



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 055**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04765286 .2**

96 Fecha de presentación : **16.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1670906**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

54 Título: **Proteína MGAT-X1 de tipo acilglicerol aciltransferasa y sus usos.**

30 Prioridad: **26.09.2003 EP 03021637**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Bayer HealthCare AG.**
51368 Leverkusen, DE

72 Inventor/es: **Golz, Stefan;**
Brüggemeier, Ulf;
Weingärtner, Bernhard y
Geerts, Andreas

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 313 055 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

Proteína MGAT-X1 de tipo acilglicerol aciltransferasa y sus usos.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención es en el campo de la biología molecular; más particularmente, la presente invención describe una secuencia de ácidos nucleicos y una secuencia de aminoácidos para una MGAT-X1 novedosa humana y su regulación para propósitos terapéuticos.

10 **Antecedentes de la invención**

La Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT; EC 2.3.1.20) es una enzima microsómica que juega un papel central en el metabolismo de los lípidos diacilglicerol celulares. Cataliza la etapa terminal y solamente ncargada en la síntesis detricilglicerol mediante el uso de diacilglicerol (DAG) y acil CoA grasa como sustratos. La MGAT usa mono-acilglicerol (MAG) acil CoA grasa como sustratos. DGAT se ha considerado necesaria para la formación de tejido adiposo y esencial para la supervivencia [Cases *et al.* (1998)].

Oelkers *et al.* [Oelkers *et al.* (1998)] identificaron 2 ADNc humanos parciales novedosos y distintos mediante el uso de la secuencia de la acil-CoA: colesterol aciltransferasa-1 (ACAT1) para seleccionar las bases de datos de EST: Aislaron dos “productos génicos relacionados con ACAT” a partir de una genoteca de ADNc de hepatocitos que denominaron ARGP1 y ARGP2. ARGP1 se encontró que se expresaba en numerosos tejidos de adultos humanos y líneas celulares de cultivos de tejidos, mientras que la expresión de ARGP2 era más restringida. El ADNc de ARGP1 codifica una proteína de 488 aminoácidos con 9 dominios de transmembrana predichos, un sitio de glicosilación potencial unido a N, y un motivo de fosforilación de tirosina putativo. La comparación con ACAT1 reveló un 22% de identidad de aminoácidos sobre la molécula entera. El análisis de transferencia de Northern de ARGP1 indicó la expresión ubicua con una gran variabilidad a nivel de expresión. Había una alta expresión en la corteza adrenal, médula adrenal, testículos, e intestino delgado, con una moderada expresión en tiroides, corazón, músculo esquelético, e hígado. Una transcripción de 2,0 kb era invariable en todos los tejidos examinados, mientras que se observó una transcripción de 2,4 kb en aproximadamente la mitad de los tejidos.

Más tarde, Cheng *et al.* [Cheng *et al.* (2001)] clonaron DGAT1 a partir de una genoteca de ADNc de tejido adiposo e identificaron una variante de ajuste, que se denominó DGATsv. Esta DGATsv contiene una inserción de 77 nucleótidos de intrón no empalmada con un codón de parada en fase. Es una forma truncada de DGAT1 que termina en Arg387. Por lo tanto 101 restos del extremo C están suprimidos, incluyendo el sitio activo putativo. Por filtración de gel, coimmunoprecipitación, y SDS-PAGE de proteínas recombinantes reticuladas, los autores determinaron que tanto DGAT1 como DGATsv forman dímeros y tetrameros. Cuando se coexpresan, las 2 variantes forman heterocomplejos.

Smith y colaboradores [Smith *et al.*, (2000)] demostraron que los ratones deficientes en DGAT que se generaron mediante rapture dirigida eran viables y todavía sintetizaban triglicéridos. Además encontraron que estos ratones eran delgados y resistentes a la obesidad inducida por dieta. La resistencia a obesidad implicaba un incremento del gasto de energía e incremento de actividad. La deficiencia en DGATt también alteraba el metabolismo de triglicéridos en otros tejidos. Esto incluye la glándula mamaria, donde la lactancia era defectuosa en hembras DGAT *-/-*. Smith *et al.* [Smith *et al.*, (2000)] concluyeron que existen múltiples mecanismos para la síntesis de triglicéridos y sugirieron que la inhibición selectiva de la síntesis de triglicéridos mediada por DGAT puede ser útil para tratar la obesidad.

