



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 443**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01976072 .7**

86 Fecha de presentación : **13.08.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1309690**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **MFQ-111, una proteína similar a GTPasa humana.**

30 Prioridad: **18.08.2000 EP 00117781**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es: **Masa Álvarez, Marc;
Rodes Gubern, Blanca;
Messeguer Peypoch, Ramón;
Rosell Vives, Elisabet y
Piulats Xanco, Jaume**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 265 443 T3

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

DESCRIPCIÓN

MFQ-111, una proteína similar a GTPasa humana.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a polipéptidos nuevamente identificados y polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, a veces denominados aquí posteriormente “nueva GTPasa humana (MFQ-111)”, a su uso en el diagnóstico y en la identificación de compuestos que pueden ser agonistas o antagonistas que son potencialmente útiles en terapia, y a la producción de tales polipéptidos y polinucleótidos.

Antecedentes de la invención

El proceso de descubrimiento de fármacos está sufriendo actualmente una revolución fundamental en lo que abarca la “genómica funcional”, esto es, la biología de alto rendimiento basada en el genoma o los genes. Este sistema como un medio para identificar genes y productos génicos como dianas terapéuticas está superando rápidamente a sistemas previos basados en la “clonación posicional”. Un fenotipo, esto es, una función biológica o enfermedad genética, se identificaría y este se rastrearía de nuevo hasta el gen responsable, basándose en su posición en el mapa genético.

La genómica funcional se basa profundamente en tecnologías de secuenciación de DNA de alto rendimiento y las diversas herramientas de la bioinformática para identificar secuencias génicas de interés potencial a partir de las muchas bases de datos de biología molecular ahora disponibles. Existe una necesidad persistente de identificar y caracterizar genes adicionales y sus polipéptidos/proteínas relacionados, como dianas para el descubrimiento de fármacos.

Está bien establecido que muchos procesos biológicos médicamente significativos están mediados por proteínas que participan en rutas de transducción de señales que implican proteínas G y/o segundos mensajeros, por ejemplo, cAMP (Lefkowitz, Nature, 1991, 351:353-354). Aquí, estas proteínas se denominan proteínas que participan en rutas con proteínas G o proteínas PPG. Algunos ejemplos de estas proteínas incluyen los receptores de GPC, tales como aquellos para agentes adrenérgicos y dopamina (Kobilka, B.K. y otros, Proc. Natl Acad. Sci., USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K. y otros, Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R. y otros, Nature, 1988, 336:783-787), las propias proteínas G, proteínas efectoras, por ejemplo, fosfolipasa C, adenilciclase y fosfodiesterasa, y proteínas actuadoras, por ejemplo, proteína quinasa A y proteína quinasa C (Simon, M.I. y otros, Science, 1991, 252:802-8).

Por ejemplo, en una forma de transducción de señal, el efecto de la unión a hormonas es la activación de la enzima, adenilato ciclase, dentro de la célula. La activación de la enzima por hormonas depende de la presencia del nucleótido GTP. El GTP también influye en la unión a hormonas. Una proteína G conecta el receptor de hormona a adenilato ciclase. Se observa que la proteína G intercambia GTP por GDP unido cuando es activada por un receptor de hormona. La forma que tiene GTP se une a continuación a adenilato ciclase activada. La hidrólisis de GTP en GDP, catalizada por la propia proteína G, devuelve la proteína G a su forma inactiva basal.

Así, la velocidad de hidrólisis de GTP determina la duración entre la activación biológica de la ruta de la señal y la desactivación. La superfamilia de GTPasa comprende transductores de señal de proteína G, lo más notablemente los productos de genes ras que regulan la velocidad de división celular (Linder, M. E. y otros, 1992, Scientific American, 56:56). Muchos receptores importantes de la superficie celular para hormonas y estímulos sensoriales, por ejemplo, transducen estímulos extracelulares en respuestas celulares promoviendo la formación del estado unido a GTP de sus dianas de GTPasa. Cada proteína de la familia es una conmutación molecular precisamente manipulada que puede cambiar sus afinidades para otras macromoléculas. Puesto en marcha uniéndose a GTP y desconectado hidrolizando GTP en GDP, el mecanismo de conmutación es notablemente versátil, permitiendo que diferentes GTPasas clasifiquen y amplifiquen señales de transmembrana, dirijan la síntesis y la translocación de proteínas, guíen el tráfico vesicular a través del citoplasma y controlen la proliferación y la diferenciación de células. Como dianas de mutación y toxinas microbianas, las GTPasas tienen papeles centrales en la patogénesis del cáncer y las enfermedades infecciosas (Boume, H. R. y otros, 1991, Nature, 349:117).

Ras es una pequeña GTPasa que se une a nucleótidos de guanina que transduce información biológica desde la superficie celular hacia el núcleo. Su capacidad para transferir señales de crecimiento desde tirosina quinasas receptoras hasta una cascada de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) la sitúa en el seno de las rutas de señalización que provocan la proliferación en células normales y el crecimiento descontrolado en células cancerosas. En efecto, las mutaciones que fijan Ras en su estado activo unido a GTP conducen a una transformación maligna y están entre las mutaciones más frecuentemente identificadas en cánceres humanos (Barbacid, M., Annu. Rev. Biochem., 1987, 56:779; McCormick, F., Nature, 1993, 363:15-16). La familia Ras de proteínas que se unen a GTP de bajo peso molecular se ha relacionado con una amplia gama de procesos celulares, incluyendo el crecimiento y la diferenciación celular, el tráfico vesicular intracelular, el transporte nucleocitoplásmico y la reorganización citoesquelética (Bourne, H. R. y otros, 1990, Nature, 348:125; Zerial, M. y otros, Guidebook to the Small GTPases, Oxford University Press, Nueva York (1995)).

Otra característica de la invención se refiere a la superfamilia de genes de proteínas de membrana de receptores acoplados a proteína G caracterizados por tener siete dominios de transmembrana putativos. Se cree que los dominios

representan hélices α de transmembrana conectadas mediante bucles extracelulares o citoplásmicos. Receptores acoplados a proteína G incluyen una amplia gama de receptores biológicamente activos, tales como hormonas, factores de crecimiento virales y neurorreceptores.

5 Los receptores acoplados a proteína G (conocidos de otro modo como receptores 7TM) se han caracterizado por incluir estas siete extensiones hidrófobas conservadas de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos, que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. La familia de proteínas G de receptores acoplados incluye receptores de dopamina que se unen a fármacos neurolépticos usados para tratar trastornos psicóticos y neurológicos. Otros ejemplos de miembros de esta familia incluyen, pero no se limitan a, receptores de calcitonina, adrenérgicos, de endotelina, de cAMP, de adenosina, muscarínicos, de acetilcolina, de serotonina, de histamina, de trombina, de quinina, de hormona estimulante del folículo, de opsinas, de gen de diferenciación endotelial 1, de rodopsinas, de odorizantes y de citomegalovirus.

15 La mayoría de los receptores acoplados a proteína G tienen residuos de cisteína conservados simples en cada uno de los dos primeros bucles extracelulares que forman enlaces de disulfuro que se cree que estabilizan la estructura de la proteína funcional. Las siete regiones de transmembrana se denominan TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 y TM7. TM3 se ha relacionado con la transducción de señales.

20 Los receptores acoplados a proteína G pueden acoplarse intracelularmente mediante proteínas G heterotrímeras a diversas enzimas intracelulares, canales y transportadores iónicos (véase Johnson y otros, *Endoc. Rev.*, 1989, 10:317-331). Diferentes subunidades α de proteína G estimulan preferentemente efectores particulares para modular diversas funciones biológicas en una célula. La fosforilación de residuos citoplásmicos de receptores acoplados a proteína G se ha identificado como un mecanismo importante para la regulación del acoplamiento a proteína G de algunos receptores acoplados a proteína G. Receptores acoplados a proteína G se encuentran en numerosos sitios dentro de un huésped mamífero.

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a MFQ-111, en particular polipéptidos y polinucleótidos de MFQ-111, a materiales recombinantes y a métodos para su producción. Tales polipéptidos y polinucleótidos son de interés en relación con métodos de tratamiento de ciertas enfermedades, incluyendo, pero no limitadas a, apoplejía cerebral, hipertrofia cardíaca, fallo cardíaco, isquemia, arritmia, angina de pecho, hipertensión, hipotensión, aterosclerosis, restenosis, inflamación crónica y aguda, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal, diabetes, cáncer, infecciones tales como infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias y virales, particularmente infecciones provocadas por HIV-1 o HIV-2, dolor, obesidad, anorexia, bulimia, asma, enfermedad de Parkinson, retención urinaria, osteoporosis, infarto de miocardio, úlceras, alergias, hipertrofia prostática benigna, migraña, vómitos, trastornos psicóticos y neurológicos, incluyendo ansiedad, esquizofrenia, depresión maníaca, depresión, delirio, demencia y retardo mental grave, y disquinesias, tales como enfermedad de Huntington o síndrome de Gilles de la Tourette, en lo sucesivo denominadas aquí "enfermedades de la invención". En un aspecto adicional, la invención se refiere a métodos para identificar agonistas y antagonistas (por ejemplo, inhibidores) usando los materiales proporcionados por la invención, y para tratar estados asociados con el desequilibrio de MFQ-111 con los compuestos identificados. En un aspecto adicional más, la invención se refiere a ensayos diagnósticos para detectar enfermedades asociadas con actividad o niveles de MFQ-111 inapropiados.

45 Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos de MFQ-111. Tales polipéptidos incluyen:

- 50 (a) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia del N° ID SEC: 1;
- (b) un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- 55 (c) un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- (d) un polipéptido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- 60 (e) la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2; y
- (f) un polipéptido que tiene o que comprende una secuencia polipeptídica que tiene un índice de identidad de 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 ó 0,99 en comparación con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- 65 (g) fragmentos y variantes de tales polipéptidos de (a) a (f).

Se cree que los polipéptidos de la presente invención son miembros de la familia MFQ-111 de polipéptidos. Por lo tanto, son de interés debido a que usando la técnica de hibridación substractiva es posible identificar genes expresados diferencialmente procedentes de un modelo de apoplejía en ratas (MCAO). Esta tecnología permite comparar dos

ES 2 265 443 T3

poblaciones de mRNA (o cDNA) y obtener clones de genes que se expresan o sobreexpresan en una población con respecto a otra. Se usa esta tecnología con cDNA derivado de mRNA extraído después de 2 horas de apoplejía, que contiene cDNA diferencialmente expresado (medidor). Se usó cDNA extraído de animales “en blanco” como cDNA de referencia (conductor).

5 Los clones positivos se confirmaron usando un análisis Northern inverso. Los clones positivos derivados de la biblioteca substraída se transfirieron por gotas sobre membranas de nailon y se hibridaron con cDNA de la segunda hebra derivado de mRNA extraído de cerebro de ratas “en blanco” y animales operados 2 y 4 horas después de la apoplejía. El clon A3/G12 se identificó como el gen expresado diferencial. El tamaño del inserto de estos clones era 10 333 pb. Analizando la secuencia usando el algoritmo BLAST X (J Mol Biol, 1990, 215, 403-410), los resultados mostraban alta homología con gen “tulipán” 2 de rata a nivel proteínico. La proteína homóloga humana se dedujo realizando alineamientos manuales.

