, C_1 - C_6 -dialquil amino, amino substituído com o radical Ar, C_1 - C_6 -alquila, C_2 - C_6 -
 15 alquenila, C_2 - C_6 -alquinila, o radical Ar ou o radical $ArO-$;

R_4 é selecionado de hidrogênio, C_1 - C_6 -alquila ou o radical Ar;

R_5 é selecionado de hidrogênio ou C_1 - C_6 -alquila ou o radical Ar;

Alq é um grupo alquilenos reto ou ramificado com 1-9 átomos de carbono, que também pode estar substituído com o radical Ar;

20 Ar é um radical fenila substituído com os radicais R_6 , R_7 e/ou R_8 onde estes radicais R_6 , R_7 e R_8 são idênticos ou diferentes e representam H, C_1 - C_6 -alquila, C_3 - C_7 -ciclo alquila, hidroxil, C_1 - C_6 -alcoxi, C_2 - C_6 -alcanoiloxil, halogênio, hidroxil, C_1 - C_6 -halogênio alquila, $--CN$, $--NH_2$, $--NH--C_1$ - C_6 -alquila, $--N(C_1$ - C_6 -alquil) $_2$, $--CO_2H$, $--CO--C_1$ - C_6 -alquila, $--CO--O--C_1$ - C_6 -alquila, $--COAr$, $--CO--OAr$, $--CONH_2$, $--CONH--C_1$ - C_6 -alquila, $--CON(C_1$ - C_6 -alquil) $_2$, $--$
 25

CONHAr, --NH--CO--C₁-C₆-alquila, --NHCO--Ar, --NHCO--C₁-C₆-alcoxi, --N--H--CO--Ar, --NHCO--NH₂, --NHCO--N(--C₁-C₆-alquila)₂, --NHCO--NHAr, --NH--SO₂--C₁-C₆-alquila, --NH--SO₂Ar, --NH--SO₂-nitro fenila, --SO₂--OH, --SO₂-C₁-C₆-alquila, --SO₂--Ar, --SO₂-C₁-C₆-alcoxi, --SO₂--OAr, --SO₂--NH₂, --SO₂--NH--C₁-C₆-alquila, --SO₂--N(C₁-C₆-alquila)₂, --SO₂--NHAr, --SO₂--C₂-C₆-alcoxi;

n é 0 ou 1.

Ainda um aspecto pertence a novos agentes identificados através dos ensaios descritos acima. Da mesma maneira, está dentro do escopo da presente exposição ainda usar um agente identificado como aqui descrito em um modelo animal apropriado. Por exemplo, um agente identificado como aqui descrito (por exemplo, um agente de modulação de KCNQ5(W270L), um polinucleotídeo KCNQ5(W270L), um anticorpo específico de KCNQ5(W270L), ou um parceiro de ligação de KCNQ5(W270L) pode ser usado em um modelo animal para determinar a eficácia, toxidez, ou efeitos colaterais de tratamento com um tal agente. Alternativamente, um agente identificado como aqui descrito pode ser usado em um modelo animal para determinar o mecanismo de ação de um tal agente. Além disso, um outro aspecto pertence a usos de novos agentes identificados através dos ensaios descritos acima para tratamentos como aqui descrito.

C. Processos de Desenho Racional de Droga

KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) e polipeptídeos de ligação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usados para desenho racional de droga de candidatos a agentes de modulação de KCNQ5. Os polipeptídeos KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser usados para cristalografia de raio-X de proteína ou outros processos de análise de estrutura, tal como o programa DOCK (ver, Kuntz ID et al., J. Mol. Biol. 161:269-88 (1982); Kuntz ID, Science 257:1078-82 (1992)) e suas variantes. Potenciais drogas terapêuticas podem ser desenhadas racionalmente nas bases de informação estrutural assim provida.

D. Ensaios de Detecção

Porções ou fragmentos das seqüências de ADNc aqui identifica-

das (e as correspondentes seqüência de gene completo) podem ser usados em numerosas maneiras como reagentes polinucleotídeos. Por exemplo, estas seqüências podem ser usadas para: (i) mapear seus respectivos genes sobre um cromossoma e, assim, localizar regiões de gene associadas com doença genética; (ii) identificar um indivíduo a partir de uma amostra biológica diminuta (tipificação de tecido); e (iii) em identificação forense de uma amostra biológica.

E. Medicina Preditiva

Um outro aspecto pertence ao campo de medicina preditiva onde ensaios diagnósticos, ensaios prognósticos, e experimentos clínicos de monitoração são usados para propósitos prognósticos (preditivos) para pelo que tratar profilaticamente um indivíduo. Da mesma maneira, um aspecto refere-se a ensaios diagnósticos para determinação de expressão de ácido nucléico e/ou proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) assim como atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), no contexto de uma amostra biológica (por exemplo, sangue, soro, células, tecido (preferivelmente o cérebro, músculo de esqueleto, ou bexiga urinária)) para pelo que determinar se o indivíduo está afligido com uma doença ou distúrbio, ou está em risco de desenvolver um distúrbio, associado com expressão ou atividade aberrante de KCNQ5. Ainda um aspecto provê ensaios prognósticos (ou preditivos) para determinação de se um indivíduo está em risco de desenvolver um distúrbio associado com expressão ou atividade de ácido nucléico ou proteína KCNQ5. Por exemplo, mutações em um gene KCNQ5 podem ser ensaiadas em uma amostra biológica. Tais ensaios podem ser usados para propósito prognóstico ou preditivo para pelo que tratar profilaticamente um indivíduo antes do início de um distúrbio caracterizado por ou associado com expressão ou atividade de ácido nucléico ou proteína KCNQ5.

Um outro aspecto pertence a monitoração de influência de agentes (por exemplo, drogas, compostos) sobre a expressão ou atividade de KCNQ5 em experimentos clínicos.

Estes e outros agentes são descritos ainda em detalhes nas seções seguintes.

1. Ensaios Diagnósticos

Um processo exemplar para detecção de presença ou ausência de proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma amostra biológica envolve obtenção de uma amostra biológica de um sujeito teste e
5 contato de amostra biológica com um composto ou agente capaz de detectar proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, ARNm, ADN genômico) que codifica proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) de modo que a presença de proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é detectada na amostra biológica. Um agente preferido para detecção de
10 ARNm ou ADN genômico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é uma sonda de ácido nucléico marcada capaz de hibridizar para ARNm ou ADN genômico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). A sonda de ácido nucléico pode ser, por exemplo, um ácido nucléico KCNQ5(W270L), tal como o ácido nucléico de SEQ ID NO: 1, ou uma sua porção, tal como um oligonucleotídeo de pelo menos 12, 15, 30,
15 50, 100, 250, 500 ou mais nucleotídeos em comprimento e suficiente para hibridizar especificamente sob condições rigorosas para ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Outras sondas apropriadas para uso nos ensaios diagnósticos são aqui descritas.

Um agente preferido para detecção de proteína KCNQ5 ou
20 KCNQ5(W270L) é um anticorpo capaz de ligação a proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), preferivelmente um anticorpo com um marcador detectável. Anticorpos podem ser policlonais, ou mais preferivelmente, monoclonais. Um anticorpo intacto, ou um seu fragmento (por exemplo, Fab ou F(ab')₂) pode ser usado. O termo "marcado", com relação à sonda ou anticorpo, é pretendido abranger marcação direta da sonda ou anticorpo através de acoplamen-
25 to (isto é, ligação física) de uma substância detectável à sonda ou anticorpo, assim como marcação indireta da sonda ou anticorpo através de reatividade com um outro reagente que é diretamente marcado. Exemplos de marcação indireta incluem detecção de um anticorpo primário usando um anticorpo
30 secundário marcado fluorescentemente e marcação de extremidade de uma sonda de ADN com biotina de modo que ela possa ser detectada com streptavidina marcada fluorescentemente. O termo "amostra biológica" é preten-

- dido incluir tecidos, células, e fluidos biológicos isolados de um sujeito, assim como tecidos, células (preferivelmente cérebro, músculo de esqueleto, ou bexiga urinária), e fluidos presentes dentro de um sujeito; ou seja, o processo de detecção pode ser usado para detectar ARNm, proteína ou ADN genômico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma amostra biológica in vitro assim como in vivo. Por exemplo, técnicas in vitro para detecção de ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) incluem hibridizações Northern e hibridizações in situ. Técnicas in vitro para detecção de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) incluem ELISAs, Western blots, imunoprecipitação, e imunofluorescência.
- 5 Técnicas in vitro para detecção de ADN genômico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) incluem hibridizações Southern. Além disso, técnicas in vivo para detecção de proteína KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) incluem introdução em um sujeito de um anticorpo anti-KCNQ5 ou anti-KCNQ5(W270L) marcado. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo
- 10 cuja presença e localização em um sujeito podem ser detectadas através de técnicas padrões de formação de imagem.
- 15

Em uma realização, a amostra biológica contém moléculas de proteína do sujeito teste. Alternativamente, a amostra biológica pode conter moléculas de ARNm do sujeito teste ou moléculas de ADN genômico do sujeito teste. Uma amostra biológica preferida é uma amostra de cérebro ou bexiga urinária isolada através de meios padrões a partir de um sujeito.

20

Em uma outra realização, os processos ainda envolvem obtenção de uma amostra biológica controle a partir de um sujeito, contato de amostra controle com um composto ou agente capaz de detectar proteína, ARNm, ou ADN genômico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), de modo que a presença de proteína, ARNm, ou ADN genômico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é detectada na amostra biológica, e comparação de presença de proteína, ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra controle com a presença de proteína, ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra teste.

25

30

Um aspecto também abrange kits para detecção de presença de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma amostra biológica. Por exemplo, o kit

pode compreender um composto ou agente marcado capaz de detecção de proteína ou ARNm KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma amostra biológica; meios para determinação de quantidade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra; e meios para comparação de quantidade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra com um padrão. O composto ou agente pode ser embalado em um recipiente apropriado. O kit ainda pode compreender instruções para uso do kit para detectar proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

2. Ensaios Prognósticos

Os processos diagnósticos aqui descritos além disso podem ser utilizados para identificação de sujeitos tendo ou em risco de desenvolver uma doença ou distúrbio associada com expressão ou atividade aberrante de KCNQ5. Por exemplo, os ensaios aqui descritos, tais como os ensaios diagnósticos anteriores ou os ensaios seguintes, podem ser utilizados para identificar um sujeito tendo ou em risco de desenvolver um distúrbio associado com expressão ou atividade de proteína ou ácido nucléico KCNQ5. Assim, ainda um aspecto provê um processo para identificação de uma doença ou distúrbio associada com expressão ou atividade aberrante de KCNQ5 onde uma amostra teste é obtida de um sujeito e proteína ou ácido nucléico (por exemplo, ARNm, ADN genômico) de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é detectado, onde a presença de proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é diagnóstica para um sujeito tendo ou em risco de desenvolver uma doença ou distúrbio associado com expressão ou atividade aberrante de KCNQ5. Como aqui usado, uma "amostra teste" refere-se a uma amostra biológica obtida de um sujeito de interesse. Por exemplo, uma amostra teste pode ser um fluido biológico (por exemplo, soro), amostra de célula, ou tecido.

Além disso, os ensaios prognósticos aqui descritos podem ser usados para determinar se um sujeito pode ser administrado com um agente (por exemplo, um agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, peptídeo, ácido nucléico, molécula pequena, ou outro candidato a droga) para tratar uma doença ou distúrbio associado com expressão ou atividade aberr-

- rante de KCNQ5. Assim, um outro aspecto provê processos para determinar se um sujeito pode ser efetivamente tratado com um agente para um distúrbio associado com expressão ou atividade aberrante de KCNQ5 onde uma amostra teste é obtida e expressão ou atividade de proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é detectada (por exemplo, onde a abundância de expressão ou atividade de proteína ou ácido nucléico KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) é diagnóstica para um sujeito que pode ser administrado com o agente para tratar um distúrbio associado com expressão ou atividade aberrante de KCNQ5).
- Os processos também podem ser usados para detecção de alterações genéticas em um gene KCNQ5, pelo que determinando se um sujeito com o gene alterado está em risco para um distúrbio associado com o gene KCNQ5. Em realizações preferidas, o processos incluem detecção, em uma amostra de células do sujeito, a presença ou ausência de uma alteração genética caracterizada por pelo menos uma de uma alteração afetando a integridade de um gene codificando uma proteína KCNQ5 ou a expressão errônea do gene KCNQ5. Por exemplo, tais alterações genéticas podem ser detectadas por verificação de existência de pelo menos uma de 1) uma supressão de um ou mais nucleotídeos de um gene KCNQ5; 2) uma adição de um ou mais nucleotídeos a um gene KCNQ5; 3) uma substituição de um ou mais nucleotídeos de um gene KCNQ5; 4) um rearranjo cromossômico de um gene KCNQ5; 5) uma alteração no nível de transcrito de ARN mensageiro de um gene KCNQ5; 6) modificação aberrante de um gene KCNQ5, tal como o padrão de metilação do ADN genômico; 7) a presença de um padrão de união tipo não-selvagem de um transcrito de ARN mensageiro de um gene KCNQ5; 8) um nível tipo não-selvagem de uma proteína KCNQ5; 9) perda alélica de um gene KCNQ5; e 10) modificação pós-traducional imprópria de uma proteína KCNQ5. Como aqui descrito, existe um grande número de de ensaio conhecidas que podem ser usadas para detecção de alterações em um gene KCNQ5. Uma amostra biológica preferida é uma amostra de tecido isolada através de meios padrões a partir de um sujeito, por exemplo, uma amostra de cérebro, ou bexiga urinária. A detecção pode ser realizada

com pelo menos um de uma sonda ou um iniciador compreendendo pelo menos 12 nucleotídeos contíguos a partir de um polinucleotídeo KCNQ5. Preferivelmente, o polinucleotídeo KCNQ5 codifica todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L), codifica um polipeptídeo KCNQ5 contendo
 5 um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1, ou codifica um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1. Mais preferivelmente, a sonda ou iniciador compreende pelo menos 12 nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO: 1 incluindo nucleotídeos 808-810.

Em certas realizações, detecção da alteração envolve o uso de
 10 uma sonda / iniciador em PCR (ver, por exemplo, patente U.S. 4 683 195 e 4 683 202), tal como PCR âncora ou RACE PCR, ou, alternativamente, em uma reação de cadeia de ligação (LCR) (ver, por exemplo, Landegren U et al., Science 241:1077-80 (1988); Nakazawa H et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-64 (1994)), a última das quais pode ser particularmente útil para
 15 detecção de mutações de ponto no gene KCNQ5 (ver, por exemplo, Abravaya K et al., Nucleic Acids Res. 23:675-82 (1995)). Este processo pode incluir as etapas de coleta de uma amostra de células de um paciente, isolamento de ácido nucléico (por exemplo, genômico, ARNm, ou ambos) a partir das células da amostra, contato de amostra de ácido nucléico com um ou mais
 20 iniciadores que hibridizam especificamente para um gene KCNQ5 sob condições tais que hibridização e amplificação do gene KCNQ5 (se presente) ocorrem, e detecção de presença ou ausência de um produto de amplificação, ou detecção de tamanho do produto de amplificação e comparação de comprimento a uma amostra controle. É antecipado que PCR e/ou LCR po-
 25 de ser desejável para uso como uma etapa de amplificação preliminar em conjunção com qualquer uma das técnicas usadas para detecção de mutações aqui descritas.