Buhman *et al.* [Buhman *et al.*, (2002)] analizaron el modelo de ratón deficiente en DGAT1 y encontraron que DGAT1 no era esencial para la absorción de triacilglicerol de la dieta cuantitativa, incluso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, o para la síntesis de quilomicrones. Sin embargo, los ratones sin DGAT1 tenían una reducción de quilomicronemia después de la absorción 1 hora después de una alta exposición a grasa. Cuando se alimentan de manera crónica con una dieta alta en grasa, acumulan gotitas de lípidos neutros en el citoplasma de los enterocitos, sugiriendo una reducción en la absorción de triacilglicerol. El análisis de intestino de ratones sin DGAT1 reveló que la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de triacilglicerol, DGAT2 y diacilglicerol transacilasa, pueden ayudar a compensar la ausencia de DGAT1.

Usando el planteamiento de candidato posicional, Grisart *et al.* [Grisart *et al.* (2002)] mapearon un locus del carácter cuantitativo con un efecto principal en la composición de la leche en el ganado lechero al extremo centromérico del cromosoma 14 de bovinos, donde mapea el gen de DGAT1. Identificaron una Lys232 no conservadora a la sustitución de Ala en el gen de DGAT1 que tenía un efecto principal en la producción y características de la leche, incluyendo el contenido en grasa.

El documento WO03/053363 describe varias secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos como “miembros de la familia de la diacilglicerol aciltransferasa 2”, y los datos de expresión de un número limitado de tejidos de ratones. Una de estas secuencias (m112023, SEQ ID NO: 13 - 14) es casi idéntica a la de MGAT- X1 (SEQ ID NO: 1 - 2) de la presente solicitud.

Sumario de la invención

Se desvela una nueva secuencia de nucleótidos que codifica una MGAT-X1 humana novedosa. En lo siguiente MGAT-X1 designa un polipéptido que tiene la secuencia de o que es homóloga a la SEQ ID No:2, y que tiene actividad MGAT-X1 acilglicerol aciltransferasa. MGAT-X1 además contempla diversos polipéptidos que surgen de modificaciones después de la transcripción del polipéptido incluyendo pero sin limitación a acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Se desvelan moléculas de ácido nucleico que codifican MGAT-X1 y polipéptidos que tienen actividad de la MGAT-X1, y a su uso en la diagnosis o tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión de la MGAT-X1.

Un objeto de la invención es proporcionar reactivos y procedimientos para regular la expresión y actividad de la MGAT-X1 para el tratamiento de cáncer. Este y otros objetos de la invención se proporcionan mediante una o más de las realizaciones descritas más adelante.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de agentes que pueden regular la actividad de MGATX1. Un compuesto de ensayo se pone en contacto con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y se detecta la unión del compuesto de ensayo a MGAT-X1, en el que un compuesto de ensayo que se une al polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de la MGAT-X1. Otra realización de la invención es un procedimiento de selección de agentes que pueden regular la actividad de la MGAT-X1. Un compuesto de ensayo puesto en contacto con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y se detecta la actividad de la MGAT-X1 del polipéptido, en el que un compuesto de ensayo que incrementa la actividad de la MGAT-X1 se identifica como un agente terapéutico potencial para incrementar la actividad de la MGAT-X1, y en el que un compuesto de ensayo que disminuye la actividad de la MGAT-X1 del polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de la MGAT-X1.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la selección de agentes que pueden regular la actividad de MGATX1. Un compuesto de ensayo se pone en contacto con un polinucleótido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; y se detecta la unión del compuesto de ensayo al polinucleótido, en el que un compuesto de ensayo que se une al polinucleótido se identifica como un agente terapéutico para disminuir la actividad de MGAT-X1.

Se revela un procedimiento para la selección de agentes que pueden regular la actividad de la MGAT-X1. Un compuesto de ensayo se pone en contacto con un producto codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; y se detecta la unión del compuesto de ensayo al producto, en el que un compuesto de ensayo que se une al producto se identifica como un agente potencial para regular la actividad de la MGAT-X1.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de reducción de la actividad de la MGAT-X1. Una célula se pone en contacto con un reactivo que se une de manera específica a un polinucleótido que codifica MGAT-X1 o el polipéptido de la MGAT-X1. Por lo tanto la actividad de la MGAT-X1 se reduce.