15 mRNA de “tulipán” 1 de rata (AF041106) y mRNA de “tulipán” 2 de rata (AF041107) han sido descritos previamente por Hirao, K. y Takai, Y. como una proteína similar a tuberina identificada a través del rastreo de dos híbridos de levadura usando lin-10 de rata como un cebo. Los autores han descrito algunas nuevas proteínas neuronales relacionadas (JBC, 1998, 273:3470-3475; JBC, 1998, 273:21105-21110; JBC, 1998, 273:26269-26272; JBC, 1999, 274:11889-11896; JBC, 1999, 274:27463-27466). Sin embargo, no se ha descrito todavía una proteína humana similar a “tulipán”. Más recientemente, Tateno, M. y Hayashizaki, Y. describen el “tulipán” 1 (AB032400) como un nuevo miembro de la 20 familia de represores de SNAG.

El nuevo gen de MFQ-111 revela, usando una base de datos de dominios de proteínas tal como Pfam (Nucleic Acids Res., 1999, 27:260-262), un dominio Rap-GAP claro y 7 dominios de transmembrana putativos. La nueva proteína humana comprende así elementos inesperados de la superfamilia de proteínas 7-TM y la pequeña familia de 25 GTPasas.

La tuberina se ha descrito recientemente como una pequeña proteína de GTPasa de la superfamilia Ras con un dominio Rap-GAP que tiene un papel importante en la enfermedad del sistema nervioso central (Ultrastruc. Pathol., 2000, 24:93-98). Las proteínas que tienen el dominio efector de Ras de pequeñas GTPasas representan un papel en la 30 señalización y son reguladores de la proliferación celular (Curr Opp Cell Biol, 2000, 12:157-165).

Exposición

35 Las propiedades biológicas de la MFQ-111 se denominan aquí posteriormente “actividad biológica de MFQ-111” o “actividad de MFQ-111”. Preferiblemente, un polipéptido de la presente invención exhibe al menos una actividad biológica de MFQ-111.

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen variantes de los polipéptidos mencionados anteriormente, incluyendo todas las formas alélicas y variantes de reparación. Tales polipéptidos varían con respecto al polipéptido de referencia por inserciones, deleciones y sustituciones que pueden ser conservativas o no conservativas, o cualquier combinación de las mismas. Variantes particularmente preferidas son aquellas en las que varios, por ejemplo 40 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 ó 1 aminoácidos se insertan, substituyen o someten a deleción, en cualquier combinación.

45 Fragmentos preferidos de polipéptidos de la presente invención incluyen un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 30, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del N° ID SEC: 2, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 30, 50 ó 100 aminoácidos contiguos truncados o sometidos a deleción de la secuencia de aminoácidos del N° ID SEC: 2. Fragmentos preferidos son fragmentos biológicamente activos que median en la actividad biológica de MFQ-111, 50 incluyendo aquellos con una actividad similar o una actividad mejorada, o con una actividad no deseable disminuida. También se prefieren los fragmentos que son antigénicos o inmunogénicos en un animal, especialmente en un ser humano.

Fragmentos de los polipéptidos de la invención pueden emplearse para producir el correspondiente péptido de 55 longitud completa mediante síntesis de péptidos; por lo tanto, estas variantes pueden emplearse como productos intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa de la invención. Los polipéptidos de la presente invención pueden estar en la forma de la proteína “madura” o pueden ser partes de una proteína mayor tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo, es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líder, presecuencias, secuencias que ayudan a la purificación, por ejemplo múltiples residuos de 60 histidina, o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante.

Los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse de cualquier modo adecuado, por ejemplo mediante el aislamiento de fuentes presentes en la naturaleza, a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión (véase posteriormente) o mediante síntesis química, usando, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automatizados, o una combinación de tales métodos. Medios para preparar tales polipéptidos son 65 bien conocidos en la especialidad.

ES 2 265 443 T3

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a polinucleótidos de MFQ-111. Tales polinucleótidos incluyen:

- 5 (a) un polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia polinucleotídica del N° ID SEC: 1;
- (b) un polinucleótido que comprende el polinucleótido del N° ID SEC: 1;
- 10 (c) un polinucleótido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el polinucleótido del N° ID SEC: 1;
- (d) el polinucleótido del N° ID SEC: 1;
- 15 (e) un polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- (f) un polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2;
- 20 (g) un polinucleótido que tiene una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- (h) un polinucleótido que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2;
- 25 (i) un polinucleótido que tiene o que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene un índice de identidad de 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 ó 0,99 en comparación con la secuencia polinucleotídica del N° ID SEC: 1;
- 30 (j) un polinucleótido que tiene o que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica que tiene un índice de identidad de 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 ó 0,99 en comparación con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2; y

35 polinucleótidos que son fragmentos y variantes de los polinucleótidos mencionados anteriormente o que son complementarios con los polinucleótidos mencionados anteriormente, a lo largo de toda la longitud de los mismos.

Fragmentos preferidos de polinucleótidos de la presente invención incluyen un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 15, 30, 50 ó 100 nucleótidos contiguos de la secuencia del N° ID SEC: 1 o un polinucleótido que comprende una secuencia que tiene al menos 30, 50 ó 100 nucleótidos contiguos truncados o sometidos a delección de la secuencia del N° ID SEC: 1.

45 Variantes preferidas de polinucleótidos de la presente invención incluyen variantes de reparación, variantes alélicas y polimorfismos, incluyendo polinucleótidos que tienen uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen polinucleótidos que codifican variantes polipeptídicas que comprenden la secuencia de aminoácidos del N° ID SEC: 2 y en las que varios, por ejemplo 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 ó 1 residuos de aminoácido se substituyen, someten a delección o añaden, en cualquier combinación.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona polinucleótidos que son transcritos de RNA de las secuencias de DNA de la presente invención. De acuerdo con esto, se proporciona un polinucleótido de RNA que:

- 55 (a) comprende un transcrito de RNA de la secuencia de DNA que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2;
- (b) es el transcrito de RNA de la secuencia de DNA que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2;
- (c) comprende un transcrito de RNA de la secuencia de DNA del N° ID SEC: 1; o
- 60 (d) es el transcrito de RNA de la secuencia de DNA del N° ID SEC: 1;

y polinucleótidos de RNA que son complementarios del mismo.

65 La secuencia polinucleotídica del N° ID SEC: 1 muestra similitud con “tulipán” 1 de *R. norvegicus* (AF041106), “tulipán” 2 de *R. norvegicus* (AF041107), “tulipán” 1 de *M. musculus* (AB032400), cDNA de *H. sapiens* DKFZp566 D133 (HSM800380).

ES 2 265 443 T3

La secuencia polinucleotídica del N° ID SEC: 1 también muestra similitud con las siguientes secuencias listadas en la base de datos EMBL: cDNA de *H. sapiens* AL050050 y DNA de *H. sapiens* AL158070, procedentes del clon RP11-235C23 en el cromosoma 9, cDNA de *H. sapiens* AL040683. WO9518226 describe el uso del gen TSC2 para el diagnóstico del cáncer.

La secuencia de DNA humano AL158070 contiene un pseudogén, que muestra 99% de identidad con el presente N° ID SEC: 1, situado en el cromosoma 9, mientras que el gen de la proteína de la invención está situado en el cromosoma 14.

La secuencia de rata de AF041107 describe una proteína de 824 aminoácidos, una proteína de rata que es diferente de la proteína de 861 aminoácidos de la presente solicitud. El gen de rata está situado en el cromosoma 9.

cDNA de *H. sapiens* AL050050 describe un fragmento de proteína de 43,9 kDa hipotético humano con un total de 381 aminoácidos, que puede derivarse de riñón, sin embargo, no se relaciona información adicional con esta secuencia.

La secuencia polinucleotídica del N° ID SEC: 1 es una secuencia de cDNA que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2. La secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2 puede ser idéntica a la secuencia que codifica el polipéptido del N° ID SEC: 1 o puede ser una secuencia distinta del N° ID SEC: 1, que, como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifica el polipéptido del N° ID SEC: 2. El polipéptido del N° ID SEC: 2 se relaciona con otras proteínas de la familia de MFQ-111, que tienen homología y/o similitud estructural con "tulipán" 2 de *R. norvegicus* (AAB97076), "tulipán" 1 de *R. norvegicus* (AAB97075), KIAA1272 de *H. sapiens* (BAA8586).

Se espera que los polipéptidos y polinucleótidos preferidos de la presente invención tengan, entre otras cosas, funciones/propiedades biológicas similares a sus polipéptidos y polinucleótidos homólogos. Por otra parte, los polipéptidos y polinucleótidos preferidos de la presente invención tienen al menos una actividad de MFQ-111.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden obtenerse usando técnicas de clonación y rastreo estándar a partir de una biblioteca de cDNA derivada de mRNA en células de cerebro humano (véase, por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los polinucleótidos de la invención también pueden obtenerse a partir de fuentes naturales tales como bibliotecas de DNA genómico o pueden sintetizarse usando técnicas bien conocidas y disponibles comercialmente.

Cuando los polinucleótidos de la presente invención se usan para la producción recombinante de polipéptidos de la presente invención, el polinucleótido puede incluir la secuencia de codificación para el polipéptido maduro, por sí mismo, o la secuencia de codificación para el polipéptido maduro en el marco de lectura con otras secuencias de codificación, tales como las que codifican una secuencia líder o secretora, una pre- o pro- o prepro-secuencia de proteína u otras porciones de péptidos de fusión. Por ejemplo, puede codificarse una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas modalidades preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como el proporcionado en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y se describe en Gentz y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86:821-824, o es un radioisótopo de HA. El polinucleótido también puede contener secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como secuencias no traducidas transcritas, señales de reparación y poliadenilación, sitios de unión al ribosoma y secuencias que estabilizan mRNA.

Polinucleótidos que son idénticos o tienen suficiente identidad con una secuencia polinucleotídica del N° ID SEC: 1 pueden usarse como sondas de hibridación para cDNA y DNA genómico o como cebadores para una reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR). Tales sondas y cebadores pueden usarse para aislar cDNAs de longitud completa y clones genómicos que codifican polipéptidos de la presente invención y para aislar cDNA y clones genómicos de otros genes (incluyendo genes que codifican parálogos de fuentes humanas y ortólogos y parálogos de especies distintas a MFQ-111) que tienen una alta similitud de secuencia con el N° ID SEC: 1, típicamente al menos 95% de identidad. Sondas y cebadores preferidos comprenderán generalmente al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 30 nucleótidos y pueden tener al menos 50, si no al menos 100, nucleótidos. Sondas particularmente preferidas tendrán entre 30 y 50 nucleótidos. Cebadores particularmente preferidos tendrán entre 20 y 25 nucleótidos.

Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos de especies distintas a MFQ-111, puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de rastrear una biblioteca bajo condiciones de hibridación restrictivas con una sonda etiquetada que tiene la secuencia del N° ID SEC: 1 o un fragmento de la misma, preferiblemente de al menos 15 nucleótidos; y aislar cDNA de longitud completa y clones genómicos que tienen dicha secuencia polinucleotídica. Tales técnicas de hibridación son bien conocidas por el experto. Condiciones de hibridación restrictivas preferidas incluyen incubación nocturna a 42°C en una solución que comprende: 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 microgramos/ml de DNA de esperma de salmón sometido a cizallamiento desnaturalizado; seguido por lavar los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Así, la presente invención también incluye polinucleótidos aislados, preferiblemente con una secuencia de nucleótidos de al menos 100, obtenidos rastreando una biblioteca bajo condiciones de hibridación restrictivas con una sonda etiquetada que tiene la secuencia del N° ID SEC: 1 o un fragmento de la misma, preferiblemente de al menos 15 nucleótidos.