Processos de amplificação alternativos incluem, por exemplo, replicação de seqüência auto - sustentada (Guatelli JC et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-78 (1990)), transcriptional amplification system (Kwoh
 30 DY et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-77 (1989)), Q-Beta Replicase (Lizardi PM et al., Biotechnology (N.Y.) 6:1197 (1988)), ou qualquer outro

processo de amplificação de ácido nucléico, seguido por detecção das moléculas amplificadas usando técnicas bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Estes esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção de moléculas de ácido nucléico se tais moléculas estão presentes em números muito baixos.

Em uma realização alternativa, mutações em um gene KCNQ5 de uma amostra de células pode ser identificado através de alterações em padrões de clivagem de enzima de restrição. Por exemplo, amostra e ADN controle são isolados, amplificados (opcionalmente), digeridos com uma ou mais endonucleases de restrição, e tamanhos de comprimento de fragmento são determinados por eletroforese de gel e comparados. Diferenças em tamanhos de comprimento de fragmento entre amostra e ADN controle indicam mutações no ADN amostra. Além disso, ribozimas específicas de sequência (ver, por exemplo, patente U.S 5 498 531) podem ser usadas para classificar a presença de específicas mutações através de desenvolvimento ou perda de um sítio de clivagem de ribozima.

Em outras realizações, mutações genéticas em KCNQ5 podem ser identificadas através de hibridização de uma amostra e ácidos nucléicos controles, por exemplo, ADN ou ARN, para arranjos de alta densidade contendo centenas ou milhares de sondas de oligonucleotídeos (Cronin MT et al., Hum. Mutat. 7:244-55 (1996); Kozal MJ et al., Nat. Med. 2:753-59 (1996)). Por exemplo, mutações genéticas em KCNQ5 podem ser identificadas em arranjos bidimensionais contendo sondas ADN geradas com luz como descrito em Cronin MT et al. (supra). Resumidamente, um primeiro arranjo de hibridização de sondas pode ser usado para exploração através de longos estiramentos de ADN em uma amostra e controle para identificação de mudanças de bases entre as seqüências através de fabricação de arranjos lineares de sondas de sobreposição seqüencial. Esta etapa permite a identificação de mutações de ponto. Esta etapa é seguida por um segundo arranjo de hibridização que permite a caracterização de específicas mutações através do uso de arranjos de sondas especializados, menores, complementares para todas as variantes ou mutações detectadas. Cada arranjo

de mutação é composto por conjuntos de sondas paralelas, um complementar para o gene tipo selvagem e o outro complementar para o gene mutante.

Ainda em uma outra realização, qualquer uma de uma variedade de reações de seqüenciamento conhecidas na técnica pode ser usada para

5 seqüenciar diretamente o gene KCNQ5 e detectar mutações através de comparação de seqüência da amostra de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) com a correspondente seqüência tipo selvagem (controle). Exemplos de reações de seqüenciamento incluem aquelas baseadas em técnicas desenvolvidas por Maxam AM e Gilbert W., Proc. Natl. Acad. Ci. USA 74:560-64 (1977) ou

10 Sanger F et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-67 (1977). Também é contemplado que qualquer um de uma variedade de procedimentos de seqüenciamento pode ser utilizado quando realizando os ensaios diagnósticos (ver, por exemplo, Naeve CW et al., Biotechniques 19:448-53 (1995)), incluindo seqüenciamento através de espectrometria de massa (ver, por exemplo,

15 Naeve CW et al., Biotechniques 19:448-53 (1995)), incluindo seqüenciamento por espectrometria de massa (ver, por exemplo, WO 94/16101; Cohen AS et al., Adv. Chromatogr. 36:127-62 (1996); and Griffin HG and Griffin AM, Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-59 (1993)).

Outros processos para detecção de mutações no gene KCNQ5

20 incluem processos nos quais proteção a partir de agentes de clivagem é usada para detectar bases desemparelhadas em hetero - duplexes ARN / ARN ou ARN / ADN (Myers RM et al., Science 230:1242-46 (1985)). Em geral, a técnica de "clivagem de desemparelhamento" começa através de provimento de hetero - duplexes formados através de hibridização de ARN ou

25 ADN (marcados) contendo a seqüência KCNQ5 tipo - selvagem com ARN ou ADN potencialmente mutante obtido de uma amostra de tecido. Os duplexes de fita dupla são tratados com um agente que cliva regiões de fita simples do duplex tais como as que existirão devido a desemparelhamento de pares de bases entre as fitas de amostra e controle. Por exemplo, duplexes de ARN /

30 ADN podem ser tratados com RNase e híbridos ADN / ADN tratados com S1 nuclease para digerir enzimaticamente as regiões desemparelhadas. Em outras realizações, duplexes ADN / ADN ou ARN / ADN podem ser tratados

com hidroxilamina ou teróxido de ósmio e com piperidina de modo a digerir regiões desemparelhadas. Após digestão das regiões desemparelhadas, o material resultante é então separado por tamanho sobre géis de poliacrilamida desnaturantes para determinar o sítio de mutação (ver, por exemplo, 5 Cotton RGH *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401 (1988); Saleeba JA and Cotton RGH, Meth. Enzymol. 217:286-95 (1993)). Em uma realização preferida, o ADN ou ARN controle pode ser marcado para detecção. Ainda em uma outra realização, a reação de clivagem de desemparelhamento emprega uma ou mais proteínas que reconhecem pares de bases desemparelhados em ADN de fita dupla (as assim chamadas enzimas de "reparo de 10 desemparelhamento de ADN") em sistemas definidos para detecção e mapeamento de mutações de ponto em KCNQ5 obtido de amostras de células. Por exemplo, a enzima mutY de E.coli cliva A em desemparelhamentos G/A e a timidina ADN glicosilase de células HeLa cliva T em desemparelhamentos 15 G/T (Hsu IC *et al.*, Carcinogenesis 15:1657-62 (1994)). De acordo com uma realização exemplar, uma sonda baseada em uma sequência KCNQ5(W270L), por exemplo, SEQ ID NO: 1, é hibridizada para um ADNc ou outro produto ADN a partir de uma célula(s) teste. O duplex é tratado com uma enzima de reparo de desemparelhamento de ADN, e os produtos de 20 clivagem, se algum, podem ser detectados a partir de protocolos de eletroforese ou semelhantes (ver, por exemplo, patente U.S. 5 459 039).

Em outras realizações, alterações em mobilidade eletroforética serão usadas para identificar mutações em genes KCNQ5. Por exemplo, polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) pode ser usado para 25 detectar diferenças em mobilidade eletroforética entre ácidos nucleicos mutantes e tipos selvagens (Orita M *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci USA: 86:2766-70 (1989); see also, Cotton RGH, Mutat. Res. 285:125-44 (1993); Hayashi K, Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79 (1992)). Fragmentos de ADN de ácidos nucleicos KCNQ5 controle e KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) amostras serão 30 desnaturados e deixados renaturar. A estrutura secundária de ácidos nucleicos de fita simples varia de acordo com sequência; a resultante alteração em mobilidade eletroforética permite a detecção de mesmo uma simples mu-

dança de base. Os fragmentos de ADN podem ser marcados ou detectados com sondas marcadas. A sensibilidade do ensaio pode ser aperfeiçoada através de uso de ARN (antes que ADN), onde a estrutura secundária é mais sensível a uma mudança em seqüência. Em uma realização preferida, o presente processo utiliza análise de heteroduplex para separar moléculas de heteroduplex de fita dupla nas bases de mudanças em mobilidade eletroforética (Keen J et al., Trends Genet. 7:5 (1991)).

Ainda em uma outra realização, o movimento de fragmentos mutantes ou tipos selvagens em géis de poliacrilamida contendo um gradiente de desnaturante é avaliado usando eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE) ((Myers RM et al., Nature 313:495-98 (1985)). Quando DGGE é usado como o processo de análise, ADN será modificado para assegurar que ele não desnature completamente, por exemplo, através de adição de um grampo GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico em GC de alta fusão através de PCR. Ainda em uma realização, um gradiente de temperatura é usado no lugar de um gradiente de desnaturação para identificação de diferenças na mobilidade de ADN controle e amostra (Rosenbaum V and Riesner D, Biophys. Chem. 26:235-46 (1987)).

Exemplos de outras técnicas para detecção de mutação de ponto incluem, mas não são limitadas a, hibridização de oligonucleotídeo seletiva, amplificação seletiva, ou extensão de primer seletiva. Por exemplo, primers oligonucleotídeos podem ser preparados nos quais a mutação conhecida é colocada centralmente e então hibridizada para ADN alvo sob condições que permitem hibridização somente se um perfeito emparelhamento é verificado (Saiki RK et al., Nature 324:163-66 (1986); Saiki RK et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230-34 (1989)). Tais oligonucleotídeos específicos de alelo são hibridizados para ADN alvo amplificado por PCR ou um número de diferentes mutações quando os oligonucleotídeos são ligados à membrana hibridizante e hibridizados com ARN alvo marcado.

Alternativamente, tecnologia de amplificação específica de alelo que depende de amplificação PCR seletiva pode ser usada em conjunção com as composições e processos mostrados. Oligonucleotídeos usados co-

mo iniciadores para amplificação específica podem transportar a mutação de interesse no centro da molécula (de modo que amplificação depende de hibridização diferencial) (Gibbs RA et al., *Nucleic Acid Res.* 17:2437-48 (1989)) ou na extremidade 3' extrema de um iniciador onde, sob condições

5 apropriadas, desemparelhamento pode prevenir, ou reduzir extensão de polimerase (Prosser J, *Trends Biotechnol.* 11:238-46 (1993)). Em adição, pode ser desejável introduzir-se um novo sítio de restrição na região da mutação para criar detecção baseada em clivagem (Gasparini P et al., *Mol. Cell. Probes* 6:1-7 (1992)). É antecipado que em certas realizações amplificação

10 também pode ser realizada usando Taq ligase para amplificação (Barany F, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189-93 (1991)). Em tais casos, ligação somente ocorrerá se existir um perfeito emparelhamento na extremidade 3' da sequência 5' tornando possível detectar a presença de uma mutação conhecida em um sítio específico através de procura pela presença ou ausência de

15 amplificação.

Os processos aqui descritos podem ser realizados, por exemplo, através de utilização de kits diagnósticos pré-embalados compreendendo pelo menos um ácido nucléico sonda ou reagente anticorpo aqui descrito, que pode ser convenientemente usado, por exemplo, em instalações clínicas

20 para diagnóstico de pacientes exibindo sintomas ou história familiar de uma doença envolvendo um gene KCNQ5.

Além disso, qualquer tipo de célula ou tecido no qual KCNQ5 seja expresso pode ser utilizado nos ensaios prognósticos aqui descritos.

VI. Administração de Agentes de Modulação de KCNQ5

25 Agentes de modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) são administrados aos sujeitos em uma forma biologicamente compatível apropriada para administração farmacêutica in vivo para tratar, por exemplo, condições descritas em seção V, supra. Por "forma biologicamente compatível apropriada para administração in vivo" é pretendida uma forma da proteína a

30 ser administrada na qual quaisquer efeitos tóxicos são superados pelos efeitos terapêuticos da proteína. O termo "sujeito" é pretendido incluir organismos vivos nos quais uma resposta imuno pode ser elicitada, por exemplo,

mamíferos. Administração de um agente como aqui descrito pode ser em qualquer forma farmacológica incluindo uma quantidade terapeuticamente ativa de um agente sozinho ou em combinação com um carreador farmacologicamente aceitável.

- 5 Administração de uma quantidade terapeuticamente ativa das composições terapêuticas é definida como uma quantidade efetiva, em dosagens e por períodos de tempo necessários para obtenção de resultado desejado. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente ativa de um agente de modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode variar de acordo com
- 10 fatores tais como o estado de doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a habilidade de peptídeo elicitar uma desejada resposta no indivíduo. Regime de dosagem pode ser ajustado para prover a ótima resposta terapêutica. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida quando indicado pelas exigências da situação terapêutica..
- 15

- As composições terapêuticas ou farmacêuticas podem ser administradas através de qualquer rota apropriada conhecida na técnica incluindo, por exemplo, administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, transdérmica, intratecal ou intracerebral ou administração a células em protocolos de tratamento ex vivo. Administração pode ser rápida como através de injeção ou sobre um período de tempo como através de infusão lenta ou administração de formulação de liberação lenta.
- 20

- KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) também pode ser ligado ou conjugado com agentes que proporcionam desejáveis propriedades farmacêuticas ou fármaco - cinéticas. Por exemplo, KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser
- 25 acoplado a qualquer substância conhecida na técnica para promover penetração ou transporte através de barreira de sangue - cérebro tal como um anticorpo para o receptor de transferrina, e administrado através de injeção intravenosa (ver, por exemplo, Friden PM et al., Science 259:373-77 (1993)).
- 30 Além disso, KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser estavelmente ligado a um polímero tal como polietileno glicol para obter desejáveis propriedades de solubilidade, estabilidade, meia-vida, e outras propriedades farmacêutica-

mente vantajosas (ver, por exemplo, Davis *et al.*, Enzyme Eng. 4:169-73 (1978); Burnham NL, Am. J. Hosp. Pharm. 51:210-18 (1994)).

Além disso, um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode estar em uma composição que auxilia em liberação no citosol de uma célula.

- 5 Por exemplo, o peptídeo pode ser conjugado com uma metade carreadora tal como uma lipossoma que é capaz de liberar o peptídeo no citosol de uma célula. Tais processos são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Amselem S et al., Chem. Phys. Lipids 64:219-37 (1993)). Alternativamente, um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser modificado para incluir
- 10 específicos peptídeos trânsito ou fundidos a tais peptídeos trânsito que são capazes de liberarem seu polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma célula. Em adição, o polipeptídeo pode ser liberado diretamente em uma célula através de microinjeção.

- As composições são usualmente empregadas na forma de pre-
- 15 parações farmacêuticas. Tais preparações são fabricadas em uma maneira bem conhecida na técnica farmacêutica. Uma preparação preferida utiliza um veículo de solução salina fisiológica, mas é contemplado que outros carreadores farmaceuticamente aceitáveis tais como concentrações fisiológicas de outros sais não-tóxicos, solução aquosa cinco por cento de glicose, água
- 20 estéril, ou semelhantes também podem ser usados. Como aqui usado, "carreador farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes anti-bactérias e anti - fungos, agentes isotônicos e de retardo de absorção, e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Exceto tanto quanto quaisquer meios padrões ou agente se-
- 25 jam incompatíveis com o composto ativo, seu uso nas composições terapêuticas é contemplado. Compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. Também pode ser desejável que um apropriado tampão esteja presente na composição. Tais soluções podem, se de-
- 30 sejado, ser liofilizadas em uma ampola estéril pronta para reconstituição através de adição de água estéril para fácil injeção. O solvente primário pode ser aquoso ou alternativamente não-aquoso. KCNQ5 ou KCNQ5(W270L)

também pode ser incorporado a uma matriz compatível biologicamente sólida ou semi - sólida que pode ser implantada em tecidos requerendo tratamento.