Se revela un procedimiento de incremento de la actividad de MGAT- X1. Una célula se pone en contacto con un reactivo que específicamente se une a un polinucleótido que codifica MGAT-X1 o el polipéptido de la MGAT-X1. Por lo tanto se incrementa la actividad de la MGAT-X1.

Se revela el ADN no codificante del ADN que codifica MGAT-X1; clonación de los vectores de expresión que contienen el ácido nucleico que codifica MGAT-X1; células huésped u organismos transformados con los vectores de expresión que contienen ácido nucleico que codifican MGAT-X1; un procedimiento para la producción de y recuperación de MGAT-X1 purificada a partir de células huésped: proteína purificada, MGAT-X1, que se puede usar para identificar inhibidores o activadores de la transducción de señal que implica MGAT-X1; y procedimientos de selección de ligandos de la MGAT-X1 que usa células transformadas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de la MGAT-X1 (SEQ ID NO: 1).

La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipolipéptido de MGAT- X1 (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 muestra la secuencia de nucleótidos of a primer útil para la invención (SEQ ID NO: 3).

La Fig. 4 muestra la secuencia de nucleótidos of a primer útil para la invención (SEQ ID NO: 4).

La Fig. 5 muestra la secuencia de nucleótidos of a primer útil para la invención (SEQ ID NO: 5).

Descripción detallada de la invención*Secuencia de nucleótidos*

Como se usa en el presente documento y se designa por la abreviatura en mayúsculas, MGAT-X1, se refiere a una acilglicerol aciltransferasa en cualquier forma de origen natural o sintético y sus fragmentos activos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID NO: 2. En una realización, el polipéptido MGAT-X1 está codificado por los ARNm transcritos a partir del ADNc, como se ha mencionado por la abreviatura en letra minúscula, mgat-x1, de la SEQ. ID NO: 1. La secuencia de la MGAT-X1 se ensambló a partir de ESTs: BG674782, W68831, BG742855, W68738.

Un “oligonucleótido” es un tramo de restos de nucleótidos que tiene un número suficiente de bases que se usan como un oligómero, amplímero o sonda en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se preparan a partir de secuencia genómica o de ADNc y se usan para amplificar, revelar, o confirmar la presencia de un ADN o ARN similar en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos u oligómeros comprenden partes de una secuencia de ADN de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y como mucho aproximadamente 35 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 25 nucleótidos.

Se puede derivar “sondas” de ácidos nucleicos de una sola o doble cadena de origen natural o se pueden sintetizar de manera química. Son útiles en la detección de la presencia de secuencias idénticas o similares. Tales sondas se pueden marcar con moléculas indicadoras usando la traducción de muesca, la reacción de llenado de Klenow, la PCR u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las sondas de ácido nucleico se pueden usar en las hibridaciones southern, northern o *in situ* para determinar si el ADN o ARN que codifica una cierta proteína está presente en un tipo de célula, tejido, u órgano. Un fragmento de un polinucleótido o ácido nucleico que comprende toda o parte de la secuencia de nucleótidos que tienen menos nucleótidos que aproximadamente 6 kb, preferiblemente menor que aproximadamente 1 kb que se puede usar como una sonda.

Moléculas “indicadoras” son radionúclidos, enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, o agentes cromogénicos que están asociados a un nucleótido o secuencia de aminoácidos particular, estableciendo por lo tanto la presencia de una cierta secuencia, o permitiendo la cuantificación de una cierta secuencia.

“Variantes de nucleótido recombinante” que codifican MGAT-X1 se pueden sintetizar mediante el uso de “redundancia” en el código genético. Se pueden introducir diversas sustituciones de codón, tales como cambios silenciosos que producen sitios de restricción específicos o mutaciones específicas del uso de codón, se pueden introducir para optimizar la clonación en un plásmido o vector viral o expresión en un sistema huésped procariótico o eucariótico particular, respectivamente.