El experto apreciará que, en muchos casos, una secuencia de cDNA estará incompleta, ya que la región que codifica para el polipéptido no se extiende por todo el recorrido a través del extremo 5'. Esto es una consecuencia de la transcriptasa inversa, una enzima con "procesividad" (una medida de la capacidad de la enzima para permanecer ligada a la plantilla durante la reacción de polimerización) inherentemente baja, no pudiendo completar una copia de DNA de la plantilla de mRNA durante la síntesis del cDNA de la primera hebra.

Existen varios métodos disponibles y bien conocidos por los expertos en la especialidad para obtener cDNAs de longitud completa o extender cDNAs cortos, por ejemplo los basados en el método de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman y otros, Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988). Recientes modificaciones de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon (marca comercial) (Clontech Laboratories Inc.), por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de cDNAs más largos. En la tecnología Marathon (marca comercial), se han preparado cDNAs a partir de mRNA extraído de un tejido elegido y una secuencia "adaptadora" ligada en cada extremo. Se lleva a cabo a continuación la amplificación del ácido nucleico (PCR) para amplificar el extremo 5' "ausente" del cDNA usando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos para el gen y específicos para el adaptador. La reacción de PCR se repite a continuación usando cebadores "inclusivos", esto es, cebadores diseñados para reasociarse dentro del producto amplificado (típicamente un cebador específico para el adaptador que se reasocia adicionalmente 3' en la secuencia del adaptador y un cebador específico para el gen que se reasocia adicionalmente 5' en la secuencia génica conocida). Los productos de esta reacción pueden analizarse a continuación mediante secuenciación de DNA y construirse un cDNA de longitud completa enlazando el producto directamente al cDNA existente para dar una secuencia completa o llevando a cabo una PCR de longitud completa separada usando la nueva información de secuencia para el diseño del cebador 5'.

Polipéptidos recombinantes de la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la especialidad a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. De acuerdo con esto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células huésped que están manipuladas genéticamente con tales sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando RNAs derivados de los constructos de DNA de la presente invención.

Para la producción recombinante, las células huésped pueden manipularse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos para polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos pueden introducirse en células huésped mediante métodos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis y otros, Basic Methods in Molecular Biology (1986) y Sambrook y otros (ibídem). Métodos preferidos para introducir polinucleótidos en células huésped incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga de rasguños, introducción balística o infección.

Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como *Streptococci*, *Staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y células de melanoma de Bowes; y células de planta.

Puede usarse una gran variedad de sistemas de expresión, por ejemplo, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófago, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vacunales, adenovirus, poxvirus aviares, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan así como suscitan la expresión. Generalmente, puede usarse cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un polinucleótido para producir un polipéptido en un huésped. La secuencia polinucleotídica apropiada puede insertarse en un sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y habituales, tales como, por ejemplo, las indicadas en Sambrook y otros (ibídem). Señales de secreción apropiadas pueden incorporarse en el polipéptido deseado para permitir la secreción de la proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el ambiente extracelular. Estas señales pueden ser endógenas para el polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Si un polipéptido de la presente invención ha de expresarse para usar en ensayos de rastreo, generalmente se prefiere que el polipéptido se produzca en la superficie de la célula. En este caso, las células pueden recogerse antes de usar en el ensayo de rastreo. Si el polipéptido se secreta en el medio, el medio puede recuperarse para recuperar y purificar el polipéptido. Si se produce intracelularmente, las células deben someterse a lisis en primer lugar antes de que el polipéptido se recupere.

Los polipéptidos de la presente invención pueden recuperarse y purificarse de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, fotocromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatito y cromatografía en lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución para la purificación. Técnicas bien conocidas para replegar

proteínas pueden emplearse para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, el aislamiento y/o la purificación.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse como reactivos diagnósticos, a través de la detección de mutaciones en el gen asociado. La detección de una forma mutada del gen caracterizado por el polinucleótido del N° ID SEC: 1 en las secuencias de cDNA o genómica y que está asociado con una disfunción proporcionará una herramienta diagnóstica que puede añadirse a, o definir, un diagnóstico de una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad, que resulta de la subexpresión, sobreexpresión o expresión espacial o temporal alterada del gen. Los individuos que tienen mutaciones en el gen pueden detectarse a nivel de DNA mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la especialidad.

Ácidos nucleicos para diagnóstico pueden obtenerse a partir de células de sujetos, tal como material de sangre, orina, saliva, biopsia tisular o autopsia. El DNA genómico puede usarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente usando PCR, preferiblemente RT-PCR, u otras técnicas de amplificación antes del análisis. El RNA o el cDNA también puede usarse de un modo similar. Las deleciones e inserciones pueden detectarse mediante un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el fenotipo normal. Pueden identificarse mutaciones puntuales hibridando DNA amplificado a secuencias de nucleótidos de MFQ-111 etiquetadas. Las secuencias perfectamente acopladas pueden distinguirse de dúplex desacoplados mediante digestión con RNasa o mediante diferencias en las temperaturas de fusión. La diferencia de las secuencias de DNA también puede detectarse mediante alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de DNA en geles, con o sin agentes desnaturalizantes, o mediante secuenciación de DNA directa (véase, por ejemplo, Myers y otros, *Science* (1985) 230:1242). Cambios en la secuencia en situaciones específicas también pueden revelarse mediante ensayos de protección con nucleasas, tales como protección con RNasa y S1 o el método de segmentación química (véase Cotton y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 85: 4397-4401).

Puede construirse una serie de sondas oligonucleotídicas que comprenden la secuencia polinucleotídica de MFQ-111 o fragmentos de la misma para efectuar un rastreo eficaz de, por ejemplo, mutaciones genéticas. Tales series son preferiblemente series o redes de alta densidad. Los métodos de la tecnología de las series son bien conocidos y tienen una aplicabilidad general y pueden usarse para tratar una variedad de cuestiones en la genética molecular, incluyendo la expresión genética, la conexión genética y la variabilidad genética, véase, por ejemplo, M. Chee y otros, *Science*, 274, 610-613 (1996) y otras referencias citadas allí.

La detección de niveles anormalmente disminuidos o incrementados de polipéptidos o la expresión de mRNA también pueden usarse para diagnosticar o determinar la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad de la invención. La expresión disminuida o incrementada puede medirse a nivel del RNA usando cualquiera de los métodos bien conocidos en la especialidad para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo PCR, RT-PCR, protección con RNasa, transferencia Northern y otros métodos de hibridación. Son bien conocidas por los expertos en la especialidad técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar niveles de una proteína, tal como un polipéptido de la presente invención, en una muestra derivada de un huésped. Tales métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis por transferencia Western y ensayos de ELISA.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un estuche diagnóstico que comprende:

- (a) un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente la secuencia de nucleótidos del N° ID SEC: 1, o un fragmento o un transcrito de RNA del mismo;
- (b) una secuencia de nucleótidos complementaria con la de (a);
- (c) un polipéptido de la presente invención, preferiblemente el polipéptido del N° ID SEC: 2, o un fragmento del mismo; o
- (d) un anticuerpo para un polipéptido de la presente invención, preferiblemente para el polipéptido del N° ID SEC: 2.

Se apreciará que cualquiera de tales estuches, (a), (b), (c) o (d), puede comprender un componente substancial. Tal estuche se usará para diagnosticar una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad, particularmente a las enfermedades de la invención, entre otras.

Las secuencias polinucleotídicas de la presente invención son valiosas para estudios de localización de cromosomas. La secuencia está orientada específicamente a, y puede hibridarse con, una localización particular en un cromosoma humano individual. El mapeo de secuencias pertinentes para cromosomas de acuerdo con la presente invención es una primera etapa importante para correlacionar esas secuencias con una enfermedad asociada a los genes. Una vez que una secuencia se ha mapeado hasta una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede correlacionarse con los datos del mapa genético. Tales datos se encuentran en, por ejemplo, V. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man* (disponible en línea a través de Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades que se han mapeado hasta la misma región cromosómica se iden-

tífica a continuación a través de análisis de conexión (co-herencia de genes físicamente adyacentes). Localizaciones cromosómicas humanas precisas para una secuencia genómica (fragmento génico, etc.) pueden determinarse usando Mapeo de Híbridos de Radiación (RH) (Walter, M. Spillett, D., Thomas, P., Weissenbach, J., y Goodfellow, P., (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, *Nature Genetics* 7, 22-28). Un número de grupos de RH está disponible de Research Genetics (Huntsville, AL, USA), por ejemplo, el grupo de RH GeneBridge4 (Hum Mol Genet 1996 Mar; 5(3):339-46 A radiation hybrid map of the human genome. Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN). Para determinar la localización cromosómica de un gen usando este grupo, se realizan 93 PCRs usando cebadores diseñados a partir del gen de interés sobre DNAs de RH. Cada uno de estos DNAs contiene fragmentos genómicos humanos aleatorios mantenidos en un fondo de hámster (líneas celulares híbridas de ser humano/hámster). Estas PCRs dan como resultado 93 evaluaciones que indican la presencia o ausencia del producto de PCR del gen de interés. Estas evaluaciones se comparan con evaluaciones creadas usando productos de PCR procedentes de secuencias genómicas de localización conocida. Esta comparación se efectúa en <http://www.genome.wi.mit.edu/>. El gen de la presente invención se mapea hasta el cromosoma humano 14.

Las secuencias polinucleotídicas de la presente invención también son herramientas valiosas para estudios de expresión en tejidos. Tales estudios permiten la determinación de patrones de expresión de polinucleótidos de la presente invención que pueden dar una indicación en cuanto a los patrones de expresión de los polipéptidos codificados en tejidos, detectando los mRNAs que los codifican. Las técnicas usadas son bien conocidas en la especialidad e incluyen técnicas de hibridación *in situ* a clones dispuestos en una red, tales como hibridación de microseries de cDNA (Schenca y otros, *Science*, 270, 467-470, 1995 y Shalon y otros, *Genome Res*, 6, 639-645, 1996) y técnicas de amplificación de nucleótidos tales como PCR. Un método preferido usa la tecnología TAQMAN (marca comercial) disponible de Perkin Elmer. Los resultados de estos estudios pueden proporcionar una indicación de la función normal del polipéptido en el organismo. Además, estudios comparativos del patrón de expresión normal de mRNAs con el de mRNAs codificados por una forma alternativa del mismo gen (por ejemplo, una que tiene una alteración en el potencial de codificación del polipéptido o una mutación reguladora) pueden proporcionar percepciones valiosas del papel de los polipéptidos de la presente invención, o de su expresión inapropiada en la enfermedad. Tal expresión inapropiada puede ser de naturaleza temporal, espacial o simplemente cuantitativa.

Los polipéptidos de la presente invención se expresan en cerebro, amígdala, cerebelo, cerebro de niño, corazón, placenta, pulmón, pulmón fetal, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, timo, próstata, testículo, ovario, célula T, bazo vivo fetal, tumor endometrial, tumor testicular, carcinoma de mama, carcinoma pulmonar, adenocarcinoma de colon y adenocarcinoma pancreático.