O carreador também pode conter outros excipientes farmacêuticamente aceitáveis para modificação ou manutenção de pH, osmolalidade, viscosidade, claridade, cor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução, ou odor da formulação. Similarmente, o carreador pode conter ainda outros excipientes farmacêuticamente aceitável para modificação ou manutenção de liberação ou absorção ou penetração através de barreira de sangue - cérebro. Tais excipientes são aquelas substâncias usual e costumeiramente empregadas para formulação de dosagens para administração parenteral em dosagem unitária ou forma de dosagem múltipla ou para infusão direta através de infusão contínua ou periódica.

Administração de dose pode ser repetida dependendo dos parâmetros fármaco - cinéticos da formulação de dosagem e a rota de administração usada.

É também provido que certas formulações contendo um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou seu fragmento são para serem administradas oralmente. Tais formulações são preferivelmente encapsuladas e formuladas com apropriados carreadores em formas de dosagem sólida. Alguns exemplos de apropriados carreadores, excipientes, e diluentes incluem lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, alginatos, silicato de cálcio, celulose micro - cristalina, polivinil pirrolidona, celulose, gelatina, xarope, metil celulose, hidroxibenzoato de metila e propila, talco, magnésio, estearato, água, óleo mineral, e semelhantes. As formulações adicionalmente podem incluir agentes lubrificantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, agentes preservativos, agentes adoçantes, ou agentes aromatizantes. As composições podem ser formuladas de modo a proverem liberação rápida, sustentada, ou retardada dos ingredientes ativos após administração ao paciente através de emprego de procedimentos bem conhecidos na técnica. As formulações também podem conter substâncias que diminuem degradação proteolítica

e/ou substâncias que promovem absorção tais como, por exemplo, agentes tensoativos.

É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma unitária de dosagem como aqui usado refere-se a unidades fisicamente discretas apropriadas como dosagens unitárias para os sujeitos mamíferos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o desejado efeito terapêutico em associação com o requerido carreador farmacêutico. A especificação para as formas unitárias de dosagem é ditada por e diretamente dependente de (a) as características únicas do composto ativo e o particular efeito terapêutico a ser obtido e (b) as lãs limitações inerentes na técnica de composição de um tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos. A específica dose pode ser facilmente calculada por aqueles versados na técnica, por exemplo, de acordo com peso de corpo aproximado ou área de superfície do paciente ou o volume de espaço do corpo a ser ocupado. A dose também será calculada dependente da particular rota de administração selecionada. Ainda refinamento dos cálculos necessários para determinar a dosagem aproximada para tratamento é tornado rotineiro por aqueles versados na técnica. Tais cálculos podem ser feitos sem indevida experimentação por aqueles versados na técnica à luz da atividade aqui mostrada em preparações ensaios de células alvos. Dosagens exatas são determinadas em conjunção com estudos padrões de dose - resposta. Será entendido que a quantidade da composição realmente administrada será determinada por um praticante, à luz das circunstâncias relevantes incluindo a condição ou condições a serem tratadas; a escolha de composição a ser administrada; a idade, peso e resposta do paciente individual; a severidade dos sintomas do paciente; e a rota de administração escolhida.

Toxidez e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinação da LD50 (a dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapeuticamente

efetiva em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e ele pode ser expresso como a razão LD50/ED50. Compostos que exibem grandes índices terapêuticos são preferidos. Embora compostos que exibem efeitos colaterais tóxicos possam ser usados, deve ser tomado cuidado para desenho de um sistema de liberação que alveja tais compostos para o sítio de tecido afetado de modo a minimizar potencial dano para células não-afetadas e, pelo que, reduzir efeitos colaterais.

Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e estudos animais podem ser usados em formulação de uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem de tais compostos cai preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED50 com pequena ou nenhuma toxidez. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e a rota de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos processos aqui mostrados, a dose terapeuticamente efetiva pode ser inicialmente estimada a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para obtenção de uma faixa de concentração de plasma circulante que inclui a IC50 (isto é, a concentração do composto teste que obtém uma inibição meio - máxima de sintomas) como determinado em cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinação mais precisa de doses úteis em humanos. Níveis em plasma podem ser medidos, por exemplo, através de cromatografia líquida de alta performance.

Em uma realização, um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser terapeuticamente administrado através de implante em pacientes de vetores ou células capazes de produzirem uma forma biologicamente ativa de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou um precursor de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), ou seja, uma molécula que pode ser facilmente convertida em uma forma biológica ativa de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pelo corpo.

Em uma abordagem, células que secretam KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser encapsuladas em membranas semi - permeáveis para implante em um paciente. As células podem ser células que expressam

normalmente KCNQ5 ou um seu precursor ou as células podem ser transformadas para expressarem KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou um seu fragmento biologicamente ativo ou um seu precursor. É preferido que a célula seja de origem humana. Entretanto, as formulações e processos aqui podem
5 ser usados para aplicações veterinárias assim como humanas e o termo "paciente " ou "sujeito" como aqui usado é pretendido incluir pacientes humanos e veterinários.

Monitoração de influência de agentes (por exemplo, drogas ou compostos) sobre a expressão ou atividade de uma proteína KCNQ5 ou
10 KCNQ5(W270L) pode ser aplicada não somente em seleção de droga básica, mas também em experimentos clínicos. Por exemplo, a eficácia de um agente determinada através de um ensaio de seleção como aqui descrito para aumentar expressão de gene KCNQ5, níveis de proteínas, ou atividade de KCNQ5 regulada ascendentemente pode ser monitorada em experimen-
15 tos clínicos de sujeitos exibindo diminuída expressão de gene KCNQ5, níveis de proteína, ou atividade de KCNQ5 regulada descendentemente. Alternativamente, a eficácia de um agente determinada por um ensaio de seleção para diminuir expressão de gene KCNQ5, níveis de proteína, ou regular descendentemente atividade de KCNQ5 pode ser monitorada em experi-
20 mentos clínicos de sujeitos exibindo aumentada expressão de gene KCNQ5, níveis de proteína ou atividade de KCNQ5 regulada ascendentemente. Em tais experimentos clínicos, a expressão ou atividade de um gene KCNQ5, e preferivelmente, outros genes que foi implicada em um distúrbio, pode ser usada como uma "leitura" ou marcadores do fenótipo de uma particular célula.
25

Por exemplo, e não por limitação, genes, incluindo, KCNQ5, que são modulados em células através de tratamento com um agente (por exemplo, composto, droga, ou molécula pequena) que modula atividade KCNQ5 (por exemplo, identificado em um ensaio de seleção como aqui des-
30 crito) podem ser identificados. Assim, para estudar o efeito de agentes sobre um distúrbio associado com KCNQ5, por exemplo, em um experimento clínico, células podem ser isoladas e ARN preparado e analisado para os níveis

de expressão de KCNQ5 e outros genes implicados no distúrbio associado com KCNQ5, respectivamente. Os níveis de expressão de gene (isto é, um padrão de expressão de gene) podem ser quantificados através de análises de Northern blot ou RT-PCR, como aqui descrito, ou alternativamente através de medição de quantidade de proteína produzida, através de um dos processos como aqui descritos, ou através de medição de níveis de atividade de KCNQ5 ou outros genes. Desta maneira, o padrão de expressão de gene pode servir como um marcador, indicativo da resposta fisiológica das células para o agente. Da mesma maneira, este estado de resposta pode ser determinado antes, e em vários pontos durante, tratamento do indivíduo com o agente.

Uma realização preferida provê um processo para monitoração de eficácia de tratamento de um sujeito com um agente (por exemplo, um agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, peptídeo, ácido nucléico, molécula pequena, ou outro candidato a droga identificado pelos ensaios de seleção aqui descritos) compreendendo as etapas de (i) obtenção de uma amostra de pré-administração a partir de um sujeito antes de administração do agente; (ii) detecção de nível de expressão de uma proteína, ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra de pré-administração; (iii) obtenção de uma ou mais amostras de pós-administração a partir do sujeito; (iv) detecção de nível de expressão ou atividade da proteína, ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) nas amostras de pós-administração; (v) comparação de nível de expressão ou atividade da proteína, ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra de pré-administração com a proteína, ARNm ou ADN genômico de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) na amostra ou amostras de pós-administração; e (vi) alteração de administração do agente para o sujeito da mesma maneira. Por exemplo, aumentada administração do agente pode ser desejável para aumentar a expressão ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para níveis maiores que o detectado, ou seja, para aumentar a eficácia do agente. Alternativamente, diminuída administração do agente pode ser desejável para diminuir expressão ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para

níveis menores do que detectado, ou seja, para diminuir a eficácia do agente. De acordo com uma tal realização, expressão ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) pode ser usada como um indicador da eficácia de um agente, mesmo na ausência de uma resposta fenotípica observável.

- 5 Em uma realização preferida, a habilidade de um agente de modulação de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) para modular, por exemplo, condições descritas na seção V (supra) em um sujeito que podem se beneficiar de modulação da expressão e/ou atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser medidas através de detecção de um aperfeiçoamento na condição
- 10 do paciente após a administração do agente. Tal aperfeiçoamento pode ser facilmente medido por aqueles versados na técnica usando indicadores apropriados para a específica condição do paciente. Monitoração da resposta do paciente através de medição de mudanças na condição do paciente é preferida em situações onde a coleta de materiais de biópsia pode possuir
- 15 um aumentado risco e/ou prejuízo para o paciente.

É provável que o nível de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) possa ser alterado em uma variedade de condições e que quantificação de níveis de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) possa prover informação clinicamente útil.

- Além disso, no tratamento de condições de doença, composições contendo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) podem ser administradas exogenamente, e pode ser provavelmente desejável obter-se certos níveis alvos de polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em soro, em qualquer compartimento de tecido desejado, ou no tecido afetado. Por isso, pode ser vantajoso ser capaz de monitorar os níveis de polipeptídeo KCNQ5 ou
- 20 KCNQ5(W270L) em um paciente ou em uma amostra biológica incluindo uma amostra de biópsia de tecido obtida de um paciente e, em alguns casos, também monitorando os níveis de KCNQ5 nativos. Da mesma maneira, um outro aspecto prevê processos para detecção de presença de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em uma amostra do paciente.

30 VII. Kits da Invenção

Um outro aspecto pertence a kits para realização de ensaios de seleção, processos moduladores, ou ensaios diagnósticos. Por exemplo, um

kit para realização de um ensaio de seleção pode incluir uma célula compreendendo um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), meios para determinação de atividade de polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), e, opcionalmente, instruções para uso de kit para identificar moduladores de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L). Em uma outra realização, um kit para realização de um ensaio de seleção pode incluir uma composição compreendendo um polipeptídeo KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), meios para determinação de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), e, opcionalmente, instruções para uso do kit para identificar moduladores de atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Uma outra realização provê um kit para realização de um processo modulador. O kit pode incluir, por exemplo, um agente modulador (por exemplo, um agente inibidor ou estimulador de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) em um carreador apropriado e embalado em um recipiente apropriado opcionalmente com instruções para uso do modulador para modular atividade de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L).

Um outro aspecto pertence a um kit para diagnóstico de um distúrbio associado com expressão e/ou atividade aberrante de KCNQ5 em um sujeito. O kit pode incluir um reagente para determinação de expressão de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) (por exemplo, uma sonda(s) de ácido nucleico para detecção de ARNm de KCNQ5 ou KCNQ5(W270L) ou um ou mais anticorpos para detecção de proteínas KCNQ5 ou KCNQ5(W270L), um controle para o qual os resultados do sujeito são comparados, e, opcionalmente, instruções para uso do kit para propósitos diagnósticos.

A prática dos processos aqui mostrados empregará, a menos que de outro modo indicado, técnicas padrões de biologia celular, cultura de células, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, ADN recombinante, e imunologia, que estão dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são inteiramente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed.,

- 1984); U.S. Patent No. 4,683,195; 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
 5 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.), Immuno-
 10 chemical 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 C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Exemplos

- 15 A presente exposição é ainda definida nos exemplos que se seguem. Deve ser entendido que estes exemplos, embora indicando realizações preferidas, são dados somente a título de ilustração. A partir da discussão acima e estes exemplos, aqueles versados na técnica podem determinar as preferidas características, e sem fugir de seu espírito e escopo, pode fazer
 20 várias mudanças e modificações para adaptá-la a vários usos e condições.

Procedimentos Genéricos

- Expressão de canais de KCNQ5 e KCNQ1 em oócitos de *Xenopus* - genes KCNQ5 e KCNQ1 humanos foram clonados em um vetor pKSM
 25 que foi engenheirado especificamente para expressão em oócito. As seqüências de gene foram confirmadas por seqüenciamento de ADN. Os números de acesso de banco de gene são: KCNQ5, NM_019842 (SEQ ID NO: 3); KCNQ1, U89364.1 (SEQ ID NO: 7). As construções foram linearizadas por enzima de restrição XbaI (NEB, Beverly, MA). Transcrição in vitro foi realizada com um kit mMMESSAGE mMACHINE (Ambion, Austin, TX) e o ARNc
 30 foi purificado por extração com fenol. Oócitos de *Xenopus* foram injetados com 46 nL de solução contendo aproximadamente 9,2 ng de ARNc usando

um injetor de oócito Drummond Nanojet (Drummond Scientific Co., Broomall, PA). Gravação eletrofisiológica foi realizada 3-7 dias após injeção.

5 Eletrofisiologia - Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (22-23°C) usando gravação de grampo de voltagem de dois eletrodos de oócito convencional (TEVC). Os eletrodos de gravação foram retirados de pipeta de vidro de 1,5 mm usando um retirador de micropipeta Sutter P-97 (Sutter Instrument, Novato, CA) e enchidos com KCl 3M. A ponta de pipeta foi cuidadosamente quebrada para adquirir a resistência de eletrodo em 0,5-1 Mohm. Um amplificador Dagan CA-1 (Dagan Corporation, 10 Minneapolis, MN) foi usado e o potencial de retenção foi grampeado em -100 mV. Para testar dependência de voltagem de ativação de canal, uma série de pulsos de voltagem despolarizados foi aplicada. Para observar o curso de tempo de efeito de retigabina, um pulso de voltagem simples (3 s) em 40 mV foi aplicado repetidamente em intervalos de 15 s. Uma interface de computador HEKA (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) com software Pulse 8.5 foi 15 usada para controlar o amplificador e digitou os dados para análise.