Moléculas “quiméricas” se pueden construir mediante la introducción de toda o parte de la secuencia de nucleótidos de esta invención en un vector que contiene la secuencia de ácidos nucleicos adicional que se puede esperar que cambie cualquiera o varias de las siguientes características de la MGAT-X1: localización celular, distribución, afinidades de unión a ligando, afinidades intercadena, degradación/tasa de intercambio, señalización, etc.

“Activo” se refiere a aquellas formas, fragmentos, o dominios de MGAT-X1 que retienen las actividades y/o actividades antigénicas de la MGAT-X1.

“MGAT-X1 de origine natural” se refiere a un polipéptido producido por las células que no se han modificado por ingeniería genética y de manera específica contempla diversos polipéptidos que surgen de las modificaciones después de la traducción del polipéptido que incluye pero no se limita a acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

“Derivado” se refiere a polipéptidos que se han modificado de manera química mediante técnicas tales como ubiquitinación, marcado (véase anteriormente), pegilación (derivación con polietilén glicol), e inserción o sustitución química de aminoácidos tales como ornitina que no aparecen de manera natural en las proteínas humanas.

“Variante de polipéptido recombinante” se refiere a cualquier polipéptido que difiere de la MGAT-X1 de origen natural mediante inserciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos, creadas usando técnicas de ADN recombinante. La guía en la determinación de qué restos de aminoácidos se pueden reemplazar, añadir, o suprimir, sin eliminar las actividades de interés se pueden encontrar comparando la secuencia del polipéptido de interés con la de los polipéptidos relacionados y minimizar el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en las regiones altamente conservadas.

“Sustituciones” de aminoácidos conservadoras se producen por reemplazo de un aminoácido con otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o treonina con una serina.

“Inserciones” o “supresiones” están típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar experimentalmente produciendo el péptido de manera sintética mientras que se

producen de manera sistémica las inserciones, supresiones, o sustituciones de nucleótidos en la secuencia que usa técnicas de ADN recombinante.

Una “secuencia de señal o guía” se puede usar, cuando se desee, para dirigir al polipéptido a través de una membrana de una célula. Tal secuencia se puede presentar naturalmente sobre los polipéptidos de la presente invención o proporcionar a partir de las fuentes heterólogas mediante técnicas de ADN recombinantes.

Un “oligopéptido” es un tramo corto de restos de aminoácidos y se pueden expresar a partir de un oligonucleótido. Oligopéptidos comprenden un tramo de restos de aminoácidos de al menos 3, 5, 10 aminoácidos y la mayoría 10, 15, 25 aminoácidos, típicamente de al menos 9 a 13 aminoácidos, y de suficiente longitud para mostrar la actividad biológica y/o antigénica.

“Inhibidor” es cualquier sustancia que retrasa o previene una reacción o respuesta química o fisiológica. Los inhibidores comunes incluyen pero no se limitan a moléculas no codificantes, anticuerpos, y antagonistas.

Expresión “estándar” es una medida cuantitativa o cualitativa para comparación. Se basa en un número estadísticamente apropiado de muestras normales y se crea para usar como base de comparación cuando se realizan ensayos de diagnóstico, desarrollo de ensayos clínicos, o siguiendo los perfiles de tratamiento de paciente.

“Animal” como se usa en el presente documento se puede definir para que incluya especies humana, domésticas (gatos, perros, etc.), agrícolas (vacas, caballos, ovejas, etc.) o especies de ensayo (ratón, rata, conejo, etc.).

Las secuencias de nucleótidos que codifican MGAT-X1 (o su complemento) tienen numerosas aplicaciones en las técnicas conocidas por los expertos en la técnica e la biología molecular. Estas técnicas incluyen el uso de sondas de hibridación, uso en la construcción de oligómeros para la PCR, uso para el mapeado de genes, uso en la producción recombinante de MGATX1, y uso en la generación de ADN o ARN no codificante, sus análogos químicos y similares. Usos de nucleótidos que codifican MGAT-X1 descritos en el presente documento son ejemplares de las técnicas conocidas y no se pretende que limiten su uso en cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Además, las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento se pueden usar en las técnicas de biología molecular que no se han desarrollado todavía, con la condición que las nuevas técnicas que dependen de las propiedades de las secuencias de nucleótidos que se conocen actualmente, por ejemplo, el código genético de tripletes, interacciones de pares de bases específicas, etc.