Los polipéptidos y los polinucleótidos de la presente invención también pueden usarse como vacunas. De acuerdo con esto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero, que comprende inocular al mamífero con un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir respuesta inmunitaria de anticuerpos y/o células T, incluyendo, por ejemplo, células T productoras de citoquinas o células T citotóxicas, para proteger a dicho animal de la enfermedad, esté esta enfermedad está establecida dentro del individuo o no. Una respuesta inmunológica en un mamífero también puede inducirse mediante un método que comprende aportar un polipéptido de la presente invención a través de un vector que dirija la expresión del polinucleótido y que codifique para el polipéptido *in vivo* para inducir tal respuesta inmunológica para producir anticuerpo para proteger a dicho animal de enfermedades de la invención. Una manera de administrar el vector es acelerándolo dentro de las células deseadas como un revestimiento sobre partículas o de otro modo. Tal vector de ácido nucleico puede comprender DNA, RNA, un ácido nucleico modificado o un híbrido de DNA/RNA. Para usar una vacuna, un polipéptido o un vector de ácido nucleico se proporcionarán normalmente como una formulación (composición) de vacuna. La formulación puede comprender además un portador adecuado. Puesto que un polipéptido puede descomponerse en el estómago, se administra preferiblemente de forma parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiere solo la adición del portador líquido estéril inmediatamente antes de usar. La formulación de vacuna también puede incluir sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación, tales como sistemas de aceite en agua y otros sistemas conocidos en la especialidad. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y puede determinarse fácilmente mediante experimentación habitual.

Los polipéptidos de la presente invención tienen una o más funciones biológicas que son pertinentes en uno o más estados de enfermedad, en particular las enfermedades de la invención mencionadas previamente aquí. Por lo tanto, es útil identificar compuestos que estimulan o inhiben la función o el nivel del polipéptido. De acuerdo con esto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para rastrear compuestos para identificar los que estimulan o inhiben la función o el nivel del polipéptido. Tales métodos identifican agonistas o antagonistas que pueden emplearse con propósitos terapéuticos y profilácticos para enfermedades de la invención tales como las mencionadas anteriormente aquí. Los compuestos pueden identificarse a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, células, preparaciones libres de células, bibliotecas químicas, colecciones de compuestos químicos y mezclas de productos naturales. Tales agonistas o antagonistas así identificados pueden ser substratos, ligandos, receptores, enzimas, etc.,

ES 2 265 443 T3

naturales o modificados, según sea el caso, del polipéptido; un mimético estructural o funcional del mismo (véase Coligan y otros, *Current Protocols in Immunology* 1 (2):Capítulo 5 (1991)) o una molécula pequeña.

5 El método de rastreo puede medir simplemente la unión de un compuesto pretendido al polipéptido o a células o membranas que tienen el polipéptido, o a una proteína de fusión del mismo, por medio de una etiqueta asociada directamente o indirectamente con el compuesto pretendido.

Otros métodos para detectar agonistas o antagonistas para el receptor de la presente invención son la tecnología basada en levaduras que se describe en la Patente de EE.UU. 5.482.835.

10 Una técnica de rastreo incluye el uso de células que expresan el receptor de esta invención (por ejemplo, células CH transfectadas) en un sistema que mide cambios de pH extracelular o calcio intracelular provocados por la activación del receptor. En esta técnica, los compuestos pueden ponerse en contacto con células que expresan el polipéptido receptor de la presente invención. Se mide a continuación una respuesta de segundo mensajero, por ejemplo una transducción de señal, cambios en el pH o cambios en el nivel de calcio, para determinar si el compuesto potencial activa o inhibe el receptor.

Otro método implica rastrear inhibidores del receptor determinando la inhibición o la estimulación de cAMP mediado por receptor y/o la acumulación de adenilato ciclasa. Tal método implica transfectar una célula eucariótica con el receptor de esta invención para expresar el receptor sobre la superficie celular. La célula se expone a continuación a antagonistas potenciales en presencia del receptor de esta invención. La cantidad de acumulación de cAMP se mide a continuación. Si el antagonista potencial se une al receptor, y así inhibe la unión al receptor, los niveles de cAMP mediado por receptor o de adenilato ciclasa, la actividad se reducirá o incrementará.

25 Otros métodos para detectar agonistas o antagonistas para el receptor de la presente invención son la tecnología basada en levaduras que se describe en la Patente de EE.UU. 5.482.835.

Técnicas de rastreo

30 Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos para el polipéptido de la presente invención también pueden usarse para configurar métodos de rastreo para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de mRNA y polipéptido en células. Por ejemplo, puede construirse un ensayo de ELISA para medir niveles secretados o asociados a células de polipéptido usando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante métodos estándar conocidos en la especialidad. Esto puede usarse para descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de polipéptido (también llamados antagonista o agonista, respectivamente) a partir de células o tejidos adecuadamente manipulados.

Un polipéptido de la presente invención puede usarse para identificar receptores unidos a membrana solubles, si los hay, a través de técnicas de unión a receptores estándar conocidas en la especialidad. Estas incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión y reticulación de ligandos en los que el polipéptido se etiqueta con un isótopo radiactivo (por ejemplo, ¹²⁵I), se modifica químicamente (por ejemplo, se biotinila) o se fusiona a una secuencia peptídica adecuada para la detección o purificación, y se incuba con una fuente del receptor putativo (células, membranas celulares, sobrenadantes celulares, extractos tisulares, fluidos corporales). Otros métodos incluyen técnicas biofísicas tales como resonancia de plasmones superficiales y espectroscopía. Estos métodos de rastreo también pueden usarse para identificar agonistas y antagonistas del polipéptido que compiten con la unión del polipéptido a sus receptores, si los hay. Métodos estándar para efectuar tales ensayos son bien conocidos en la especialidad.

Ejemplos de antagonistas de polipéptidos de la presente invención incluyen anticuerpos o, en algunos casos, oligonucleótidos o proteínas que están estrechamente relacionados con los ligandos, substratos, receptores, enzimas, etc, según sea el caso, del polipéptido, por ejemplo, un fragmento de los ligandos, substratos, receptores, enzimas, etc.; o una molécula pequeña que se une al polipéptido de la presente invención pero no provoca una respuesta, de modo que se evita la actividad del polipéptido.

Los métodos de rastreo también pueden implicar el uso de tecnología transgénica y el gen MFQ-111. La especialidad de construir animales transgénicos está bien establecida. Por ejemplo, el gen MFQ-111 puede introducirse a través de microinyección en el pronúcleo masculino de oocitos fertilizados, transferencia retroviral en embriones pre- o post-implantación, o inyección de células pluripotenciales embrionarias genéticamente modificadas, tal como mediante electroporación, en blastocistos del huésped. Animales transgénicos particularmente útiles son los llamados animales “knock-in” en los que un gen del animal se reemplaza por el equivalente de ser humano dentro del genoma de ese animal. Los animales transgénicos “knock-in” son útiles en el procedimiento de descubrimiento de fármacos, para validación de dianas, donde el compuesto es específico para la diana humana. Otros animales transgénicos útiles son los llamados animales “knock-out” en los que la expresión del ortólogo animal de un polipéptido de la presente invención y codificado por una secuencia de DNA endógena en una célula se anula parcialmente o completamente. El gen “knock-out” puede orientarse a células o tejidos específicos, puede presentarse solo en ciertas células o tejidos como consecuencia de las limitaciones de la tecnología o puede presentarse en todas, o substancialmente todas, las células del animal.

La tecnología de animales transgénicos también ofrece un sistema de expresión-clonación de animales enteros en los que genes introducidos se expresan para dar grandes cantidades de polipéptidos de la presente invención.

ES 2 265 443 T3

Estuches de rastreo para usar en los métodos descritos anteriormente forman un aspecto adicional de la presente invención. Tales estuches de rastreo comprenden:

- (a) un polipéptido de la presente invención;
- (b) una célula recombinante que expresa un polipéptido de la presente invención;
- (c) una membrana celular que expresa un polipéptido de la presente invención; o
- (d) un anticuerpo para un polipéptido de la presente invención;

polipéptido que es preferiblemente el del N° ID SEC: 2.

Se apreciará que en cualquiera de tales estuches, (a), (b), (c) o (d) pueden comprender un componente substancial.

Glosario

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados frecuentemente más adelante aquí.

“Anticuerpos”, según se usa aquí, incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados, así como fragmentos Fab, incluyendo los productos de un Fab u otra biblioteca de expresión de inmunoglobulinas.

“Aislado” significa alterado (por la mano del hombre) desde su estado natural, es decir, si está presente en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente naturalmente en un organismo vivo no está “aislado” pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, según se emplea el término aquí. Por otra parte, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo mediante transformación, manipulación genética o mediante cualquier otro método recombinante está “aislado” incluso si todavía está presente en dicho organismo, organismo que puede estar vivo o no.

“Polinucleótido” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido (RNA) o polidesoxirribonucleótido (DNA), que puede ser RNA o DNA no modificado o modificado. “Polinucleótidos” incluyen, sin limitación, DNA de una sola hebra y de doble hebra, DNA que es una mezcla de regiones de una sola hebra y de doble hebra, RNA de una sola hebra y RNA que es una mezcla de regiones de una sola hebra y de doble hebra, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser de una sola hebra o, más típicamente, de doble hebra o una mezcla de regiones de una sola hebra y de doble hebra, además, “polinucleótido” se refiere a regiones de triple hebra que comprenden RNA o DNA o tanto RNA como DNA. El término “polinucleótido” también incluye DNAs o RNAs que contienen una o más bases modificadas y DNAs y RNAs con cadenas principales modificadas con respecto a la estabilidad o por otras razones. Bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Puede hacerse una variedad de modificaciones al DNA y el RNA; así, “polinucleótido” abarca formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas de polinucleótidos que se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células. “Polinucleótido” también abarca polinucleótidos relativamente cortos, a menudo denominados oligonucleótidos.

“Polipéptido” se refiere a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos enlazados entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. “Polipéptido” se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados por genes. “Polipéptidos” incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procesos naturales, tales como procesamiento post-traduccional, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la especialidad. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte de un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente hasta grados iguales o variables en varios sitios de un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones.

Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Pueden resultar polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados de procesos naturales de post-traduccion o pueden elaborarse mediante métodos sintéticos. Modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, biotilación, ligación covalente de flavina, ligación covalente de un resto de heme, ligación covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, ligación covalente de un lípido o derivado de lípido, ligación covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, fenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, transferencia-adición mediada por RNA de aminoácidos en proteínas, tales como arginilación, y ubiquitinación (véase, por ejemplo, Proteins - Structure

ES 2 265 443 T3

and Molecular Properties, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, en Post-translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983; Seifter y otros, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol, 182, 626-646, 1990 y Rattan y otros, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci, 663, 48-62, 1992).

5 "Fragmento" de una secuencia polipeptídica se refiere a una secuencia polipeptídica que es más corta que la secuencia de referencia pero que retiene esencialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido de referencia. "Fragmento" de una secuencia polinucleotídica se refiere a una secuencia polinucleotídica que es más corta que la secuencia de referencia de N° ID SEC: 1.