Soluções e Compostos Químicos - Solução ND96 contendo (em mM) NaCl, 96, KCl, 2, CaCl₂, 1,8, MgCl₂, 1, HEPES, 10, foi usada para incubação de oócito e gravação. Retigabina foi fabricado como uma solução estoque em DMSO em 50 mM e diluído nas desejadas concentrações justo 20 antes de aplicação em experimentos. DMSO foi testado sobre canais de KCNQ5 e nenhum efeito foi observado até 1%. Em todos os experimentos, DMSO foi usado menos que 0,4%.

Compostos foram aplicados às células via um sistema de perfusão de banho rápido (ALA Scientific Instruments, Westbury, NY), e uma mudança de solução de banho foi completada dentro de 10 segundos. 25

Análises de Dados - Amplitude de corrente foi medida em linha usando HEKA Pulsefit 8.5 software. Para adquirir condutância de canal a partir de corrente macroscópica, o potencial reverso de K⁺ foi aproximado ser 30 -80 mV em solução ND96 e a seguinte equação foi aplicada: $G = I/(V+80)$, onde G é a condutância de oócito integral, I é a corrente de oócito integral e V é a voltagem usada para induzir a corrente. Dados foram expressos como

média $\pm$ SE, e o teste t de student emparelhado foi realizado. Diferenças foram consideradas serem significantes em $P < 0,05$.

Exemplo 1

Para fabricar o polinucleotídeo KCNQ5 contendo uma região S5-S6 de KCNQ1 (codificando SEQ ID NO: 6, aminoácidos S253-V355 de SEQ ID NO: 8), um par de oligoprimers flanqueando a região S5-S6 de gene KCNQ1 foi usado para obter o fragmento de ADN de KCNQ1. Ambos primers contêm seqüências de ADN introduzidas em cada extremidade que sobrepõem a seqüência de gene KCNQ5 em correspondentes áreas de junção à montante de S5 e à jusante de S6. O produto de PCR usando estes primers plus a construção de KCNQ1 como um molde foi purificado e usado como iniciadores de mutagênese direcionada a sítio para segundo round de PCR com a construção KCNQ5 como um molde. Mutagênese direcionada a sítio usando o protocolo QuickChange foi então aplicada (Stratagene, La Jolla, CA). as mutações foram confirmadas por seqüenciamento de ADN.

O efeito de retigabina sobre a quimera funcional (KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1) foi testado. Como mostrado na Figura 1A e 1B, retigabina 50 μ M não aumentou mais as atividades de canal. Durante um período de aplicação de 5 minutos, nem amplitude de corrente nem ativação dependente de voltagem mudou significativamente (Figura 1C). A dramática interrupção de ação de retigabina sobre este canal quimérico sugeriu que o sítio de ação de retigabina em KCNQ5 foi mais provavelmente localizado na região de domínio transmembrana S5-S6.

Exemplo 2

Para ainda dissecar o sítio de ação de retigabina, o domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1 foi dividido em duas partes, o domínio transmembrana S5 e o domínio transmembrana S6 (com ligador), e os correspondentes canais quiméricos de KCNQ5 contiveram domínio transmembrana S5 ou domínio transmembrana S6 de KCNQ1. O canal quimérico com domínio transmembrana S6 trocado não mostrou corrente no potencial de membrana variando de -100 a 100 mV. A outra quimera contendo o domínio S5 de KCNQ1 funcionou como um retificador para fora com uma proprieda-

de de ativação muito única. Como mostrado na Figura 2A de painel esquerdo, este mutante pareceu inativar quando potencial de membrana foi maior que 20 mV. Quando canal foi ativado por despolarização de membrana, uma corrente para fora transiente (150 - 200 ms) foi visualizada, tornando a ativação de canal significativamente semelhante a dois componentes. Quando potencial de membrana foi menor que 20 mV, o padrão de ativação de canal foi similar ao tipo selvagem e nenhuma inativação clara pode ser observada.

O efeito de retigabina sobre KCNQ5 contendo um domínio transmembrana de KCNQ1 foi então testado. Retigabina foi aplicado a KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de oócitos expressando KCNQ1 nos quais a amplitude de corrente de estado estável foi estabilizada no nível máximo. Como mostrado na Figura 2B, retigabina 50 μ M não teve mais efeito sobre este mutante. Em 5 minutos de aplicação de banho, corrente de canal induzida por despolarização para 40 mV permaneceu inalterada. A Figura 2C mostra as curvas I-V antes e após o tratamento de retigabina. Nem amplitude de corrente nem dependência de voltagem das correntes foi modificada por retigabina (Figura 2A painel direito, Figura 2C). Esta verificação indica que a dependência molecular de ação de retigabina reside dentro do domínio S5.

Exemplo 3

Os domínios S5 de todos os cinco membros KCNQ foram alinhados em seqüência e explorados para resíduos de aminoácidos únicos que possam ser responsáveis pela falta de resposta de KCNQ1 para retigabina. Como mostrado no painel superior de Figura 3, existem dez resíduos não - emparelhados entre KCNQ1 e KCNQ5. Sete dos mesmos destacados na Figura 3 podem ser únicos para KCNQ1. Por isso, mutações em KCNQ5 foram geradas para cada um de 7 resíduos modificados individualmente para o correspondente em KCNQ1. Um mutante, KCNQ5(F282Y) perde sua funcionalidade quando expresso em oócitos. Os outros seis mutantes foram funcionais e mostraram adequado nível de correntes na faixa experimental de potenciais de membrana. Efeito de retigabina sobre cada um destes mutantes foi então testado. Como mostrado no painel de fundo de Figura 3,

dois mutantes, KCNQ5(A269T) e KCNQ5(W270L) (SEQ ID NO: 1, codificando SEQ ID NO: 2) tiveram significativamente menos resposta para retigabina. Similar ao mutante trocado de domínio S5 em exemplo 2, KCNQ5(W270L) perde completamente a resposta para retigabina, sugerindo que este resíduo triptofano é crítico para ação de retigabina.

Exemplo 4

Para ainda investigar a dependência funcional de efeito de retigabina sobre este particular resíduo de triptofano em S5, a mutação reversa do correspondente resíduo em domínio S5 de KCNQ1 foi feita, presumindo que esta mutação pode tornar KCNQ1 capaz de ser ativado por retigabina. Surpreendentemente, este mutante, KCNQ1(L171W) realmente tornou-se sensível a retigabina. Entretanto, ao invés de ser ativado, KCNQ1(L171W) foi bloqueado por retigabina. Como mostrado na Figura 4A, os canais KCNQ1 tipo selvagem não tiveram resposta significativa para retigabina 50 μ M, mas uma resposta levemente inibidora para retigabina 200 μ M. Em contraste, retigabina 50 μ M reduziu claramente amplitude de corrente de estado estável de KCNQ1(L171W) e retigabina 200 μ M inibiu a corrente de estado estável por 62,5% em 80 mV (Figura 4B). Talvez a mais significativa mudança induzida por retigabina foi sobre ativação de canal. Como mostrado na Figura 4C, retigabina modificou as cinéticas de ativação da corrente evocada em 80 mV de um curso de tempo de ativação exponencial simples para um duplo, que pode ser descrito pela modificação de cinéticas de inativação. Retigabina não somente reduziu o nível de corrente de estado estável de KCNQ1(L171W) mas também modificou a dependência de voltagem de ativação de canal (Figura 4D e a inserção). A aensitividade altamente aperfeiçoada para retigabina sugere fortemente que as moléculas de retigabina são capazes de terem acesso ao resíduo de triptofano em domínio S5 de KCNQ5 ou KCNQ1(L171W), resultando na regulação ascendente ou descendente da ativação dependente de voltagem.

Exemplos 1-4 destacam a importância da hélice S5 em interrupção de canal KCNQ5 e provêm uma explicação molecular para a ação de retigabina sobre canais de potássio KCNQ.

Seqüência de Listagem

<110> Wyeth
 Liu, Kun
 Wang, Qiang
 5 Argentieri, Thomas
 <120> Sítio de Ligação para retigabina sobre KCNQ5
 <130> AM102223
 <150> US 60/760,252
 <151> 2006-01-19
 10 <160> 8
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 <211> 2799
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> KCNQ5 (W270L) point mutation
 <400> 1
 atgccccgcc accacgcggg aggagaggag ggcggcgccg ccgggctctg ggtgaagagc 60
 20 ggcgcagcgg cggcggcggc gggcgggggg cgcttgggca gcggcatgaa ggatgtggag 120
 tcgggccggg gcagggtgct gctgaactcg gcagccgcca ggggcgacgg cctgctactg 180
 ctgggcaccc gcgcggccac gctcgggtgc ggcggcgggtg gcctgaggga gagccgccgg 240
 ggcaagcagg gggcccggat gagcctgctg gggaagccgc tctcttacac gagtagccag 300
 agctgccggc gcaacgtcaa gtaccggcgg gtgcagaact acctgtacaa cgtgctggag 360
 25 agaccccgcg gctgggcggt catctaccac gctttcgttt ttctccttgt ctttggttgc 420
 ttgattttgt cagtgttttc taccatccct gagcacacaa aattggcctc aagttgcctc 480
 ttgatcctgg agttcgtgat gattgtcgtc tttggtttgg agttcatcat tcgaatctgg 540
 tctgcgggtt gctgttctcg atatagagga tggcaaggaa gactgaggtt tgctcgaaag 600
 cccttctgtg ttatagatac cattgttctt atcgcttcaa tagcagttgt ttctgcaaaa 660
 30 actcagggtg atatttttgc cacgtctgca ctcagaagtc tccgtttcct acagatcctc 720
 cgcattggtg gcatggaccg aaggggaggc acttggaat tactgggttc agtggtttat 780
 gctcacagca aggaattaat cacagctttg tacataggat ttttggttct tattttttcg 840

	tctttccttg tctatctggt ggaaaaggat gccataaag agttttctac atatgcagat	900
	gctctctggt ggggcacaat tacattgaca actattggct atggagacaa aactccccta	960
	acttggetgg gaagattgct ttctgcaggc tttgcactcc ttggcatttc tttctttgca	1020
	cttctgccc gcatctcttg ctcaggtttt gcattaaaag tacaagaaca acaccgccag	1080
5	aaacactttg agaaaagaag gaaccagct gccaacctca ttcagtgtgt ttggcgtagt	1140
	tacgcagctg atgagaaatc tgtttccatt gcaacctgga agccacactt gaaggccttg	1200
	cacacctgca gccctaccaa gaaagaacaa ggggaagcat caagcagtca gaagctaagt	1260
	tttaaggagc gagtgcgcat ggctagcccc aggggccaga gtattaagag ccgacaagcc	1320
	tcagtaggtg acaggaggtc cccaagcacc gacatcacag ccgagggcag tcccaccaa	1380
10	gtgcagaaga gctggagctt caacgaccga acccgcttcc ggccctcgct gcgcctcaaa	1440
	agttctcagc caaaaccagt gatagatgct gacacagccc ttggcactga tgatgtatat	1500
	gatgaaaaag gatgccagtg tgatgtatca gtggaagacc tcaccccacc acttaaaact	1560
	gtcattcgag ctatcagaat tatgaaattt catgttgcaa aacggaagtt taaggaaaca	1620
	ttacgtccat atgatgtaaa agatgtcatt gaacaatatt ctgctgggtca tctggacatg	1680
15	ttgtgtagaa ttaaaagcct tcaaacacgt gttgatcaaa ttcttggaaa agggcaaadc	1740
	acatcagata agaagagccg agagaaaata acagcagaa atgagaccac agacgatctc	1800
	agtatgctcg gtcgggtggt caaggttgaa aacaggtac agtccataga atccaagctg	1860
	gactgcctac tagacatcta tcaacaggtc cttcggaag gctctgcctc agccctcgct	1920
	ttggcttcat tccagatccc accttttgaa tgtgaacaga catctgacta tcaaaagcct	1980
20	gtggatagca aagatcttcc gggttccgca caaaacagtg gctgcttacc cagatcaact	2040
	agtccaaca tctcgagagg cctgcagttc attctgacgc caaatgagtt cagtgccag	2100
	actttctacg cgcttagccc tactatgcac agtcaagcaa cacaggtgcc aattagtcaa	2160
	agcgatggct cagcagtggc agccaccaac accattgcaa accaaataaa tacggcacc	2220
	aagccagcag cccaacaac ttacagatc ccacctctc tccagccat caagcatctg	2280
25	cccaggccag aaactctgca cctaaccct gcaggcttac aggaagcat ttctgacgtc	2340
	accacctgcc ttgttgctc caaggaaaat gttcagggtg cacagtcaaa tctaccaag	2400
	gaccgttcta tgaggaaaag ctttgacatg ggaggagaaa ctctgttgtc tgtctgtccc	2460
	atggtgccga aggacttggg caaatctttg tctgtgcaaa acctgatcag gtgcaccgag	2520
	gaactgaata tacaactttc agggagttag tcaagtggct ccagaggcag ccaagatttt	2580
30	taccccaaat ggagggaatc caaattgttt ataactgatg aagagggtgg tccogaagag	2640
	acagagacag acacttttga tgccgcaccg cagcctgcca gggaagctgc ctttgcatca	2700
	gactctctaa ggactggaag gtcacgatca tctcagagca ttgtgaaggc aggagaaagt	2760

acagatgccc tcagcttgcc tcatgtcaaa ctgaaataa

2799

<210> 2

<211> 932

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> KCNQ5(W270L) point mutation

<400> 2

Met Pro Arg His His Ala Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala Ala Gly Leu