Los expertos en la técnica apreciarán que como resultado de la degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican la MGAT-X1. Algunas de éstas solamente tendrán una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de la MGAT-X1 conocida y de origen natural. La invención también contempla específicamente cada una toda variación posible de la secuencia de nucleótidos que se podría preparar mediante la selección de combinaciones basándose en las elecciones de codones posibles. Estas combinaciones se preparan de acuerdo con el código genético de tripletes convencional cuando se aplica a la secuencia de nucleótidos de la MGAT-X1 de origen natural, y todas estas variaciones se han de considerar como que se desvelan de manera específica.

Aunque las secuencias de nucleótidos que codifican MGAT-X1, sus derivados o sus variantes son preferiblemente capaces de hibridarse a la secuencia de nucleótidos de la MGAT-X1 de origen natural en condiciones rigurosas, puede ser ventajoso para introducir secuencias de nucleótidos que codifican la MGAT-X1 o sus derivados que poseen un uso de codón sustancialmente diferentes. Los codones se pueden seleccionar para incrementar la tasa a la que la expresión del péptido se produce en un huésped de expresión particular procariótico o eucariótico de acuerdo con la frecuencia con la que los codones particulares se utilizan por el huésped. Otras razones para alterar de manera sustancial la secuencia de nucleótidos que codifican MGAT-X1 y/o sus derivados sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada incluyen la producción de las transcripciones de ARN que tienen propiedades más deseables, tal como una mayor semivida, que las transcripciones producidas a partir de la secuencia de origen natural.

Las secuencias de nucleótidos que codifican MGAT-X1 se pueden acoplar a una diversidad de otras secuencias de nucleótidos mediante medios de las técnicas de ADN recombinante establecidas. Las secuencias de nucleótidos útiles para acoplarse a MGAT-X1 incluyen una colección de vectores de clonación tales como plásmidos, cósmicos, derivados del fago lambda, fagémidos, y similares. Los vectores de interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciación, etc. En general, los vectores de interés pueden contener un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios sensibles a la endonucleasa de restricción, y marcadores que se pueden seleccionar de uno o más sistemas de células huésped.

Se desvelan sondas de hibridación específicas de la MGAT-X1 capaces de hibridarse con secuencias de nucleótidos de origen natural que MGAT-X1. Tales sondas también se pueden usar para la detección de secuencias que codifican GPCR similares y deben contener preferiblemente al menos un 40% de identidad de nucleótidos con la secuencia de la MGAT-X1. Las sondas de hibridación de la invención sujeto se pueden derivar a partir de la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ. ID NO: 1 o a partir de secuencias genómicas incluyen promotor, potenciadores o intrones del gen nativo. Las sondas de hibridación se pueden marcar mediante una diversidad de moléculas indicadoras usando las técnicas bien conocidas en la técnica.

Se reconocerá que muchos análogos de supresión o de mutación de secuencias de ácidos nucleicos para MGAT-X1 serán sondas de hibridación eficaces para el ácido nucleico de la MGAT-X1. De acuerdo con lo anterior, la invención describe secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con tales secuencias de ácidos nucleicos que codifican MGAT-X1 en condiciones rigurosas.

“Condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones que permiten la hibridación de secuencias de ácido relacionadas sustancialmente. Por ejemplo, tales condiciones en general permitirán la hibridación de la secuencia con al menos un 85% de identidad de secuencias, preferiblemente con al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencias, más preferiblemente con al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente con al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia. Las condiciones y sondas de hibridación se pueden ajustar de formas bien caracterizadas para lograr la hibridación selectiva de sondas derivadas humanas.

Las hibridaciones en condiciones rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos son, por ejemplo, las hibridaciones realizadas en soluciones acuosas, que contienen 0,2 x SSC (1x de solución salina convencional - citrato = 150 mM NaCl, 15 mM trinatiocitrato), a 68°C (Sambrook *et al.*, 1989).

Las moléculas de ácido nucleico que se hibridarán al ácido nucleico que codifica MGAT-X1 en condiciones rigurosas se pueden identificar de manera funcional. Sin limitación, los ejemplos de los usos para sondas de hibridación incluyen: usos histoquímicos tales como identificación de tejidos que expresan MGAT-X1; medición de los niveles de ARNm, por ejemplo para identificar un tipo de tejido de muestra o para identificar células que expresan niveles anormales de la MGAT-X1; y detección de polimorfismos de la MGAT-X1.