10 "Variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero retiene las propiedades esenciales del mismo. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, según se analiza posteriormente. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Generalmente, las alteraciones está limitadas de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son estrechamente similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Un polipéptido variante y de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, inserciones, deleciones o cualquier combinación. Un residuo de aminoácido substituido o insertado puede ser o no codificado por el código genético. Sustituciones conservativas típicas incluyen Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg y Phe y Tyr. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede estar presente en la naturaleza, tal como un alelo, o puede ser una variante que no se conoce que esté presente en la naturaleza. Variantes no presentes en la naturaleza de polinucleótidos y polipéptidos pueden elaborarse mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa. También se incluyen como variantes polipéptidos que tienen una o más modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación, metilación, ribosilación de ADP y similares. Modalidades incluyen la metilación del aminoácido N-terminal, fosforilaciones de serinas y treoninas y modificación de glicinas C-terminales.

30 "Alelo" se refiere a una de dos o más formas alternativas de un gen que se presenta en un locus dado en el genoma.

35 "Polimorfismo" se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos (y la secuencia polipeptídica codificada, si es pertinente) en una posición dada en el genoma dentro de una población.

40 "Polimorfismo de un solo nucleótido" (SNP) se refiere a la presencia de variabilidad nucleotídica en una sola posición nucleotídica en el genoma, dentro de una población. Un SNP puede producirse dentro de un gen o dentro de regiones intergénicas del genoma. Los SNPs pueden ensayarse usando amplificación específica del alelo (ASA). Para el procedimiento se requieren al menos tres cebadores. Un cebador común se usa en el complemento inverso al polimorfismo que se ensaya. Este cebador común puede estar entre 50 y 1500 pbs desde la base polimorfa. Los otros dos (o más) cebadores son idénticos entre sí excepto que la base 3' final oscila para ajustarse a uno de los (o más) alelos que constituyen el polimorfismo. Dos (o más) reacciones de PCR se efectúan a continuación sobre DNA de muestra, cada una usando el cebador común y uno de los Cebadores Específicos del Alelo.

45 "Variante de reparación", según se usa aquí, se refiere a moléculas de cDNA producidas a partir de moléculas de RNA inicialmente transcritas a partir de la secuencia de DNA genómico pero que han sufrido reparación de RNA alternativa. La reparación de RNA alternativa se produce cuando un transcrito de DNA primario sufre reparación, generalmente para la retirada de intrones, lo que da como resultado la producción de más de una molécula de mRNA, cada una de las cuales puede codificar diferentes secuencias de aminoácidos. El término variante de reparación también se refiere a las proteínas codificadas por las moléculas de cDNA anteriores.

50 "Identidad" refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de la secuencia de los dos polinucleótidos o dos polipéptidos, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se comparan.

60 "% de identidad" - Para secuencias en las que no existe una correspondencia exacta, puede determinarse un "% de identidad". En general, las dos secuencias que han de compararse se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una cualquiera o ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. Un % de identidad puede determinarse a lo largo de toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (llamado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de longitud igual o muy similar, o a lo largo de longitudes definidas más cortas (el llamado alineamiento local), esto es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

65 "Similitud" es una medida adicional más sofisticada de la relación entre dos secuencias polipeptídicas. En general, "similitud" significa una comparación entre los aminoácidos de dos cadenas polipeptídicas, sobre una base de residuo por residuo, teniendo en cuenta no solo correspondencias exactas entre pares de residuos, uno de cada una de las secuencias que se comparan (como para la identidad), sino también, cuando no existe una corresponden-

cia exacta, si, en una base evolutiva, un residuo es un sustituto probable para el otro. Esta probabilidad tiene una "evaluación" asociada a partir de la cual puede determinarse a continuación el "% de similitud" de las dos secuencias.

5 Métodos para comparar la identidad y la similitud de dos o más secuencias son bien conocidos en la especialidad. Así, por ejemplo, programas disponibles en Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J y otros, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984, disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de similitud entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (J Mol Biol, 147,195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981) y encuentra la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. BESTFIT es más adecuado para comparar secuencias de dos polinucleótidos o dos polipéptidos que son diferentes en longitud, suponiendo el programa que la secuencia más corta representa una porción de la más larga. En comparación, GAP alinea dos secuencias, encontrando una "similitud máxima", de acuerdo con el algoritmo de Needleman y Wunsch (J Mol Biol, 48, 443-453, 1970). GAP es más adecuado para comparar secuencias que tienen aproximadamente la misma longitud y se espera un alineamiento a lo largo de toda la longitud. Preferiblemente, los parámetros "peso de los huecos" y "peso de la longitud" usados en cada programa son 50 y 30, para secuencias polinucleotídicas, y 12 y 4 para secuencias polipeptídicas, respectivamente. Preferiblemente, los % de identidades y similitudes se determinan cuando las dos secuencias que se comparan están alineadas óptimamente.

20 Otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias también son conocidos en la especialidad, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F y otros, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F y otros, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997, disponible de the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA y accesible a través de la página principal del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R y Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444-2448, 1988, disponible como parte de Wisconsin Sequence Analysis Package).

30 Preferiblemente, se usa la matriz de sustituciones de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S y Henikoff J G, Proc. Nat. Acad Sci. USA, 89, 10915-10919, 1992) en comparaciones de secuencias polipeptídicas incluyendo cuando las secuencias de nucleótidos se traducen en primer lugar en secuencias de aminoácidos antes de la comparación.

35 Preferiblemente, el programa BESTFIT se usa para determinar el % de identidad de un polinucleótido o una secuencia polipeptídica interrogados, con respecto a un polinucleótido o una secuencia polipeptídica de referencia, estando la secuencia interrogada y de referencia óptimamente alineadas y los parámetros del programa fijados al valor por defecto, según se describe anteriormente aquí.

40 "Índice de identidad" es una medida de la afinidad de secuencias que puede usarse para comparar una secuencia (polinucleótido o polipéptido) propuesta y una secuencia de referencia. Así, por ejemplo, una secuencia polinucleotídica propuesta que tiene, por ejemplo, un índice de identidad de 0,95 en comparación con una secuencia polinucleotídica de referencia es idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia polinucleotídica propuesta puede incluir de media hasta cinco diferencias por cada 100 nucleótidos de la secuencia de referencia. Tales diferencias se seleccionan del grupo que consiste en al menos una delección, sustitución, incluyendo transcripción y transversión, o inserción de nucleótido. Estas diferencias pueden producirse en las posiciones 5' - o 3'-terminales de la secuencia polinucleotídica de referencia o en cualquier parte entre estas posiciones terminales, intercalada individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia polinucleotídica que tiene un índice de identidad de 0,95 en comparación con una secuencia polinucleotídica de referencia, una media de hasta 5 de cada 100 de los nucleótidos de la secuencia de referencia puede someterse a delección, substituirse o insertarse, o cualquiera de sus combinaciones, según se describe anteriormente aquí. Lo mismo se aplica mutatis mutandis para otros valores del índice de identidad, por ejemplo 0,96, 0,97, 0,98 ó 0,99.

55 De forma similar, para un polipéptido, una secuencia polipeptídica propuesta que tiene, por ejemplo, un índice de identidad de 0,95 en comparación con una secuencia polipeptídica de referencia es idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia polipeptídica puede incluir una media de hasta cinco diferencias por cada 100 aminoácidos de la secuencia de referencia. Tales diferencias se seleccionan del grupo que consiste en al menos una delección, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácido. Estas diferencias pueden producirse en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier parte entre estas posiciones terminales, intercalada individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia polipeptídica que tiene un índice de identidad de 0,95 en comparación con una secuencia polipeptídica de referencia, una media de hasta 5 de cada 100 de los aminoácidos de la secuencia de referencia puede someterse a delección, substituirse o insertarse, o cualquiera de sus combinaciones, según se describe anteriormente aquí. Lo mismo se aplica mutatis mutandis para otros valores del índice de identidad, por ejemplo 0,96, 0,97, 0,98 y 0,99.

ES 2 265 443 T3

La relación entre el número de diferencias de nucleótidos o aminoácidos y el índice de identidad puede expresarse en la siguiente ecuación:

$$n_a \leq x_a - (X_a \cdot I),$$

en la que:

n_a es el número de diferencias de nucleótidos o aminoácidos,

x_a es el número total de nucleótidos o aminoácidos en el N° ID SEC: 1 o el N° ID SEC: 2, respectivamente,

I es el índice de identidad,

• es el símbolo para el operador multiplicación, y

en la que cualquier producto no entero de x_a e I se redondea por defecto hasta el número entero más cercano antes de abstraerlo de x_a .

“Homólogo” es un término genérico usado en la especialidad para indicar una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que posee un alto grado de afinidad de secuencia con una secuencia de referencia. Tal afinidad puede cuantificarse determinando el grado de identidad y/o similitud entre las dos secuencias según se define anteriormente aquí. Entrando dentro de este término genérico están los términos “ortólogo” y “parálogo”. “Ortólogo” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que es el equivalente funcional del polinucleótido o polipéptido de otra especie. “Parálogo” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que dentro de la misma especie es funcionalmente similar.

Ejemplos adicionales

Ejemplo 1

Expresión en Células de Mamífero

Los receptores de la presente invención se expresan en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) o células de CHO dhfr adherentes. Para maximizar la expresión del receptor, típicamente, todas las regiones no traducidas (UTRs) 5' y 3' se retiran del cDNA del receptor antes de la inserción en un vector de pCDN o pCDNA3. Las células se transfectan con cDNAs de receptor individuales mediante lipofectina y se seleccionan en presencia de 400 mg/ml de G418. Después de 3 semanas de selección, los clones individuales se recogen y se expanden para el análisis adicional. Las células HEK392 o CHO transfectadas con el vector solo sirven como controles negativos. Para aislar líneas celulares que expresan establemente los receptores individuales, aproximadamente 24 clones se seleccionan y analizan típicamente mediante análisis de transferencia Northern. Los mRNAs del receptor son detectables generalmente en aproximadamente 50% de los clones resistentes a G418 analizados.

Ejemplo 2

Banco de ligandos para ensayos de unión y funcionales

Un banco de más de 600 ligandos de receptor putativos se ha montado para el rastreo. El banco comprende: transmisores, hormonas y quimioquinas que se sabe que actúan a través de un receptor de transmembrana siete (7TM) humano; compuestos presentes en la naturaleza que pueden ser agonistas putativos para un receptor 7TM humano, péptidos biológicamente activos que no son de mamífero para los que todavía no se ha identificado un homólogo de mamífero; y compuestos no encontrados en la naturaleza, pero que activan receptores 7TM con ligandos naturales desconocidos. Este banco se usa para rastrear inicialmente el receptor con respecto a ligandos conocidos, usando ensayos tanto bifuncionales (es decir, calcio, cAMP, microfisiómetro, electrofisiología de oocitos, etc., véase posteriormente) como de unión.

Ejemplo 3

Ensayos de Unión a Ligandos

Los ensayos de unión a ligandos proporcionan un método directo para determinar la farmacología del receptor y son adaptables a un formato de alto rendimiento. El ligando purificado para un receptor se radioetiqueta hasta una alta actividad específica (50-2000 Ci/mmol) para estudios de unión. Se realiza a continuación una determinación de que el procedimiento de radioetiquetaje no disminuya la actividad del ligando hacia su receptor. Condiciones de ensayo para tampones, iones, pH y otros moduladores tales como nucleótidos se optimizan para establecer una relación de señal a ruido práctica para fuentes de receptores tanto de membrana como de célula entera. Para estos ensayos, la unión al receptor específica se define como radiactividad asociada total menos la radiactividad medida en presencia de un exceso de ligando competitivo no etiquetado. Cuando es posible, se usa más de un ligando competitivo para definir la unión no específica residual.