10 1 5 10 15

Trp Val Lys Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Arg Leu

20 25 30

Gly Ser Gly Met Lys Asp Val Glu Ser Gly Arg Gly Arg Val Leu Leu

35 40 45

15 Asn Ser Ala Ala Ala Arg Gly Asp Gly Leu Leu Leu Leu Gly Thr Arg

50 55 60

Ala Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Arg Glu Ser Arg Arg

65 70 75 80

Gly Lys Gln Gly Ala Arg Met Ser Leu Leu Gly Lys Pro Leu Ser Tyr

20 85 90 95

Thr Ser Ser Gln Ser Cys Arg Arg Asn Val Lys Tyr Arg Arg Val Gln

100 105 110

Asn Tyr Leu Tyr Asn Val Leu Glu Arg Pro Arg Gly Trp Ala Phe Ile

115 120 125

25 Tyr His Ala Phe Val Phe Leu Leu Val Phe Gly Cys Leu Ile Leu Ser

130 135 140

Val Phe Ser Thr Ile Pro Glu His Thr Lys Leu Ala Ser Ser Cys Leu

145 150 155 160

Leu Ile Leu Glu Phe Val Met Ile Val Val Phe Gly Leu Glu Phe Ile

30 165 170 175

Ile Arg Ile Trp Ser Ala Gly Cys Cys Cys Arg Tyr Arg Gly Trp Gln

180 185 190

Gly Arg Leu Arg Phe Ala Arg Lys Pro Phe Cys Val Ile Asp Thr Ile
 195 200 205
 Val Leu Ile Ala Ser Ile Ala Val Val Ser Ala Lys Thr Gln Gly Asn
 210 215 220
 5 Ile Phe Ala Thr Ser Ala Leu Arg Ser Leu Arg Phe Leu Gln Ile Leu
 225 230 235 240
 Arg Met Val Arg Met Asp Arg Arg Gly Gly Thr Trp Lys Leu Leu Gly
 245 250 255
 Ser Val Val Tyr Ala His Ser Lys Glu Leu Ile Thr Ala Leu Tyr Ile
 10 260 265 270
 Gly Phe Leu Val Leu Ile Phe Ser Ser Phe Leu Val Tyr Leu Val Glu
 275 280 285
 Lys Asp Ala Asn Lys Glu Phe Ser Thr Tyr Ala Asp Ala Leu Trp Trp
 290 295 300
 15 Gly Thr Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asp Lys Thr Pro Leu
 305 310 315 320
 Thr Trp Leu Gly Arg Leu Leu Ser Ala Gly Phe Ala Leu Leu Gly Ile
 325 330 335
 Ser Phe Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly Ser Gly Phe Ala Leu
 20 340 345 350
 Lys Val Gln Glu Gln His Arg Gln Lys His Phe Glu Lys Arg Arg Asn
 355 360 365
 Pro Ala Ala Asn Leu Ile Gln Cys Val Trp Arg Ser Tyr Ala Ala Asp
 370 375 380
 25 Glu Lys Ser Val Ser Ile Ala Thr Trp Lys Pro His Leu Lys Ala Leu
 385 390 395 400
 His Thr Cys Ser Pro Thr Lys Lys Glu Gln Gly Glu Ala Ser Ser Ser
 405 410 415
 Gln Lys Leu Ser Phe Lys Glu Arg Val Arg Met Ala Ser Pro Arg Gly
 30 420 425 430
 Gln Ser Ile Lys Ser Arg Gln Ala Ser Val Gly Asp Arg Arg Ser Pro
 435 440 445

Ser Thr Asp Ile Thr Ala Glu Gly Ser Pro Thr Lys Val Gln Lys Ser
 450 455 460
 Trp Ser Phe Asn Asp Arg Thr Arg Phe Arg Pro Ser Leu Arg Leu Lys
 465 470 475 480
 5 Ser Ser Gln Pro Lys Pro Val Ile Asp Ala Asp Thr Ala Leu Gly Thr
 485 490 495
 Asp Asp Val Tyr Asp Glu Lys Gly Cys Gln Cys Asp Val Ser Val Glu
 500 505 510
 Asp Leu Thr Pro Pro Leu Lys Thr Val Ile Arg Ala Ile Arg Ile Met
 10 515 520 525
 Lys Phe His Val Ala Lys Arg Lys Phe Lys Glu Thr Leu Arg Pro Tyr
 530 535 540
 Asp Val Lys Asp Val Ile Glu Gln Tyr Ser Ala Gly His Leu Asp Met
 545 550 555 560
 15 Leu Cys Arg Ile Lys Ser Leu Gln Thr Arg Val Asp Gln Ile Leu Gly
 565 570 575
 Lys Gly Gln Ile Thr Ser Asp Lys Lys Ser Arg Glu Lys Ile Thr Ala
 580 585 590
 Glu His Glu Thr Thr Asp Asp Leu Ser Met Leu Gly Arg Val Val Lys
 20 595 600 605
 Val Glu Lys Gln Val Gln Ser Ile Glu Ser Lys Leu Asp Cys Leu Leu
 610 615 620
 Asp Ile Tyr Gln Gln Val Leu Arg Lys Gly Ser Ala Ser Ala Leu Ala
 625 630 635 640
 25 Leu Ala Ser Phe Gln Ile Pro Pro Phe Glu Cys Glu Gln Thr Ser Asp
 645 650 655
 Tyr Gln Ser Pro Val Asp Ser Lys Asp Leu Ser Gly Ser Ala Gln Asn
 660 665 670
 Ser Gly Cys Leu Ser Arg Ser Thr Ser Ala Asn Ile Ser Arg Gly Leu
 30 675 680 685
 Gln Phe Ile Leu Thr Pro Asn Glu Phe Ser Ala Gln Thr Phe Tyr Ala
 690 695 700

Leu Ser Pro Thr Met His Ser Gln Ala Thr Gln Val Pro Ile Ser Gln
 705 710 715 720
 Ser Asp Gly Ser Ala Val Ala Ala Thr Asn Thr Ile Ala Asn Gln Ile
 725 730 735
 5 Asn Thr Ala Pro Lys Pro Ala Ala Pro Thr Thr Leu Gln Ile Pro Pro
 740 745 750
 Pro Leu Pro Ala Ile Lys His Leu Pro Arg Pro Glu Thr Leu His Pro
 755 760 765
 Asn Pro Ala Gly Leu Gln Glu Ser Ile Ser Asp Val Thr Thr Cys Leu
 10 770 775 780
 Val Ala Ser Lys Glu Asn Val Gln Val Ala Gln Ser Asn Leu Thr Lys
 785 790 795 800
 Asp Arg Ser Met Arg Lys Ser Phe Asp Met Gly Gly Glu Thr Leu Leu
 805 810 815
 15 Ser Val Cys Pro Met Val Pro Lys Asp Leu Gly Lys Ser Leu Ser Val
 820 825 830
 Gln Asn Leu Ile Arg Ser Thr Glu Glu Leu Asn Ile Gln Leu Ser Gly
 835 840 845
 Ser Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gly Ser Gln Asp Phe Tyr Pro Lys Trp
 20 850 855 860
 Arg Glu Ser Lys Leu Phe Ile Thr Asp Glu Glu Val Gly Pro Glu Glu
 865 870 875 880
 Thr Glu Thr Asp Thr Phe Asp Ala Ala Pro Gln Pro Ala Arg Glu Ala
 885 890 895
 25 Ala Phe Ala Ser Asp Ser Leu Arg Thr Gly Arg Ser Arg Ser Ser Gln
 900 905 910
 Ser Ile Cys Lys Ala Gly Glu Ser Thr Asp Ala Leu Ser Leu Pro His
 915 920 925
 Val Lys Leu Lys
 30 930
 <210> 3
 <211> 2799

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

	atgccccgcc accacgcggg aggagaggag ggcggcgccg ccgggctctg ggtgaagagc	60
5	ggcgcagcgg cggcggcggc gggcgggggg cgcttgggca gcggcatgaa ggatgtggag	120
	tcgggcccgg gcagggtgct gctgaactcg gcagccgcca ggggcgacgg cctgtactg	180
	ctgggcaccc gcgcggccac gctcggtggc ggcggcggtg gcctgaggga gagccgccgg	240
	ggcaagcagg gggcccggat gagcctgctg gggaagccgc tctcttacac gagtagccag	300
	agctgccggc gcaacgtcaa gtaccggcgg gtgcagaact acctgtacaa cgtgtctggag	360
10	agaccccgcg gctgggcggt catctaccac gctttcgttt ttctccttgt ctttggttgc	420
	ttgattttgt cagtgttttc taccatccct gagcacacaa aattggcctc aagttgcctc	480
	ttgatectgg agttcgtgat gattgtcgtc tttggtttgg agttcatcat tcgaatctgg	540
	tctgcggggt gctgttgtcg atatagagga tggcaaggaa gactgagggt tgctcgaaag	600
	cccttctgtg ttatagatac cattgttctt atcgcttcaa tagcagttgt ttctgcaaaa	660
15	actcagggta atatTTTTgc cacgtctgca ctcagaagtc tccgtttcct acagatcctc	720
	cgcattggtg gcattggacc aaggggaggg acttggaaat tactgggttc agtggtttat	780
	gctcacagca aggaattaat cacagcttgg tacataggat ttttggttct tattttttcg	840
	tctttccttg tctatctggt ggaaaaggat gccataaag agttttctac atatgcagat	900
	gctctctggt ggggcacaat tacattgaca actattggct atggagacaa aactccccta	960
20	acttggctgg gaagattgct ttctgcaggc tttgcactcc ttggcatttc tttctttgca	1020
	cttctgccc gcattcttgg ctcaggtttt gcattaaaag tacaagaaca acaccgccag	1080
	aaacactttg agaaaagaag gaaccagct gccaacctca ttcagtgtgt ttggcgtagt	1140
	tacgcagctg atgagaaatc tgtttccatt gcaacctgga agccacactt gaaggccttg	1200
	cacacctgca gccctacca gaaagaacaa ggggaagcat caagcagtca gaagctaagt	1260
25	tttaaggagc gagtgcgcat ggctagcccc agggggccaga gtattaagag ccgacaagcc	1320
	tcagtaggtg acaggaggtc cccaagcacc gacatcacag ccgagggcag tcccacaaa	1380
	gtgcagaaga gctggagctt caacgaccga acccgcttcc ggccctcgct gcgcctcaaa	1440
	agttctcagc caaaaccagt gatagatgct gacacagccc ttggcactga tgatgtatat	1500
	gatgaaaaag gatgccagtg tgatgtatca gtggaagacc tcaccccacc acttaaaact	1560
30	gtcattcgag ctatcagaat tatgaaattt catgttgcaa aacggaagtt taaggaaaca	1620
	ttacgtccat atgatgtaaa agatgtcatt gaacaatatt ctgctggtca tctggacatg	1680
	ttgtgtagaa ttaaaagcct tcaaacacgt gttgatcaaa ttcttggaag agggcaaatc	1740

acatcagata agaagagccg agagaaaata acagcagaac atgagaccac agacgatctc 1800
 agtatgctcg gtcgggtggt caaggttgaa aaacaggtac agtccataga atccaagctg 1860
 gactgcctac tagacatcta tcaacaggtc cttcggaag gctctgcctc agccctcgct 1920
 ttggcttcat tccagatccc accttttgaa tgtgaacaga catctgacta tcaaagccct 1980
 5 gtggatagca aagatctttc gggttccgca caaaacagtg gctgcttate cagatcaact 2040
 agtgccaaca tctcgagagg cctgcagttc attctgacgc caaatgagtt cagtgccag 2100
 actttctacg cgcttagccc tactatgcac agtcaagcaa cacagggtgcc aattagtcaa 2160
 agcgatggct cagcagtggc agccaccaac accattgcaa accaaataaa tacggcacc 2220
 aagccagcag cccaacaac tttacagatc ccacctctc tcccagccat caagcatctg 2280
 10 cccaggccag aaactctgca ccctaaccct gcaggcttac aggaaagcat ttctgacgtc 2340
 accacctgcc ttgttgctc caaggaaaat gttcaggttg cacagtcaa tctaccaag 2400
 gaccgttcta tgaggaaaag ctttgacatg ggaggagaaa ctctgttgtc tgtctgtccc 2460
 atggtgccga aggacttggg caaatctttg tctgtgcaaa acctgatcag gtgcaccgag 2520
 gaactgaata tacaactttc agggagttag tcaagtggct ccagaggcag ccaagatttt 2580
 15 taccocaaat ggagggaatc caaattgttt ataactgatg aagaggtggg tcccgaagag 2640
 acagagacag acacttttga tgcgcaccc cagcctgcc gggagctgc ctttgcatca 2700
 gactctctaa ggactggaag gtcacgatca tctcagagca tttgtaaggc aggagaaagt 2760
 acagatgccc tcagcttgcc tcattgtcaa ctgaaataa 2799
 <210> 4
 20 <211> 932
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Pro Arg His His Ala Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala Ala Gly Leu
 25 1 5 10 15
 Trp Val Lys Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Arg Leu
 20 25 30
 Gly Ser Gly Met Lys Asp Val Glu Ser Gly Arg Gly Arg Val Leu Leu
 35 40 45
 30 Asn Ser Ala Ala Ala Arg Gly Asp Gly Leu Leu Leu Gly Thr Arg
 50 55 60
 Ala Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Arg Glu Ser Arg Arg

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

	325	330	335
	Ser Phe Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly Ser Gly Phe Ala Leu		
	340	345	350
	Lys Val Gln Glu Gln His Arg Gln Lys His Phe Glu Lys Arg Arg Asn		
5	355	360	365
	Pro Ala Ala Asn Leu Ile Gln Cys Val Trp Arg Ser Tyr Ala Ala Asp		
	370	375	380
	Glu Lys Ser Val Ser Ile Ala Thr Trp Lys Pro His Leu Lys Ala Leu		
	385	390	395
10	His Thr Cys Ser Pro Thr Lys Lys Glu Gln Gly Glu Ala Ser Ser Ser		
	405	410	415
	Gln Lys Leu Ser Phe Lys Glu Arg Val Arg Met Ala Ser Pro Arg Gly		
	420	425	430
	Gln Ser Ile Lys Ser Arg Gln Ala Ser Val Gly Asp Arg Arg Ser Pro		
15	435	440	445
	Ser Thr Asp Ile Thr Ala Glu Gly Ser Pro Thr Lys Val Gln Lys Ser		
	450	455	460
	Trp Ser Phe Asn Asp Arg Thr Arg Phe Arg Pro Ser Leu Arg Leu Lys		
	465	470	475
20	Ser Ser Gln Pro Lys Pro Val Ile Asp Ala Asp Thr Ala Leu Gly Thr		
	485	490	495
	Asp Asp Val Tyr Asp Glu Lys Gly Cys Gln Cys Asp Val Ser Val Glu		
	500	505	510
	Asp Leu Thr Pro Pro Leu Lys Thr Val Ile Arg Ala Ile Arg Ile Met		
25	515	520	525
	Lys Phe His Val Ala Lys Arg Lys Phe Lys Glu Thr Leu Arg Pro Tyr		
	530	535	540
	Asp Val Lys Asp Val Ile Glu Gln Tyr Ser Ala Gly His Leu Asp Met		
	545	550	555
30	Leu Cys Arg Ile Lys Ser Leu Gln Thr Arg Val Asp Gln Ile Leu Gly		
	565	570	575
	Lys Gly Gln Ile Thr Ser Asp Lys Lys Ser Arg Glu Lys Ile Thr Ala		

	580	585	590
	Glu His Glu Thr Thr Asp Asp Leu Ser Met Leu Gly Arg Val Val Lys		
	595	600	605
	Val Glu Lys Gln Val Gln Ser Ile Glu Ser Lys Leu Asp Cys Leu Leu		
5	610	615	620
	Asp Ile Tyr Gln Gln Val Leu Arg Lys Gly Ser Ala Ser Ala Leu Ala		
	625	630	635
	Leu Ala Ser Phe Gln Ile Pro Pro Phe Glu Cys Glu Gln Thr Ser Asp		
	645	650	655
10	Tyr Gln Ser Pro Val Asp Ser Lys Asp Leu Ser Gly Ser Ala Gln Asn		
	660	665	670
	Ser Gly Cys Leu Ser Arg Ser Thr Ser Ala Asn Ile Ser Arg Gly Leu		
	675	680	685
	Gln Phe Ile Leu Thr Pro Asn Glu Phe Ser Ala Gln Thr Phe Tyr Ala		
15	690	695	700
	Leu Ser Pro Thr Met His Ser Gln Ala Thr Gln Val Pro Ile Ser Gln		
	705	710	715
	Ser Asp Gly Ser Ala Val Ala Ala Thr Asn Thr Ile Ala Asn Gln Ile		
	725	730	735
20	Asn Thr Ala Pro Lys Pro Ala Ala Pro Thr Thr Leu Gln Ile Pro Pro		
	740	745	750
	Pro Leu Pro Ala Ile Lys His Leu Pro Arg Pro Glu Thr Leu His Pro		
	755	760	765
	Asn Pro Ala Gly Leu Gln Glu Ser Ile Ser Asp Val Thr Thr Cys Leu		
25	770	775	780
	Val Ala Ser Lys Glu Asn Val Gln Val Ala Gln Ser Asn Leu Thr Lys		
	785	790	795
	Asp Arg Ser Met Arg Lys Ser Phe Asp Met Gly Gly Glu Thr Leu Leu		
	805	810	815
30	Ser Val Cys Pro Met Val Pro Lys Asp Leu Gly Lys Ser Leu Ser Val		
	820	825	830
	Gln Asn Leu Ile Arg Ser Thr Glu Glu Leu Asn Ile Gln Leu Ser Gly		