La PCR como se desvela en las patentes de Estados Unidos números 4.683.195; 4.800.195; y 4.965.188 proporciona usos adicionales de oligonucleótidos basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica MGAT-X1. Tales sondas usadas en la PCR pueden ser de origen recombinante, sintetizadas químicamente, o una mezcla de ambos. Los oligómeros pueden comprender secuencias de nucleótidos discretas empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de la MGAT-X1 en tejidos específicos o uso de diagnóstico. Los mismos dos oligómeros, un conjunto jeraquizado de oligómeros, o incluso un conjunto degenerado de oligómeros se puede emplear en condiciones menos rigurosas para la identificación de los ADn o ARN relacionados estrechamente.

Las reglas para diseñar los cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”) se establecen ahora, como revisión por Protocolos de PCR [Devlin *et al.*]. Cebadores degenerados, es decir, preparaciones de cebadores que son heterogéneos en localizaciones de secuencias dadas, se pueden diseñar para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que son altamente homólogas con, pero no idénticas a MGATX1. Las estrategias están ahora disponibles para permitir que solamente uno de los cebadores se requiera para hibridarse se manera específica con una secuencia conocida. Por ejemplo, cebadores de ácido nucleico apropiadas se pueden ligar al ácido nucleico pretendido que se va a amplificar para proporcionar la pareja de hibridación para uno de los cebadores. De esta forma, solamente uno de los cebadores necesitan basarse en la secuencia del ácido nucleico previsto amplificar.

Los procedimientos de la PCR para amplificar ácido nucleico utilizarán al menos dos cebadores. Uno de estos cebadores será capaz de de hibridarse a una primera hebra del ácido nucleico a amplificar y de cebado de la síntesis de ácido nucleico dirigida por enzimas en una primera dirección. El otro será capaz de hibridar la secuencia recíproca de la primera hebra (si la secuencia a amplificar es de una sola cadena, esta secuencia será inicialmente hipotética, pero se sintetizará en el primer ciclo de amplificación) y cebado de la síntesis de ácido nucleico a partir de esa hebra en la dirección opuesta a la primera dirección y hacia el sitio de hibridación para el primer cebador. Las condiciones para conducir tales amplificaciones, particularmente en condiciones de hibridación rigurosas preferidas son bien conocidas.

Otros medios de producción de sondas de hibridación específicas para MGAT-X1 incluyen la clonación de secuencias de ácido nucleico que codifican MGAT-X1 o derivados de la MGAT-X1 en los vectores para la producción de sondas de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de la ARN polimerasa como la ARN polimerasa de T7 o SP6 y las moléculas indicadoras apropiadas.

Es posible producir una secuencia de ADN, o sus porciones, completamente mediante la química de síntesis. Después de la síntesis, la secuencia de ácido nucleico se puede insertar en cualquiera de los muchos vectores de ADN disponibles y las respectivas células huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, la química sintética se puede usar para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos. Como alternativa, una parte de la secuencia en la que una mutación se desea se puede sintetizar y recombinar con una parte más larga de una secuencia genómica o recombinante existente.

Las secuencias de nucleótidos que codifican MGAT-X1 se pueden usar para producir un oligo- o polipéptido purificado usando procedimientos bien conocidos de la tecnología de ADN recombinante. El oligopéptido se puede expresar en una diversidad de células huésped, o bien procarióticas o eucarióticas. Las células huésped pueden ser de la misma especie a partir de la que se derivó la secuencia de nucleótidos o a partir de especies diferentes. Las ventajas de producir un oligonucleótido mediante tecnología de ADN recombinante incluyen la obtención de cantidades adecuadas de la proteína para la purificación y la disponibilidad de procedimientos de purificación simplificados.

Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos

Una etapa importante en el análisis de genética molecular de enfermedad humana es a menudo la enumeración del número de copias de un ácido nucleico o la expresión relativa de un gen en tejidos particulares.