ES 2 265 443 T3

Ejemplo 4

Ensayo Funcional en Xenopus Oocytes

5 Transcritos de RNA protegidos procedentes de plantillas plasmídicas linealizadas que codifican los cDNAs de receptor de la invención se sintetizan *in vitro* con RNA polimerasa de acuerdo con procedimientos estándar. Los transcritos *in vitro* se suspenden en agua a una concentración final de 0,2 mg/ml. Los lóbulos ováricos se retiran de sapos hembra adultos, se obtienen oocitos desfoliculados en Fase V y los transcritos de RNA (10 ng/oocito) se inyectan en un bolo de 50 nl usando un aparato de microinyección. Pinzas de voltaje de dos electrodos se usan para medir las corrientes a partir de *Xenopus oocytes* individuales en respuesta a la exposición a agonista. Los registros se realizan en medio de Barth libre de Ca^{2+} a temperatura ambiente. El sistema de *Xenopus* puede usarse para rastrear ligandos conocidos y extractos tisulares/celulares para activar ligandos.

Ejemplo 5

15 *Ensayos Microfisiométricos*

La activación de una amplia variedad de sistemas de mensajero secundario da como resultado la expulsión de pequeñas cantidades de ácido de una célula. El ácido formado es principalmente un resultado de la actividad metabólica incrementada requerida para avivar el proceso de señalización intracelular. Los cambios de pH en el medio que rodea la célula son muy pequeños pero son detectables mediante el microfisiómetro CYTOSENSOR (Molecular Devices Ltd., Menlo Park, CA). El CYTOSENSOR es así capaz de detectar la activación de un receptor que está acoplado a una ruta de señalización intracelular que utiliza energía tal como el receptor acoplado a proteína G de la presente invención.

25 *Ejemplo 6*

Rastreo de Extractos/Sobrenadantes Celulares

30 Existe un gran número de receptores de mamífero para los que sigue sin haber, todavía, un ligando activante cognado (agonista). Así, los ligandos activos para estos receptores pueden no estar incluidos dentro de los bancos de ligandos que están identificados hasta la fecha. De acuerdo con esto, el receptor 7TM de la invención también es rastreado funcionalmente (usando rastreos funcionales con calcio, cAMP, microfisiómetro, electrofisiología de oocitos, etc.) frente a extractos tisulares para identificar ligandos naturales. Extractos que producen respuestas funcionales positivas pueden subfraccionarse secuencialmente hasta que un ligando activante se identifica aislado.

Ejemplo 7

Ensayos Funcionales con Calcio y cAMP

40 Se ha mostrado que receptores 7TM que se expresan en células HEK 293 se acoplan funcionalmente para la activación de PLC y la movilización de calcio y/o la estimulación o inhibición de cAMP. Se observó que los niveles de calcio basales en las células HEK 293 en células transfectadas con receptor o de control vectoriales estaban en el intervalo normal, de 100 nM a 200 nM. Células HEK 293 que expresan receptores recombinantes se cargan con fura 2 y en un solo día > 150 ligandos seleccionados o extractos tisulares/celulares se evalúan con respecto a la movilización de calcio inducida por agonista. De forma similar, células HEK 293 que expresan receptores recombinantes se evalúan con respecto a la estimulación o inhibición de la producción de cAMP usando ensayos de cuantificación de cAMP estándar. Agonistas que presentan un tránsito de calcio o una fluctuación de cAMP se prueban en células de control vectoriales para determinar si la respuesta es única a las células transfectadas que expresan receptor.

50 *Ejemplo 8*

Amplificación por PCR de MFQ-111

55 Amplificación por PCR de homólogo de "tulipán" humano: Para confirmar la secuencia de MFQ-111, un par de cebadores de PCR específicos (véanse los N° ID SEC: 3 y 4) se diseñaron basándose en la secuencia putativa:

MFQ-111 superior: 5'-3' Cebador01 (N° ID SEC: 3)

60 MFQ-111 inferior: 5'-3' Cebador02 (N° ID SEC: 4)

3'

65 El fragmento de 523 pb esperado se amplificó a partir de una muestra de cDNA de cerebro humano (Clontech Ref: 7187-1; muestra de cerebro entero del grupo de MTC humano I de Clontech, Ref: K1420-1) y la secuencia se confirmó después de clonar la banda de PCR de tamaño correcto en un vector pCRII de Invitrogen.

ES 2 265 443 T3

Figura 1

Amplificación por PCR de la banda de MFQ-111 específica

5 Carriles:

- 1- control de G3PDH
- 2- Amplificación de homólogo de “tulipán” de cDNA de cerebro humano (7187-1)
- 10 3- Amplificación de homólogo de “tulipán” de cDNA cerebral (del grupo de MTC)
- 4- Control negativo
- 15 5- Control negativo
- 6- escalera de 100 pb

20 Las condiciones de PCR eran: 9 min a 95°C; 30 s a 95°C, 50 s a 54°C, 60 s a 72°C durante 34 ciclos y una etapa de elongación final a 72°C durante 5 min usando la polimerasa Taq Gold de Perkin Elmer.

Figura 2

Distribución en los tejidos

25

Con los cebadores diseñados de MFQ-111 mencionados anteriormente y las mismas condiciones de PCR, una banda de PCR específica de 523 pb se amplifica usando un grupo de cDNA humano (grupo de MTC humano I de Clontech, Ref K1420-1 y grupo de MTC humano II de Clontech, Ref K1421-1).

30

Se usan cebadores específicos para el gen “doméstico” (“house keeping”) G3PDH (G3PDH aguas arriba: 5’-3’ Cebador03 (Nº ID SEC: 5) y G3PDH aguas abajo 5’-3’ Cebador04 (Nº ID SEC: 6) y un control.

Carriles:

35

- 1- escalera de 100 pb
- 2- corazón
- 40 3- cerebro (entero)
- 4- placenta
- 5- pulmón
- 45 6- hígado
- 7- músculo esquelético
- 8- riñón
- 50 9- páncreas
- 10- bazo
- 55 11- timo
- 12- próstata
- 13- testículo
- 60 14- ovario
- 15- intestino delgado
- 65 16- colon
- 17- leucocito de sangre periférica

ES 2 265 443 T3

18- escalera de 1 kb

19- MFQ-111 de amplificación de control positivo procedente de cDNA de cerebro humano

5 20- amplificación de control positivo de G3PDH.

MFQ-111 no se expresa en el intestino delgado y el colon normal. El nivel de expresión es muy débil en el bazo y en leucocito de sangre periférica.

10 Figura 3

Expresión en Tumores Humanos

15 La misma estrategia de PCR se usa para determinar el nivel de expresión del gen de interés en varios tejidos tumorales humanos normalizados usando el grupo de cDNA de tejido múltiple tumoral humano de Clontech (Ref K1422-1).

Carriles:

20 1- escalera de 100 pb

2- carcinoma de mama humano

25 3- carcinoma pulmonar humano

4- adenocarcinoma de colon humano

5- carcinoma pulmonar humano

30 6- adenocarcinoma prostático humano

7- adenocarcinoma de colon humano

35 8- carcinoma ovárico humano

9- adenocarcinoma pancreático humano

10- escalera de 1kb

40 11- MFQ-111 de amplificación de control positivo procedente de cDNA de cerebro humano

12- amplificación de control positivo de G3PDH.

45 13- cebadores de control negativo MFQ-111

14- cebadores de control negativo G3PDH

15- escalera de 100 pb

50 MFQ-111 no tiene una expresión alta en tumores. No se expresa en varios carcinomas pulmonares y en adenocarcinoma prostático.

55

60

65

ES 2 265 443 T3

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado seleccionado de uno de los grupos que consisten en:

- 5
- (a) un polipéptido aislado codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia del N° ID SEC: 1;
 - (b) un polipéptido aislado que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 95% de identidad con toda la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
 - 10 (c) un polipéptido aislado que tiene al menos 95% de identidad con toda la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2; y

la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2.

15 2. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2.

3. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que es la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2.

20 4. Un polinucleótido aislado seleccionado de uno de los grupos que consisten en:

- (a) un polinucleótido aislado que consiste en una secuencia que tiene al menos 95% de identidad, a lo largo de toda la longitud, con el polinucleótido del N° ID SEC: 1;
- 25 (b) un polinucleótido aislado que tiene una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica que tiene al menos 95% de identidad, a lo largo de toda la longitud, con la secuencia polipeptídica del N° ID SEC: 2;
- 30 (c) un polinucleótido aislado que es el equivalente de RNA de un polinucleótido de (a) a (b);

o una secuencia polinucleotídica complementaria con dicho polinucleótido aislado.

35 5. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión que codifica el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