835 840 845
 Ser Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gly Ser Gln Asp Phe Tyr Pro Lys Trp
 850 855 860
 Arg Glu Ser Lys Leu Phe Ile Thr Asp Glu Glu Val Gly Pro Glu Glu
 5 865 870 875 880
 Thr Glu Thr Asp Thr Phe Asp Ala Ala Pro Gln Pro Ala Arg Glu Ala
 885 890 895
 Ala Phe Ala Ser Asp Ser Leu Arg Thr Gly Arg Ser Arg Ser Ser Gln
 900 905 910
 10 Ser Ile Cys Lys Ala Gly Glu Ser Thr Asp Ala Leu Ser Leu Pro His
 915 920 925
 Val Lys Leu Lys
 930
 <210> 5
 15 <211> 309
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 tccgtgggtct tcattccaccg ccaggagctg ataaccaccc tgtacatcgg ctctctgggc 60
 20 ctcatcttct cctcgtactt tgtgtacctg gctgagaagg acgcggtgaa cgagtcaggc 120
 cgcggtggagt tcggcagcta cgcagatgcg ctgtggtggg ggggtggtcac agtcaccacc 180
 atcggctatg gggacaaggt gcccagacg tgggtcggga agaccatcgc ctctgcttc 240
 tctgtctttg ccatctcctt ctttgcgctc ccagcgggga ttcttggtc ggggtttgcc 300
 ctgaaggtg 309
 25 <210> 6
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 30 Ser Val Val Phe Ile His Arg Gln Glu Leu Ile Thr Thr Leu Tyr Ile
 1 5 10 15
 Gly Phe Leu Gly Leu Ile Phe Ser Ser Tyr Phe Val Tyr Leu Ala Glu

	20	25	30	
	Lys Asp Ala Val Asn Glu Ser Gly Arg Val Glu Phe Gly Ser Tyr Ala			
	35	40	45	
	Asp Ala Leu Trp Trp Gly Val Val Thr Val Thr Thr Ile Gly Tyr Gly			
5	50	55	60	
	Asp Lys Val Pro Gln Thr Trp Val Gly Lys Thr Ile Ala Ser Cys Phe			
	65	70	75	80
	Ser Val Phe Ala Ile Ser Phe Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly			
	85	90	95	
10	Ser Gly Phe Ala Leu Lys Val			
	100			
	<210> 7			
	<211> 1746			
	<212> DNA			
15	<213> Homo sapiens			
	<400> 7			
	atggagacgc gcggtcttag gctcaccggc ggccagggcc gcgtctacaa cttcctcgag	60		
	cgtcccacgc gctggaaatg cttcggttac cacttcgccg tcttcctcat cgtcctggtc	120		
	tgctcatct tcagcgtgct gtccaccatc gagcagtatg ccgccctggc caccgggact	180		
20	ctcttctgga tggagatcgt gctggtggtg ttcttcggga cggagtacgt ggtccgcctc	240		
	tggtccgccg gctgccgcag caagtacgtg ggctctggg ggccggtgcg ctttgcccg	300		
	aagccattt ccatcatcga cctcatcgtg gtctggcct ccatggtggt cctctgcgtg	360		
	ggctccaagg ggcaggtgtt tgccacgtcg gccatcagg gcacccgctt cctgcagatc	420		
	ctgaggatgc tacacgtcga ccgccaggga ggcacctgga ggctcctggg ctccgtggtc	480		
25	ttcatccacc gccaggagct gataaccacc ctgtacatcg gcttctggg cctcatcttc	540		
	tcctcgtaact ttgtgtacct ggctgagaag gacgcggtga acgagtcagg ccgcgtggag	600		
	ttcggcagct acgcagatgc gctgtggtg ggggtggtca cagtcaccac catcggtat	660		
	ggggacaagg tgccccagac gtgggtcggg aagaccatcg cctcctgctt ctctgtcttt	720		
	gccatctcct tctttgcgt cccagcgggg attcttggt cggggtttgc cctgaagggtg	780		
30	cagcagaagc agaggcagaa gcacttcaac cggcagatcc cggcggcagc ctactcatt	840		
	cagaccgcat ggaggtgcta tgctgccgag aaccccgact cctccacctg gaagatctac	900		
	atccggaagg cccccggag ccacactctg ctgtcaccca gccccaaacc caagaagtct	960		

```

gtggtggttaa agaaaaaaaaa gttcaagctg gacaaagaca atggggtgac tcctggagag 1020
aagatgctca cagtcccca tatcacgtgc gacccccag aagagcggcg gctggaccac 1080
ttctctgtcg acggctatga cagttctgta aggaagagcc caacactgct ggaagtgagc 1140
atgccccatt tcatgagaac caacagcttc gccgaggacc tggacctgga aggggagact 1200
5 ctgctgacac ccatcaccca catctcacag ctgcggaac accatcgggc caccattaag 1260
gtcattcgac gcatgcagta ctttgtggcc aagaagaaat tccagcaagc gcggaagcct 1320
tacgatgtgc gggacgtcat tgagcagtac tcgcagggcc acctcaacct catggtgcgc 1380
atcaaggagc tgcagaggag gctggaccag tccattggga agccctcact gttcatctcc 1440
gtctcagaaa agagcaagga tcgcggcagc aacacgatcg gcgcccgcct gaaccgagta 1500
10 gaagacaagg tgacgcagct ggaccagagg ctggcactca tcaccgacat gttcaccag 1560
ctgctctcct tgcacggtg cagcaccccc ggcagcggcg gccccccag agagggcggg 1620
gcccacatca cccagccctg cggcagtggc ggctcgtcg acctgagct cttctgccc 1680
agcaacaccc tgcccaccta cgagcagctg accgtgccca ggagggggcc cgatgagggg 1740
tcctga 1746

15 <210> 8
    <211> 581
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 8

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

```

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

	355		360		365
	Ser Val Arg Lys Ser Pro Thr Leu Leu Glu Val Ser Met Pro His Phe				
	370		375		380
	Met Arg Thr Asn Ser Phe Ala Glu Asp Leu Asp Leu Glu Gly Glu Thr				
5	385		390		395 400
	Leu Leu Thr Pro Ile Thr His Ile Ser Gln Leu Arg Glu His His Arg				
		405		410	415
	Ala Thr Ile Lys Val Ile Arg Arg Met Gln Tyr Phe Val Ala Lys Lys				
	420		425		430
10	Lys Phe Gln Gln Ala Arg Lys Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu				
	435		440		445
	Gln Tyr Ser Gln Gly His Leu Asn Leu Met Val Arg Ile Lys Glu Leu				
	450		455		460
	Gln Arg Arg Leu Asp Gln Ser Ile Gly Lys Pro Ser Leu Phe Ile Ser				
15	465		470		475 480
	Val Ser Glu Lys Ser Lys Asp Arg Gly Ser Asn Thr Ile Gly Ala Arg				
		485		490	495
	Leu Asn Arg Val Glu Asp Lys Val Thr Gln Leu Asp Gln Arg Leu Ala				
	500		505		510
20	Leu Ile Thr Asp Met Leu His Gln Leu Leu Ser Leu His Gly Gly Ser				
	515		520		525
	Thr Pro Gly Ser Gly Gly Pro Pro Arg Glu Gly Gly Ala His Ile Thr				
	530		535		540
	Gln Pro Cys Gly Ser Gly Gly Ser Val Asp Pro Glu Leu Phe Leu Pro				
25	545		550		555 560
	Ser Asn Thr Leu Pro Thr Tyr Glu Gln Leu Thr Val Pro Arg Arg Gly				
		565		570	575
	Pro Asp Glu Gly Ser				
	580				

REIVINDICAÇÕES

1. (cancelada)
2. Polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:
 - 5 (a) uma seqüência de ácido nucléico compreendendo SEQ ID NO: 1;
 - (b) um polinucleotídeo codificando SEQ ID NO: 2;
 - (c) uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 95% em homologia com SEQ ID NO: 1, con-
 - 10 tanto que uma substituição em nucleotídeos 808-810 seja para um códon que produz uma substituição conservativa para o aminoácido leucina;
 - (d) uma molécula de ácido nucléico que é capaz de hibridização sob condições de alta rigorosidade para SEQ ID NO: 1;
 - (e) uma molécula de ácido nucléico que é complementar a (a),
 - 15 (b), (c), ou (d); e
 - (f) uma variante de SEQ ID NO: 1.
3. (cancelada)
4. (cancelada)
5. Fragmento de polinucleotídeo isolado compreendendo pelo
- 20 menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, ou 700 nucleotídeos contíguos da seqüência sentido do polinucleotídeo isolado de reivindicação 2, onde o dito fragmento inclui nucleotídeos 808-810 de SEQ ID NO: 1.
6. Iniciador ou sonda compreendendo o fragmento de polinucleo-
- 25 tídeo isolado da reivindicação 5.
7. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 2, onde a molécula de ácido nucléico de (d) hibridiza com SEQ ID NO: 1 sob as seguintes condições: 6xSSC a 45°C e lavada uma vez mais com 0,2xSSC, 0,1% SDS a 50°C.
- 30 8. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 7, onde a molécula de ácido nucléico de (d) hibridiza com SEQ ID NO: 1 sob as seguintes condições: 6xSSC a 45°C e lavada pelo menos uma vez com 0,2xSSC, 0,1%

SDS a 55°C.

9. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 7, onde a molécula de ácido nucléico de (d) hibridiza com SEQ ID NO: 1 sob as seguintes condições: 6xSSC a 45°C e lavada pelo menos uma vez com 0,2xSSC, 0,1%

5 SDS a 65°C.

10. Vetor compreendendo o polinucleotídeo isolado da reivindicação 2.

11. Vetor da reivindicação 10, onde o vetor é um plasmídeo.

12. Vetor da reivindicação 10, onde o vetor é um vetor de expressão.

13. Célula hospedeira transformada com o vetor de qualquer uma das reivindicações 10-12.

14. Célula hospedeira da reivindicação 13 que é uma célula procariótica.

15 15. Célula hospedeira da reivindicação 14, onde a célula procariótica é uma célula de E. coli.

16. Célula hospedeira da reivindicação 13 que é uma célula eucariótica.

20 17. Célula hospedeira da reivindicação 16, onde a célula eucariótica é uma célula de inseto, uma célula de levedura, uma célula mamífera, ou um oócito de Xenopus.

18. Animal transgênico não-humano compreendendo o polinucleotídeo isolado da reivindicação 2.

25 19. Polinucleotídeo anti - sentido isolado que é anti - sentido para o polinucleotídeo isolado da reivindicação 2.

20. Polinucleotídeo anti - sentido isolado da reivindicação 19, onde o polinucleotídeo anti - sentido isolado é um oligonucleotídeo anti - sentido, uma ribozima, ou um siRNA.

30 21. Polinucleotídeo isolado codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S-5-S6 de KCNQ1.

22. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 21, onde o domínio transmembrana S5-S6 é de KCNQ1 humano.

23. Polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácidos nucléicos compreendendo SEQ ID NO: 3, onde nucleotídeos 769-1062 estão substituídos com SEQ ID NO: 5;

5 (b) um polinucleotídeo codificando SEQ ID NO: 4, onde aminoácidos 257-354 são substituídos com um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

(c) uma molécula de ácido nucléico que é capaz de hibridização sob condições altamente rigorosas à seqüência de ácido nucléico de (a) ou
10 (b); e

(d) uma molécula de ácido nucléico que é complementar para (a), (b), ou (c).

24. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 23, onde o domínio transmembrana S5-S6 de (b) é SEQ ID NO: 6.

15 25. Polinucleotídeo isolado codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

26. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 25, onde o domínio transmembrana S5 é de KCNQ1 humano.

20 27. Polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de ácidos nucléicos compreendendo SEQ ID NO: 3, onde nucleotídeos 769-873 estão substituídos com nucleotídeos 1-105 de SEQ ID NO: 5;

(b) polinucleotídeo codificando SEQ ID NO: 4, onde aminoácidos
25 257-291 de SEQ ID NO: 4 são substituídos com um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(c) uma molécula de ácido nucléico que é capaz de hibridização sob condições altamente rigorosas à seqüência de ácidos nucléicos de (a) ou (b); e

30 (d) uma molécula de ácido nucléico que é complementar a (a), (b), ou (c).

28. Polinucleotídeo isolado da reivindicação 27, onde o domínio

transmembrana S5 de (b) são aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 6.

29. Polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em:

(a) uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo
5 KCNQ5(W270L);

(b) uma seqüência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO:
2;

(c) uma variante de (a); e

(d) uma seqüência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de
10 identidade para a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, contanto que
uma substituição em aminoácido 270 seja uma substituição conservativa
para o aminoácido leucina.

30. Proteína de fusão compreendendo um primeiro polipeptídeo
consistindo no polipeptídeo isolado da reivindicação 29 ligado operavel-
15 mente a um segundo polipeptídeo não-KCNQ95(W270L).

31. Polinucleotídeo isolado codificando a proteína de fusão da
reivindicação 30.

32. Peptidomimético compreendendo o polipeptídeo isolado da
reivindicação 29, onde pelo menos uma ligação de peptídeo é substituída
20 com uma ligação selecionada do grupo consistindo em --CH₂NH--, --CH₂S--,
--CH₂--CH₂--, cis --CH=CH--, trans --CH=CH--, --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--,
e--CH₂SO--.

33. Fragmento de peptídeo isolado compreendendo pelo menos
8 aminoácidos contíguos do polipeptídeo isolado da reivindicação 29, onde o
25 dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

34. Fragmento de peptídeo isolado compreendendo pelo menos
10 aminoácidos contíguos do polipeptídeo isolado da reivindicação 29, onde
o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

35. Fragmento de peptídeo isolado compreendendo pelo menos
30 15 aminoácidos contíguos do polipeptídeo isolado da reivindicação 29, onde
o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

36. Fragmento de peptídeo isolado compreendendo pelo menos

20 aminoácidos contíguos do polipeptídeo isolado da reivindicação 29, onde o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

37. Fragmento de peptídeo isolado compreendendo pelo menos 30 aminoácidos contíguos do polipeptídeo isolado da reivindicação 29, onde
5 o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

38. Anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo SEQ ID NO: 2.

39. Anticorpo da reivindicação 38, onde o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

10 40. Anticorpo da reivindicação 38, onde o anticorpo é um anticorpo policlonal.