Estás actualmente disponibles varios planteamientos diferentes para preparar determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos. Las técnicas basadas en cromosomas, tales como hibridación genómica comparativa (CGH) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) facilitan los esfuerzos para localizar de manera citogenética regiones genómicas que están alteradas en las células tumorales. Las regiones de alteración genómica se pueden estrechar además de usar la pérdida de análisis de heterozigosidad (LOH), en la que el ADN enfermo se analiza y se compara con el ADN normal para evaluar la pérdida de un marcador polimórfico heterocigótico. Los primeros experimentos usados en los polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) [Johnson *et al*], o ADN de minisatélites hipervariables [Barnes *et al*]. En los años recientes LOH se ha realizado principalmente usando la amplificación por PCR de marcadores de microsatélites y electroforesis de los productos de la PCR radiomarcados [Jeffreys *et al*] o marcados fluorescentemente [Weber *et al*] y se comparan con los ADN normal y enfermo.

También se han desarrollado un número de procedimientos diferentes para cuantificar los ácidos nucleicos [Gergen *et al*, Southern *et al*, Sharp *et al*]. Más recientemente, se han desarrollado procedimientos para PCR y RT-PCR que son capaces de medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Un planteamiento, por ejemplo, mide la cantidad de un producto de la PCR en la fase logarítmica de la reacción antes de la formación de las mesetas de productos de reacción [Thomas *et al*].

Una secuencia génica contenida en todas las muestras a cantidad relativamente constante se utiliza típicamente para la normalización de la eficacia de amplificación de la muestra. Sin embargo, este planteamiento, sufre varios inconvenientes. El procedimiento requiere que cada muestra tenga cantidades iguales de entrada del ácido nucleico y que la eficacia de amplificación entre muestras sea idéntica hasta el momento del análisis. Además, es difícil usar los procedimientos convencionales de la cuantificación de la PCR tal como electroforesis de gel o hibridación de captura en placa para determinar que todas las muestras se analizan de hecho durante la fase logarítmica de la reacción como se requiere por el procedimiento.

Otro procedimiento llamado (QC)-PCR cuantitativo competitivo, como el nombre implica, depende de la inclusión de un competidor de control interno en cada reacción [Maniatis *et al*, Becker-Andre *et al*, Piatak *et al* in BioTechniques (1993)]. La eficacia de cada reacción se normaliza al competidor interno. Se añade típicamente una cantidad conocida de competidor interno. El producto de la PCR diana desconocido se compara con el producto de la PCR competidor desconocido para obtener una cuantificación relativa. Una dificultad a este planteamiento general depende del desarrollo de un control interno que se amplifica con la misma eficacia que la molécula diana.

Ensayos de la nucleasa 5' Fluorogénica

Los ensayos de la nucleasa fluorogénica son un procedimiento de cuantificación a tiempo real que usa una sonda para controlar la formación del producto de amplificación. La base de este procedimiento de control de la formación del producto de amplificación. La base de este procedimiento de control de la formación del producto de amplificación es medir la acumulación de manera continua del producto de la PCR usando una sonda de oligonucleótidos fluorogénica marcada doble, un planteamiento frecuentemente mencionado en la bibliografía simplemente como el procedimiento "TaqMan" [Piatak *et al* in Science (1993), Heid *et al*, Gibson *et al*, Holland *et al*].

La sonda usada en tales ensayos es típicamente un oligonucleótido corto (de aproximadamente 20 - 25 bases) que está marcado con dos tintes fluorescentes diferentes. El extremo 5' de la sonda se une a un tinte indicador y el extremo 3' se une a un tinte de inactivación, aunque los tintes se pueden unir a otras localizaciones sobre la sonda también. La sonda se diseña para que tenga al menos una complementariedad de secuencia sustancial con el sitio de unión a la sonda. Los cebadores de la PCR cadena arriba y cadena abajo que se unen a las regiones de flanco del locus se añaden a la mezcla de reacción. Cuando la sonda está intacta, se produce la transferencia de energía entre los dos fluoróforos y el inactivador inactiva la emisión a partir del indicador. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda se escinde mediante la actividad de la nucleasa en 5' de una polimerasa de ácido nucleico tal como la Taq polimerasa, liberando por lo tanto el indicador del inactivador de oligonucleótidos y dando como resultado un incremento de intensidad de emisión del indicador que se puede medir mediante un detector apropiado.