Figura 1

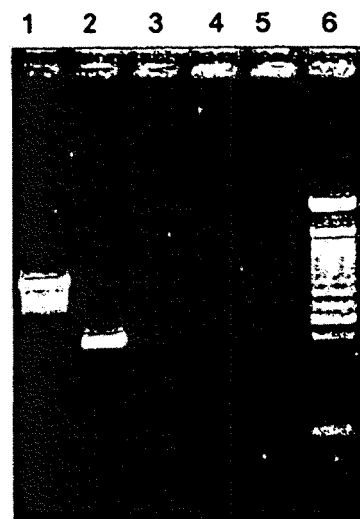


Figura 2

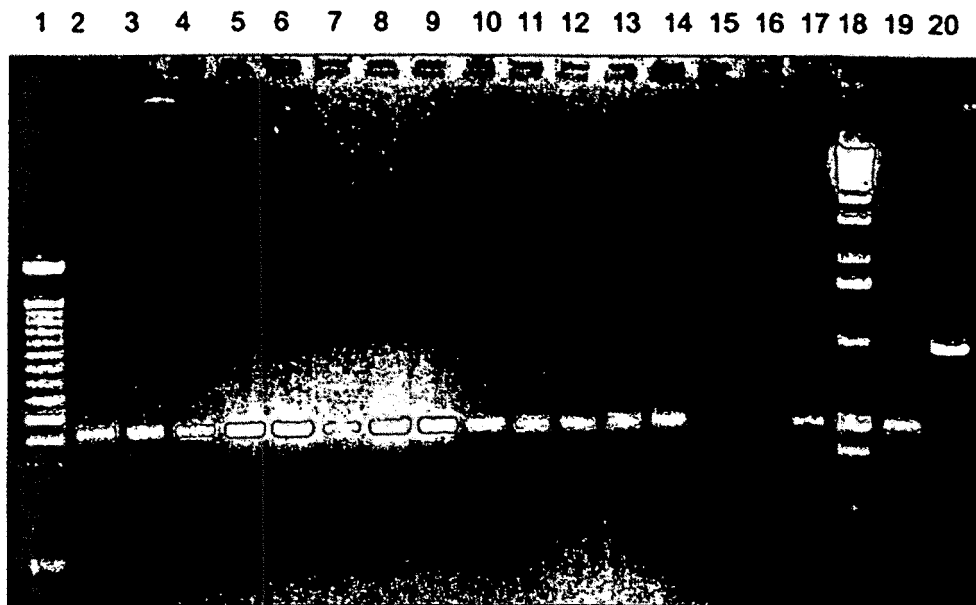
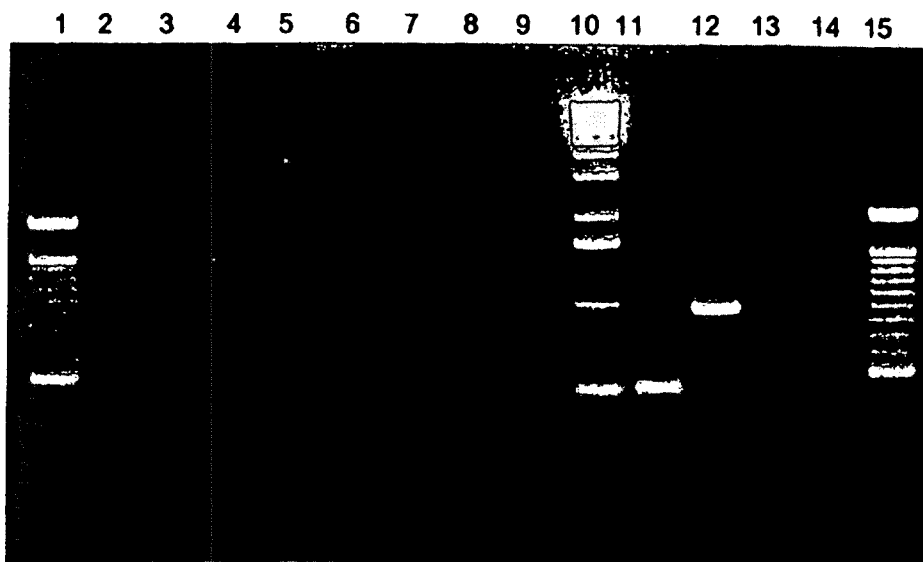


Figura 3



ES 2 265 443 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Merck Patent GmbH
 <120> Nueva pequeña GTPasa
 5 <130> MFQ-111ERws
 <140>
 <141>
 10 <160> 6
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 2586
 15 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(2586)
 <400> 1

25 atg cat tgt gga tta ctt cat att gac cag gac att gtc aat aca atc 48
 Met His Cys Gly Leu Leu His Ile Asp Gln Asp Ile Val Asn Thr Ile
 1 5 10 15

30 atc aaa cac tgc tca cct caa ttt ttt tca ctt ggt ttg cct ggt gcc 96
 Ile Lys His Cys Ser Pro Gln Phe Phe Ser Leu Gly Leu Pro Gly Ala
 20 25 30

35 aca atg ctt att atg gat ttt att gta gca gct ggt aga gtg gct tct 144
 Thr Met Leu Ile Met Asp Phe Ile Val Ala Ala Gly Arg Val Ala Ser
 35 40 45

40 tca gct ttt ctc aat gca cca aga gtg gaa gca caa gtt ctt ctg gga 192
 Ser Ala Phe Leu Asn Ala Pro Arg Val Glu Ala Gln Val Leu Leu Gly
 50 55 60

45 tct ttg gtt tgc ttt ccc aac tta tat tgt gaa ctg cct tct ctt cat 240
 Ser Leu Val Cys Phe Pro Asn Leu Tyr Cys Glu Leu Pro Ser Leu His
 65 70 75 80

50 ccc aac att cct gat gtt gct gtg tct cag ttt aca gat gtt aag gaa 288
 Pro Asn Ile Pro Asp Val Ala Val Ser Gln Phe Thr Asp Val Lys Glu
 85 90 95

55 ctt ata atc aaa act gta tta agc tcg gca aga gat gag ccc tct ggt 336
 Leu Ile Ile Lys Thr Val Leu Ser Ser Ala Arg Asp Glu Pro Ser Gly
 100 105 110

60 cct gca cga tgt gta gca ctt tgt agt tta ggt att tgg att tgt gaa 384
 Pro Ala Arg Cys Val Ala Leu Cys Ser Leu Gly Ile Trp Ile Cys Glu
 115 120 125

65 gaa cta gtc cat gag tct cat cat cct caa att aag gaa gct ctg aat 432
 Glu Leu Val His Glu Ser His His Pro Gln Ile Lys Glu Ala Leu Asn
 130 135 140

ES 2 265 443 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gtg att tgt gtt tcc tta aag ttt act aat aaa aca gta gcc cac gta 480
 Val Ile Cys Val Ser Leu Lys Phe Thr Asn Lys Thr Val Ala His Val
 145 150 155 160

gct tgt aac atg ctt cac atg ctg gtt cat tat gta cct aga ctt cag 528
 Ala Cys Asn Met Leu His Met Leu Val His Tyr Val Pro Arg Leu Gln
 165 170 175

att tac cag cct gat tct ccc ttg aaa att att cag atc cta ata gct 576
 Ile Tyr Gln Pro Asp Ser Pro Leu Lys Ile Ile Gln Ile Leu Ile Ala
 180 185 190

acc atc acc cat ctt tta cca agt aca gag gct tca tct tat gaa atg 624
 Thr Ile Thr His Leu Leu Pro Ser Thr Glu Ala Ser Ser Tyr Glu Met
 195 200 205

gac aag agg ttg gta gta tct tta ctt ctc tgc ctt ctg gac tgg atc 672
 Asp Lys Arg Leu Val Val Ser Leu Leu Leu Cys Leu Leu Asp Trp Ile
 210 215 220

atg gcc tta cct cta aag aca ctg ctc caa cca ttt cat gct acg gga 720
 Met Ala Leu Pro Leu Lys Thr Leu Leu Gln Pro Phe His Ala Thr Gly
 225 230 235 240

gca gaa agc gat aaa aca gaa aaa tct gtt ctc aat tgc att tat aag 768
 Ala Glu Ser Asp Lys Thr Glu Lys Ser Val Leu Asn Cys Ile Tyr Lys
 245 250 255

gtt tta cat ggg tgt gtt tat gga gct cag tgt ttt agc aat cca agg 816
 Val Leu His Gly Cys Val Tyr Gly Ala Gln Cys Phe Ser Asn Pro Arg
 260 265 270

tat ttt ccc atg agc ctc tct gat ttg gca tct gta gat tat gat cct 864
 Tyr Phe Pro Met Ser Leu Ser Asp Leu Ala Ser Val Asp Tyr Asp Pro
 275 280 285

ttt atg cat ttg gaa agt ctg aaa gag cct gag cct ctg cac tct cct 912
 Phe Met His Leu Glu Ser Leu Lys Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Pro
 290 295 300

gac tca gaa cga tct tct aaa ctc cag cca gta aca gaa gtg aaa act 960
 Asp Ser Glu Arg Ser Ser Lys Leu Gln Pro Val Thr Glu Val Lys Thr
 305 310 315 320

caa atg cag cat gga tta atc tct ata gca gcc cgc act gtt att aca 1008
 Gln Met Gln His Gly Leu Ile Ser Ile Ala Ala Arg Thr Val Ile Thr
 325 330 335

cat ctg gta aat cac ctg ggc cat tat cca atg agc ggt ggt cct gct 1056
 His Leu Val Asn His Leu Gly His Tyr Pro Met Ser Gly Gly Pro Ala
 340 345 350

atg cta aca agt cag gtg tgt gaa aat cac gac aat cat tac agt gaa 1104
 Met Leu Thr Ser Gln Val Cys Glu Asn His Asp Asn His Tyr Ser Glu
 355 360 365

agt act gaa ctt tct cct gaa ctc ttt gag agt cca aat atc cag ttc 1152
 Ser Thr Glu Leu Ser Pro Glu Leu Phe Glu Ser Pro Asn Ile Gln Phe
 370 375 380

ttt gtg tta aat aat aca acc tta gtg tcc tgt atc cag atc aga tca 1200

ES 2 265 443 T3

	Phe Val Leu Asn Asn Thr Thr Leu Val Ser Cys Ile Gln Ile Arg Ser	
	385	390 395 400
5	gaa gag aat atg cct gga gga ggt tta tct gct ggc ctt gca tca gcc	1248
	Glu Glu Asn Met Pro Gly Gly Gly Leu Ser Ala Gly Leu Ala Ser Ala	
		405 410 415
10	aat tca aat gtc aga atc ata gta cgt gat ctc tct gga aaa tat tca	1296
	Asn Ser Asn Val Arg Ile Ile Val Arg Asp Leu Ser Gly Lys Tyr Ser	
		420 425 430
15	tgg gat tct gct ata ctg tat ggc cca cct cct gta agt ggc ttg tca	1344
	Trp Asp Ser Ala Ile Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Val Ser Gly Leu Ser	
		435 440 445
20	gaa cct aca tct ttc atg ctt tca ttg tct cac caa gag aag cca gaa	1392
	Glu Pro Thr Ser Phe Met Leu Ser Leu Ser His Gln Glu Lys Pro Glu	
		450 455 460
25	gag cct ccg aca tct aat gaa tgc tta gaa gat ata acc gta aaa gat	1440
	Glu Pro Pro Thr Ser Asn Glu Cys Leu Glu Asp Ile Thr Val Lys Asp	
		465 470 475 480
30	gga ctt tct ctc cag ttt aaa aga ttt aga gaa act gta cca act tgg	1488
	Gly Leu Ser Leu Gln Phe Lys Arg Phe Arg Glu Thr Val Pro Thr Trp	
		485 490 495
35	gat aca ata aga gat gaa gaa gat gtt ctt gat gag ctc ttg cag tat	1536
	Asp Thr Ile Arg Asp Glu Glu Asp Val Leu Asp Glu Leu Leu Gln Tyr	
		500 505 510
40	ttg ggt gtt act agt cct gaa tgc tta cag aga act gga atc tca ctt	1584
	Leu Gly Val Thr Ser Pro Glu Cys Leu Gln Arg Thr Gly Ile Ser Leu	
		515 520 525
45	aat att cct gct cca caa cct gtg tgc att tct gaa aaa caa gaa aat	1632
	Asn Ile Pro Ala Pro Gln Pro Val Cys Ile Ser Glu Lys Gln Glu Asn	
		530 535 540
50	gat gtt att aat gct atc ctt aag caa cat aca gaa gaa aaa gaa ttt	1680
	Asp Val Ile Asn Ala Ile Leu Lys Gln His Thr Glu Glu Lys Glu Phe	
		545 550 555 560
55	gtt gag aag cac ttt aat gac tta aac atg aaa gct gtg gaa caa gat	1728
	Val Glu Lys His Phe Asn Asp Leu Asn Met Lys Ala Val Glu Gln Asp	
		565 570 575
60	gaa cca ata cct caa aaa cct cag tca gca ttt tat tat tgc aga ttg	1776
	Glu Pro Ile Pro Gln Lys Pro Gln Ser Ala Phe Tyr Tyr Cys Arg Leu	
		580 585 590
65	ctt ctt agt ata ttg gga atg aat tcc tgg gac aaa cgg agg agc ttt	1824
	Leu Leu Ser Ile Leu Gly Met Asn Ser Trp Asp Lys Arg Arg Ser Phe	
		595 600 605
70	cat ctc ctg aag aaa aat gaa aag cta ctt aga gaa ctt agg aac ttg	1872
	His Leu Leu Lys Lys Asn Glu Lys Leu Leu Arg Glu Leu Arg Asn Leu	
		610 615 620
75	gat tca agg cag tgc cga gag aca cac aag att gca gta ttt tat gtt	1920
	Asp Ser Arg Gln Cys Arg Glu Thr His Lys Ile Ala Val Phe Tyr Val	