41. anticorpo que se liga especificamente a um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo pelo menos 8 aminoácidos contíguos a partir de SEQ ID NO: 2, onde o dito fragmento inclui aminoácido
15 270 de SEQ ID NO: 2.

42. Polipeptídeo KCNQ5 isolado contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1.

43. Polipeptídeo KCNQ5 isolado da reivindicação 42, onde o domínio transmembrana S5-S6 é de KCNQ1 humano.

20 44. Polipeptídeo KCNQ5 isolado da reivindicação 42, onde a sequência de aminoácidos do polipeptídeo KCNQ5 compreende SEQ ID NO: 4 com aminoácidos 257-354 substituídos com o domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1.

45. Polipeptídeo KCNQ5 isolado da reivindicação 44, onde os
25 aminoácidos 257-354 de SEQ ID NO: 4 estão substituídos com SEQ ID NO: 6.

46. Polipeptídeo KCNQ5 isolado contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

30 47. Polipeptídeo KCNQ5 isolado da reivindicação 46, onde o domínio transmembrana S5 é de KCNQ1 humano.

48. Polipeptídeo KCNQ5 isolado da reivindicação 46, onde a sequência de aminoácidos do polipeptídeo KCNQ5 compreende SEQ ID NO: 4

com aminoácidos 257-291 substituídos com o domínio transmembrana S5 de KCNQ1. 49. Polipeptídeo KCNQ5 isolado da reivindicação 48, onde aminoácidos 257-291 de SEQ ID NO: 4 estão substituídos com aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 6.

5 50. Um canal dimérico KCNQ compreendendo pelo menos uma subunidade KCNQ5 que é o polipeptídeo isolado da reivindicação 29, 42, ou 46.

51. Canal dimérico KCNQ da reivindicação 50, onde ambas subunidades de canal são o polipeptídeo isolado da reivindicação 29, 42, ou 10 46.

52. Canal dimérico de KCNQ da reivindicação 50, onde uma subunidade é KCNQ3.

53. Canal dimérico de KCNQ da reivindicação 52, onde a subunidade KCNQ3 é KCNQ3 humano.

15 54. Canal tetramérico KCNQ compreendendo pelo menos uma subunidade KCNQ5 que é o polipeptídeo isolado de reivindicação 29, 42 ou 46.

55. Canal tetramérico de KCNQ da reivindicação 54, onde dois das quatro subunidades de canal são o polipeptídeo isolado da reivindicação 20 29, 42 ou 46.

56. Canal tetramérico de KCNQ da reivindicação 55, onde três das quatro subunidades de canal são o polipeptídeo isolado da reivindicação 29, 42, ou 46.

57. canal tetramérico de KCNQ da reivindicação 56, onde todas 25 as quatro subunidades de canal são o polipeptídeo isolado da reivindicação 29, 42 ou 46.

58. canal tetramérico de KCNQ da reivindicação 54, onde pelo menos uma subunidade é KCNQ3.

59. Canal tetramérico de KCNQ da reivindicação 58, onde a subunidade KCNQ3 é KCNQ3 humano. 30

60. Processo de seleção para agentes, o processo compreendendo:

(a) contato de um agente com uma molécula de KCNQ5 selecionada do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

5 (ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

10 (iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1; e

15 (b) detectando um efeito do dito agente sobre a atividade de KCNQ5;

onde detecção de uma diminuição ou um aumento em atividade de KCNQ5 é indicativa de um agente sendo um modulador de KCNQ5.

20 61. Processo da reivindicação 60, onde a atividade de KCNQ5 é a redução de excitabilidade neuronal ou calma de músculos lisos de bexiga urinária.

62. Processo da reivindicação 60, onde a atividade de KCNQ5 é detectada através de medição eletrofisiológica de magnitude de corrente de íons de canais KCNQ5.

25 63. Processo da reivindicação 60 realizado através de um ensaio isento de células.

64. Processo de seleção para agentes, o processo compreendendo:

(a) contato de uma célula com um agente; e

30 (b) determinação de nível de expressão de uma molécula de KCNQ5 selecionada do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um

polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

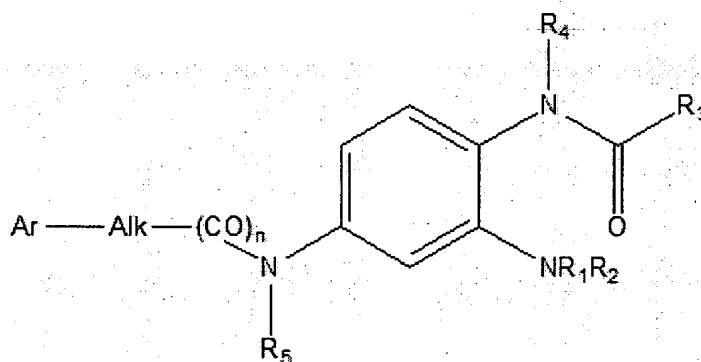
(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

onde detecção de uma diminuição ou aumento em expressão de KCNQ5 é indicativa de um agente sendo um modulador de KCNQ5.

65. Agente identificado através do processo de qualquer uma das reivindicações 60-64.

66. Agente da reivindicação 65, onde o agente é um análogo de retigabina.

67. Agente da reivindicação 65, onde o agente é um análogo de um composto da fórmula:



onde:

R₁ é selecionado de hidrogênio, C₁-C₆-alquila, C₂-C₆-alcanoíla ou o radical Ar;

R₂ é selecionado de hidrogênio ou C₁-C₆-alquila;

R₃ é selecionado de C₁-C₆-alcoxi, NH₂, C₁-C₆-alquil amino, C₁-C₆-dialquil amino, amino substituído com o radical Ar, C₁-C₆-alquila, C₂-C₆-

alquenila, C₂-C₆-alquinila, o radical Ar ou o radical ArO--;

R₄ é selecionado de hidrogênio, C₁-C₆-alquila ou o radical Ar;

R₅ é selecionado de hidrogênio ou C₁-C₆-alquila ou o radical Ar;

Alq é um grupo alquilenos reto ou ramificado com 1-9 átomos de carbono, que também pode estar substituído com o radical Ar;

Ar é um radical fenila substituído com os radicais R₆, R₇ e/ou R₈ onde estes radicais R₆, R₇ e R₈ são idênticos ou diferentes e representam H, C₁-C₆-alquila, C₃-C₇-ciclo alquila, hidroxil, C₁-C₆-alcoxi, C₂-C₆-alcanoiloxil, halogênio, hidroxil, C₁-C₆-halogênio alquila, --CN, --NH₂, --NH--C₁-C₆-alquila, --N(C₁-C₆-alquil)₂, --CO₂H, --CO--C₁-C₆-alquila, --CO--O--C₁-C₆-alquila, --COAr, --CO--OAr, --CONH₂, --CONH--C₁-C₆-alquila, --CON(C₁-C₆-alquil)₂, --CONHAr, --NH--CO--C₁-C₆-alquila, --NHCO--Ar, --NHCO--C₁-C₆-alcoxi, --NH--CO--Ar, --NHCO--NH₂, --NHCO--N(C₁-C₆-alquila)₂, --NHCO--NHAr, --NH--SO₂--C₁-C₆-alquila, --NH--SO₂Ar, --NH--SO₂-nitro fenila, --SO₂--OH, --SO₂-C₁-C₆-alquila, --SO₂--Ar, --SO₂-C₁-C₆-alcoxi, --SO₂--OAr, --SO₂--NH₂, --SO₂--NH--C₁-C₆-alquila, --SO₂--N(C₁-C₆-alquila)₂, --SO₂--NHAr, --SO₂--C₂-C₆-alcoxi;

n é 0 ou 1.

68. (cancelada)

69. (cancelada)

70. (cancelada)

71. Processo para identificação de polipeptídeos capazes de ligarem-se a um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo:

(a) aplicação a um mamífero de um procedimento de dois híbridos onde uma sequência codificando um polipeptídeo KCNQ5 é carregada por um vetor híbrido e uma sequência de uma biblioteca de ADNc ou ADN genômico é carregada pelo segundo vetor híbrido, onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(b) transformação de célula hospedeira com os vetores;

(c) isolamento de células transformadas positivas; e

5 (d) extração do dito segundo vetor híbrido para obter uma sequência codificando um polipeptídeo que se liga ao polipeptídeo KCNQ5.

72. Processo para detecção de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo detecção de ligação de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em:

10 (a) um anticorpo que se liga seletivamente a um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(b) um anticorpo que se liga seletivamente a um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

15 (c) um anticorpo que se liga seletivamente a um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1; e

(d) um anticorpo que se liga seletivamente a um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) compreendendo pelo menos 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 2, onde o dito fragmento inclui aminoácido 270 de EQ ID NO: 2;

20 a uma molécula em uma amostra suspeita de conter um polipeptídeo JCNQ5, um polipeptídeo KCNQ5(W270L), ou um fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L), onde o anticorpo é contactado com a amostra sob condições que permitem específica ligação com qualquer polipeptídeo KCNQ5, polipeptídeo KCNQ5(W270L), ou fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L) presente na amostra e ligação do anticorpo à molécula na amostra indica a presença de um polipeptídeo KCNQ5, polipeptídeo KCNQ5(W270L), ou fragmento de polipeptídeo KCNQ5(W270L).

25 73. Processo da reivindicação 72, onde a amostra é do sistema nervoso central, músculo de esqueleto, ou músculo liso de bexiga urinária.

74. Processo da reivindicação 73, onde a amostra de sistema nervoso central é do cérebro.

75. Processo para detecção de expressão de KCNQ5 compreendendo detecção de ARNm codificando um polipeptídeo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

em uma amostra de uma célula ou tecido suspeito de expressar KCNQ5 com uma sonda compreendendo pelo menos 12 nucleotídeos contíguos de um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

76. Processo da reivindicação 75, onde a sonda compreende pelo menos 12 nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO: 1 incluindo nucleotídeos 808-810.

77. Processo da reivindicação 75, onde o tecido é cérebro, músculo de esqueleto, ou bexiga urinária.

78. Processo para determinação de se um gene KCNQ5 sofreu mutação ou foi suprimido, compreendendo detecção, em uma amostra de células ou tecido de um sujeito, de presença ou ausência de uma alteração genética caracterizada por pelo menos uma de uma alteração afetando a integridade de um gene codificando uma proteína KCNQ5 ou a expressão errada de um gene KCNQ5, onde a etapa de detecção é realizada com pelo menos uma sonda ou iniciador compreendendo pelo menos 12 nucleotídeos contíguos de um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um

polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

79. Processo da reivindicação 78, onde a sonda ou primer compreende pelo menos 12 nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO: 1 incluindo nucleotídeos 808-810.

80. Processo da reivindicação 78, onde o tecido é cérebro, músculo de esqueleto, ou bexiga urinária.

81. Processo de identificação de variantes de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo seleção de uma biblioteca combinatorial compreendendo mutantes de KCNQ5 para agonistas ou antagonistas de polipeptídeo KCNQ5; onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

82. Variante de KCNQ5 identificada através do processo da reivindicação 81.

83. Processo de isolamento de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo:

(a) contato de um anticorpo KCNQ5 com uma amostra suspeita de conter um polipeptídeo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo domínio transmembrana

S5 de KCNQ1;

(b) isolamento de um complexo de anticorpo KCNQ5 - polipeptídeo KCNQ5 a partir da amostra.

84. Processo da reivindicação 83, onde o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em:

(a) um anticorpo que liga especificamente um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo SEQ ID NO: 2; e

(b) um anticorpo que liga especificamente um fragmento de polipeptídeo KCNQ5 compreendendo pelo menos 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 2, onde o dito fragmento inclui aminoácido 270 de SEQ ID NO: 2.

85. Processo de produção de um polipeptídeo KCNQ5 compreendendo:

(a) cultura de uma célula hospedeira transformada compreendendo um vetor de expressão; onde o dito vetor de expressão compreende um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

em um meio apropriado de modo que um polipeptídeo KCNQ5 seja produzido;

e
(b) opcionalmente, recuperando o polipeptídeo KCNQ5 de etapa (a).

86. (cancelada)

87. (cancelada)

88. (cancelada)

89. (cancelada)

90. Processo para obtenção de anticorpos polipeptídeos anti-KCNQ5 compreendendo:

(a) imunização de um animal com um polipeptídeo KCNQ5 imunogênico ou uma sua porção imunogênica única para um polipeptídeo
5 KCNQ5, onde o dito polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em

(i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e
10

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1; e

(b) isolando anticorpos a partir do animal, que se ligam especificamente a um polipeptídeo KCNQ5.

15 91. Processo da reivindicação 90, onde o polipeptídeo KCNQ5 é SEQ ID NO: 2.

92. Processo para ensaio de habilidade de um polipeptídeo KCNQ5 codificar um canal de íons funcional compreendendo:

(a) transfecção de uma célula hospedeira com um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 selecionado do grupo consistindo em:
20

(i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e
25

(iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(b) expressão de polipeptídeo KCNQ5 na célula hospedeira; e
(c) medição eletrofisiológica de magnitude de corrente de íons
30 do polipeptídeo KCNQ5.

93. Processo da reivindicação 92, onde a etapa (c) é realizada através de gravação de célula integral ou grameamento de voltagem de

dois eletrodos.

94. Processo da reivindicação 93, onde a gravação de célula integral a célula hospedeira é uma célula mamífera.

95. Processo da reivindicação 93, onde em grampeamento de
5 voltage de dois eletrodos a célula hospedeira é um oócito de *Xenopus laevis*.

96. (cancelada)

97. (cancelada)

98. Kit para detecção de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5
10 compreendendo:

(a) um composto marcado ou agente capaz de detectar um polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 em uma amostra biológica;

(b) meios para determinação de quantidade de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 na amostra;

15 (c) meios para comparar a quantidade de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 na amostra com um padrão; e

(d) opcionalmente, instruções para uso de kit para detectar polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5;

20 onde o polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

25 (iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

30 (v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

99. Kit para identificação de moduladores de atividade de KCNQ5 compreendendo:

(a) uma célula ou composição compreendendo um polipeptídeo KCNQ5;

5 (b) meios para determinação de atividade de polipeptídeo KCNQ5; e

(c) opcionalmente, instruções para uso de kit para identificar moduladores de atividade KCNQ5;

onde o polipeptídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

10 (i) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

15 (iii) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

100. Kit para diagnóstico de um distúrbio associado com expressão e/ou atividade aberrante de KCNQ5 em um sujeito compreendendo:

(a) um reagente para determinação de expressão de polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5;

20 (b) um controle ao qual os resultados do sujeito são comparados; e

(c) opcionalmente, instruções para uso do kit para propósitos diagnósticos;

25 onde o polipeptídeo ou polinucleotídeo KCNQ5 é selecionado do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

30 (iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos

cidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

101. (nova) Uso de uma molécula de KCNQ5 na fabricação de um medicamento para o tratamento de incontinência urinária ou dor neuropática, onde a molécula de KCNQ5 é selecionada do grupo consistindo em:

(i) um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(ii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1;

(iii) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1;

(iv) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo KCNQ5(W270L);

(v) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5-S6 de KCNQ1; e

(vi) um polipeptídeo KCNQ5 contendo um domínio transmembrana S5 de KCNQ1.