ES 2 265 443 T3

	625		630		635		640	
5	gct gaa gga caa gaa gac aaa cac tcc att ctc acc aat aca gga gga							1968
	Ala Glu Gly Gln Glu Asp Lys His Ser Ile Leu Thr Asn Thr Gly Gly							
			645		650		655	
10	agt caa gca tat gaa gat ttt gta gct ggt ctt ggt tgg gag gta aat							2016
	Ser Gln Ala Tyr Glu Asp Phe Val Ala Gly Leu Gly Trp Glu Val Asn							
			660		665		670	
15	ctt aca aac cat tgt ggt ttt atg gga gga cta caa aaa aac aaa agc							2064
	Leu Thr Asn His Cys Gly Phe Met Gly Gly Leu Gln Lys Asn Lys Ser							
			675		680		685	
20	act gga ttg acc act cca tat ttt gct acc tct aca gta gaa gta ata							2112
	Thr Gly Leu Thr Thr Pro Tyr Phe Ala Thr Ser Thr Val Glu Val Ile							
			690		695		700	
25	ttt cac atg tca aca aga atg cct tct gat tct gat gat tct ttg acc							2160
	Phe His Met Ser Thr Arg Met Pro Ser Asp Ser Asp Asp Ser Leu Thr							
			705		710		715	720
30	aaa aaa ttg aga cat ttg gga aat gat gaa gtg cac att gtt tgg tca							2208
	Lys Lys Leu Arg His Leu Gly Asn Asp Glu Val His Ile Val Trp Ser							
			725		730		735	
35	gag cat act aga gac tac agg aga gga att att ccc aca gaa ttt ggt							2256
	Glu His Thr Arg Asp Tyr Arg Arg Gly Ile Ile Pro Thr Glu Phe Gly							
			740		745		750	
40	gat gtc ctt att gta ata tat cca atg aaa aat cac atg ttc agt att							2304
	Asp Val Leu Ile Val Ile Tyr Pro Met Lys Asn His Met Phe Ser Ile							
			755		760		765	
45	cag ata atg aga aaa cca gag gtt ccc ttc ttt ggt ccc ctt ttt gat							2352
	Gln Ile Met Arg Lys Pro Glu Val Pro Phe Phe Gly Pro Leu Phe Asp							
			770		775		780	
50	ggt gct att gtg aat gga aag gtt cta ccc att atg gtt aga gca aca							2400
	Gly Ala Ile Val Asn Gly Lys Val Leu Pro Ile Met Val Arg Ala Thr							
			785		790		795	800
55	gct ata aat gca agc cgt gct ctg aaa tct ctg att cca ttg tat caa							2448
	Ala Ile Asn Ala Ser Arg Ala Leu Lys Ser Leu Ile Pro Leu Tyr Gln							
			805		810		815	
60	aac ttc tat gag gag aga gca cga tac ctg caa aca att gtc cag cac							2496
	Asn Phe Tyr Glu Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Gln Thr Ile Val Gln His							
			820		825		830	
65	cac tta gaa cca aca aca ttt gaa gat ttt gca gca cag gtt ttt tct							2544
	His Leu Glu Pro Thr Thr Phe Glu Asp Phe Ala Ala Gln Val Phe Ser							
			835		840		845	
70	cca gct ccc tac cac cat tta cca tct ggt gcc gat cat taa							2586
	Pro Ala Pro Tyr His His Leu Pro Ser Gly Ala Asp His							
			850		855		860	

<211> 861

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 265 443 T3

<400> 2

5 Met His Cys Gly Leu Leu His Ile Asp Gln Asp Ile Val Asn Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Lys His Cys Ser Pro Gln Phe Phe Ser Leu Gly Leu Pro Gly Ala
 20 25 30
 10 Thr Met Leu Ile Met Asp Phe Ile Val Ala Ala Gly Arg Val Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ala Phe Leu Asn Ala Pro Arg Val Glu Ala Gln Val Leu Leu Gly
 50 55 60
 Ser Leu Val Cys Phe Pro Asn Leu Tyr Cys Glu Leu Pro Ser Leu His
 65 70 75 80
 15 Pro Asn Ile Pro Asp Val Ala Val Ser Gln Phe Thr Asp Val Lys Glu
 85 90 95
 Leu Ile Ile Lys Thr Val Leu Ser Ser Ala Arg Asp Glu Pro Ser Gly
 100 105 110
 20 Pro Ala Arg Cys Val Ala Leu Cys Ser Leu Gly Ile Trp Ile Cys Glu
 115 120 125
 Glu Leu Val His Glu Ser His His Pro Gln Ile Lys Glu Ala Leu Asn
 130 135 140
 25 Val Ile Cys Val Ser Leu Lys Phe Thr Asn Lys Thr Val Ala His Val
 145 150 155 160
 Ala Cys Asn Met Leu His Met Leu Val His Tyr Val Pro Arg Leu Gln
 165 170 175
 30 Ile Tyr Gln Pro Asp Ser Pro Leu Lys Ile Ile Gln Ile Leu Ile Ala
 180 185 190
 Thr Ile Thr His Leu Leu Pro Ser Thr Glu Ala Ser Ser Tyr Glu Met
 195 200 205
 Asp Lys Arg Leu Val Val Ser Leu Leu Leu Cys Leu Leu Asp Trp Ile
 210 215 220
 35 Met Ala Leu Pro Leu Lys Thr Leu Leu Gln Pro Phe His Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Ser Asp Lys Thr Glu Lys Ser Val Leu Asn Cys Ile Tyr Lys
 245 250 255
 40 Val Leu His Gly Cys Val Tyr Gly Ala Gln Cys Phe Ser Asn Pro Arg
 260 265 270
 Tyr Phe Pro Met Ser Leu Ser Asp Leu Ala Ser Val Asp Tyr Asp Pro
 275 280 285
 45 Phe Met His Leu Glu Ser Leu Lys Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Pro
 290 295 300
 Asp Ser Glu Arg Ser Ser Lys Leu Gln Pro Val Thr Glu Val Lys Thr
 305 310 315 320
 Gln Met Gln His Gly Leu Ile Ser Ile Ala Ala Arg Thr Val Ile Thr
 325 330 335
 50 His Leu Val Asn His Leu Gly His Tyr Pro Met Ser Gly Gly Pro Ala
 340 345 350
 Met Leu Thr Ser Gln Val Cys Glu Asn His Asp Asn His Tyr Ser Glu
 355 360 365
 55 Ser Thr Glu Leu Ser Pro Glu Leu Phe Glu Ser Pro Asn Ile Gln Phe
 370 375 380
 Phe Val Leu Asn Asn Thr Thr Leu Val Ser Cys Ile Gln Ile Arg Ser
 385 390 395 400
 60 Glu Glu Asn Met Pro Gly Gly Gly Leu Ser Ala Gly Leu Ala Ser Ala
 405 410 415
 Asn Ser Asn Val Arg Ile Ile Val Arg Asp Leu Ser Gly Lys Tyr Ser
 420 425 430
 65 Trp Asp Ser Ala Ile Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Val Ser Gly Leu Ser
 435 440 445
 Glu Pro Thr Ser Phe Met Leu Ser Leu Ser His Gln Glu Lys Pro Glu

ES 2 265 443 T3

	450					455						460					
	Glu	Pro	Pro	Thr	Ser	Asn	Glu	Cys	Leu	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Lys	Asp	
	465					470					475					480	
5	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Lys	Arg	Phe	Arg	Glu	Thr	Val	Pro	Thr	Trp	
					485					490						495	
	Asp	Thr	Ile	Arg	Asp	Glu	Glu	Asp	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Tyr	
				500					505						510		
10	Leu	Gly	Val	Thr	Ser	Pro	Glu	Cys	Leu	Gln	Arg	Thr	Gly	Ile	Ser	Leu	
			515					520					525				
	Asn	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Cys	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Glu	Asn	
	530						535					540					
15	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Lys	Gln	His	Thr	Glu	Glu	Lys	Glu	Phe	
	545					550						555				560	
	Val	Glu	Lys	His	Phe	Asn	Asp	Leu	Asn	Met	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Asp	
					565					570						575	
20	Glu	Pro	Ile	Pro	Gln	Lys	Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Cys	Arg	Leu	
				580					585					590			
	Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Met	Asn	Ser	Trp	Asp	Lys	Arg	Arg	Ser	Phe	
			595					600					605				
	His	Leu	Leu	Lys	Lys	Asn	Glu	Lys	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	
	610						615					620					
25	Asp	Ser	Arg	Gln	Cys	Arg	Glu	Thr	His	Lys	Ile	Ala	Val	Phe	Tyr	Val	
	625					630						635				640	
	Ala	Glu	Gly	Gln	Glu	Asp	Lys	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Gly	
				645						650					655		
30	Ser	Gln	Ala	Tyr	Glu	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Leu	Gly	Trp	Glu	Val	Asn	
				660					665						670		
	Leu	Thr	Asn	His	Cys	Gly	Phe	Met	Gly	Gly	Leu	Gln	Lys	Asn	Lys	Ser	
			675					680						685			
35	Thr	Gly	Leu	Thr	Thr	Pro	Tyr	Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Val	Glu	Val	Ile	
	690						695						700				
	Phe	His	Met	Ser	Thr	Arg	Met	Pro	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	
	705					710					715					720	
40	Lys	Lys	Leu	Arg	His	Leu	Gly	Asn	Asp	Glu	Val	His	Ile	Val	Trp	Ser	
				725						730					735		
	Glu	His	Thr	Arg	Asp	Tyr	Arg	Arg	Gly	Ile	Ile	Pro	Thr	Glu	Phe	Gly	
				740					745					750			
	Asp	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Tyr	Pro	Met	Lys	Asn	His	Met	Phe	Ser	Ile	
			755					760					765				
45	Gln	Ile	Met	Arg	Lys	Pro	Glu	Val	Pro	Phe	Phe	Gly	Pro	Leu	Phe	Asp	
	770						775					780					
	Gly	Ala	Ile	Val	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Ile	Met	Val	Arg	Ala	Thr	
	785					790					795					800	
50	Ala	Ile	Asn	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Pro	Leu	Tyr	Gln	
				805						810					815		
	Asn	Phe	Tyr	Glu	Glu	Arg	Ala	Arg	Tyr	Leu	Gln	Thr	Ile	Val	Gln	His	
				820					825						830		
55	His	Leu	Glu	Pro	Thr	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Ala	Ala	Gln	Val	Phe	Ser	
			835					840					845				
	Pro	Ala	Pro	Tyr	His	His	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Asp	His				
			850				855					860					

60 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador01

ES 2 265 443 T3

	<400> 3	
	tacgggagca gaaagcgata aaa	23
5	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador02	
	<400> 4	
15	gcccagcaga taaacctcct ccag	24
	<210> 5	
20	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador03	
	<400> 5	
30	tgaagtcgg agtcaacgga ttggt	25
	<210> 6	
	<211> 24	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador04	
	<400> 6	
	catgtgggcc atgaggtcca ccac	24
45		
50		
55		
60		
65		