FIG. 1

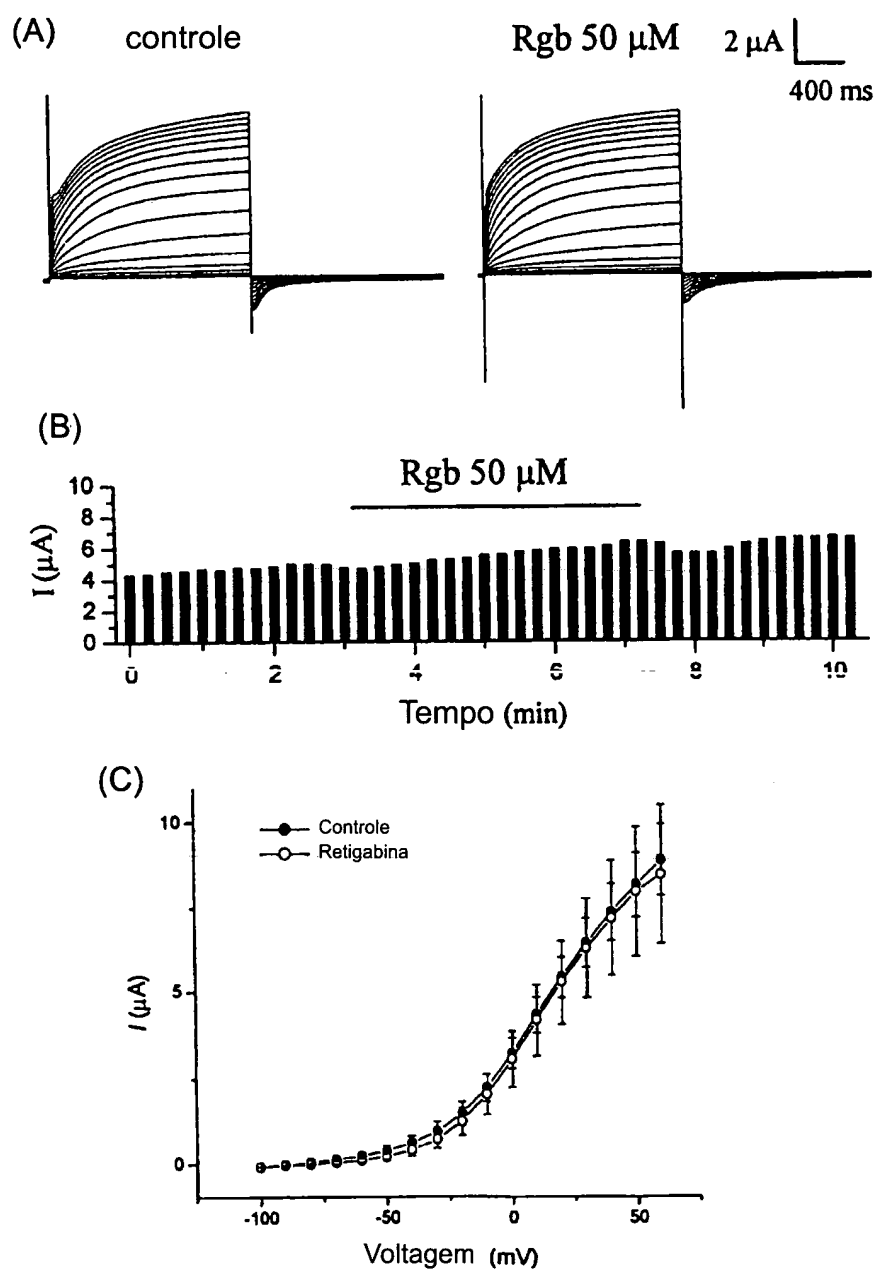


FIG. 2

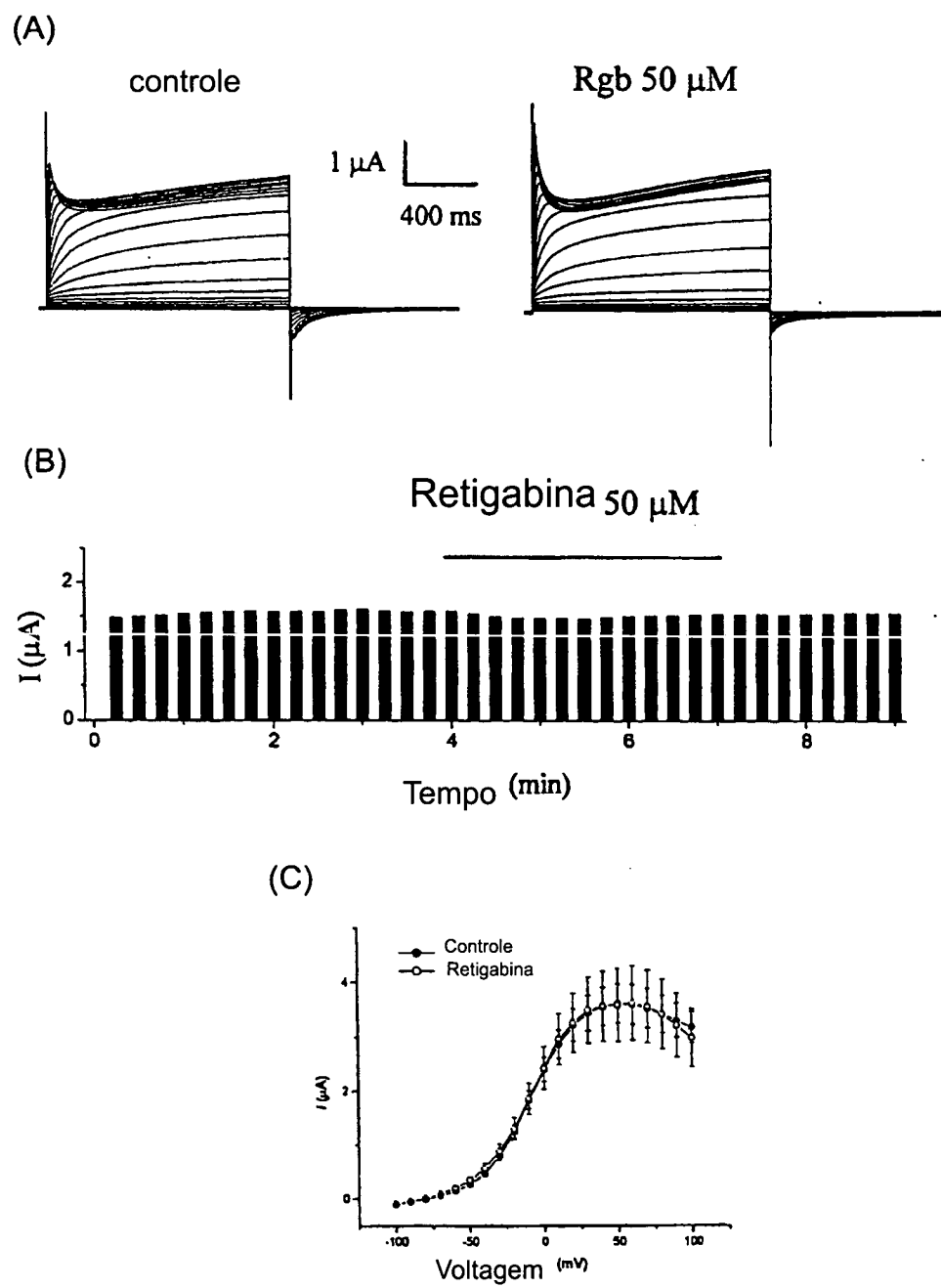


FIG. 3

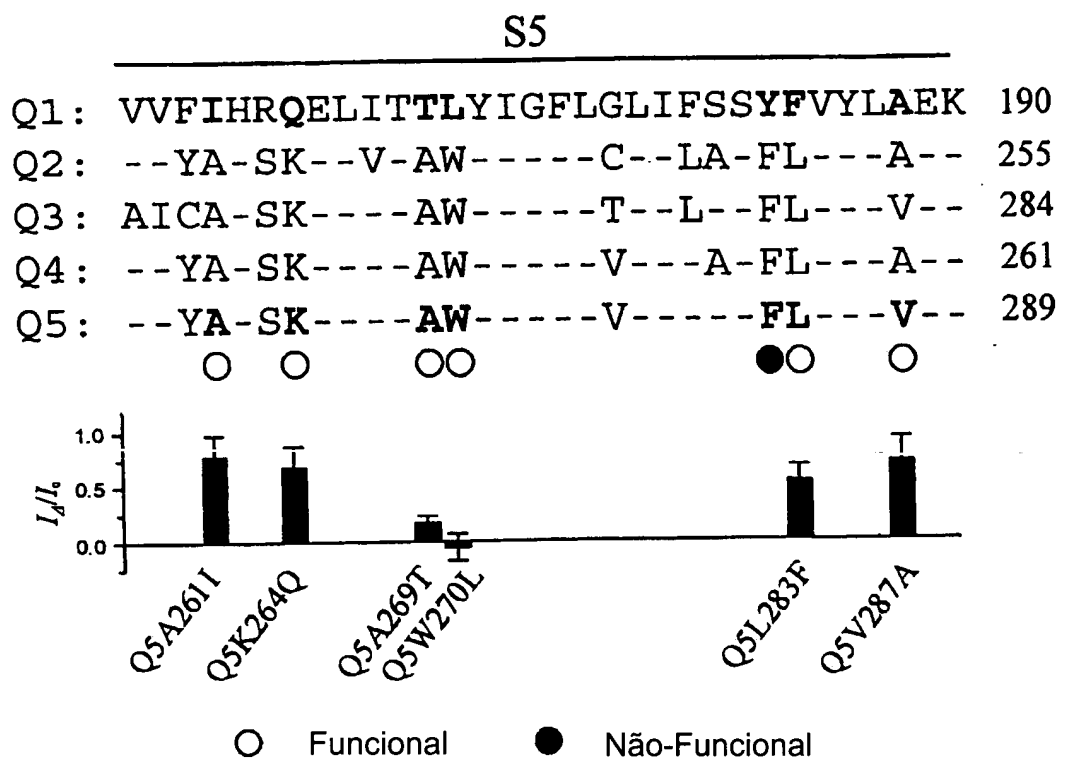
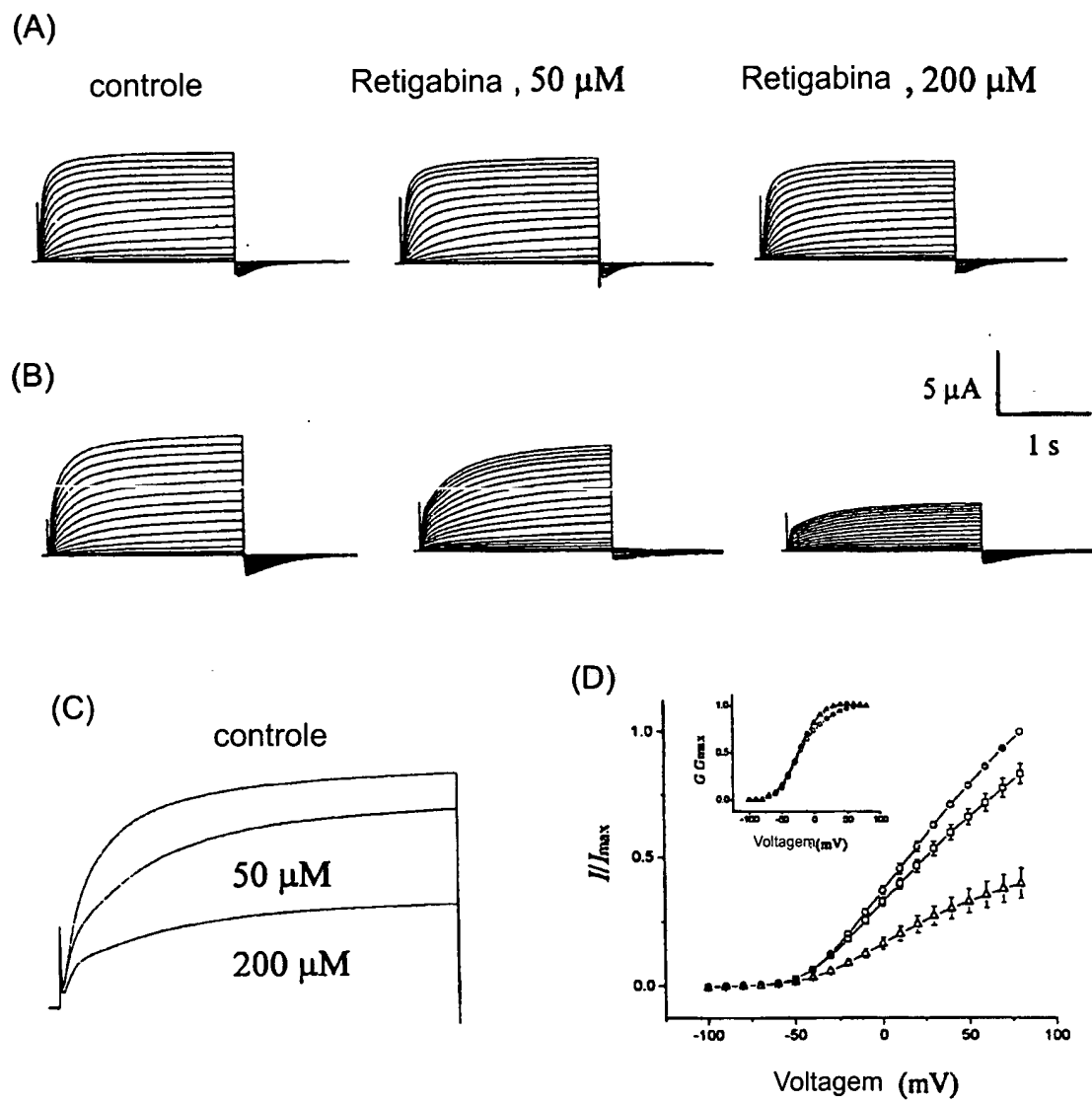


FIG. 4



RESUMO

Patente de Invenção: **"SITIO DE LIGAÇÃO PARA RETIGABINA SOBRE KCNQ5".**

- 5 São aqui mostrados seqüências de ácidos nucléicos e polipeptídeos de canais de potássio KCNQ5 mutados que carecem de capacidade de resposta para o ativador de canal de potássio retigabina. Também são aqui mostrados processos e kits relacionados ao uso dos canais de potássio KCNQ5 mutados mencionados anteriormente.