Un detector que se adapta de manera específica para medir las emisiones de fluorescencia tales como las creadas durante un ensayo fluorogénico es el ABI 7700 ó 4700 HT fabricados por Applied Biosystems, Inc. in Foster City, Calif. El ABI 7700 usa fibra óptica conectada a cada pocillo en una disposición de tubos de la PCR de 96 ó 384 pocillos. El instrumento incluye un láser para excitar las etiquetas y es capaz de medir la intensidad del espectro fluorescente a partir de cada tubo con el control continuo durante la amplificación por PCR. Cada tubo se vuelve a examinar cada 8,5 segundos.

El software del ordenador que tiene el instrumento es capaz de registrar la intensidad de fluorescencia del indicador e inactivador durante el curso de la amplificación. Los valores registrados se usarán después para calcular el incremento en la intensidad de emisión normalizado en una base continua. El incremento en intensidad de emisión se representa gráficamente frente al tiempo, es decir, el número de ciclos de amplificación, para producir una medición continua de

la amplificación. Para cuantificar el locus en cada reacción de amplificación, el gráfico de amplificación se examina en un punto durante la fase logarítmica de la acumulación del producto.. Esto se lleva a cabo mediante la asignación de una intensidad de umbral de fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto en el que cada gráfico de amplificación cruza el umbral (definido como el número de ciclos de umbral o Ct). Las diferencias en el número de ciclos umbral se usan para cuantificar la cantidad relativa de diana de PCR contenida dentro de cada tubo. Asumiendo que cada función de reacción a 100% de eficacia de PCR, una diferencia de un valor de Ct representa una diferencia de dos veces en la cantidad del molde de partida. El valor de fluorescencia se puede usar junto con una curva patrón para determinar la cantidad del producto de amplificación presente.

10 *Procedimientos de detección basados en no sonda*

Está disponible una diversidad de opciones para medir los productos de amplificación a medida que se forman. Un procedimiento utiliza etiquetas, tales como tintes, que solamente se unen a ADN de cadena doble. En este tipo de planteamiento, el producto de amplificación (que es de cadena doble) se une a moléculas de tinte en solución para formar un complejo. Con los tintes apropiados, es posible distinguir entre las moléculas de tinte libres en solución y las moléculas de tinte unidas al producto de amplificación. Por ejemplo, ciertos tintes son fluorescentes solamente cuando se unen al producto de amplificación. Los ejemplos de tintes que se pueden usar en procedimientos de este tipo general incluyen, pero no se limitan a, Syber Green. TM. y Pico Green de Molecular Probes, Inc. of Eugene, Oreg., bromuro de etidio, yoduro de propidio, cromomicina, acridina naranja, Hoechst 33258, Toto-1, Yoyo-1, DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol hidrocloreotiazida).

Otra técnica de detección de tiempo real mide la alteración en la transferencia de la energía de fluorescencia entre fluoróforos conjugada con los cebadores de PCR [Livak *et al.*]

25 *Procedimientos de detección basados en sonda*

Estos procedimientos de detección implican alguna alteración a la estructura o conformación de una sonda hibridada al locus entre el par de cebadores de amplificación. En algunos casos, la alteración está provocada por la extensión dependiente del molde catalizada por una polimerasa de ácido nucleico durante el procedimiento de amplificación. La alteración genera una señal detectable que es una medida indirecta de la cantidad de producto de amplificación formado.

Por ejemplo, algunos procedimientos implican la degradación o digestión de la sonda durante la reacción de extensión. Estos procedimientos son consecuencia de la actividad de la nucleasa en 5'-3' asociada a algunas polimerasas de los ácidos nucleicos. Las polimerasas que tienen esta actividad escinden los mononucleótidos u oligonucleótidos pequeños a partir de una sonda de oligonucleótidos hibridada a su secuencia complementaria localizada dentro del locus.

El extremo 3' del cebador cadena arriba proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa de ácido nucleico. A medida que la polimerasa cataliza la extensión del cebador cadena arriba y se encuentra con la sonda de unión, la polimerasa del ácido nucleico desplaza una parte del extremo 5' de la sonda y a través de su actividad de nucleasa escinde los mononucleótidos u oligonucleótidos de la sonda.

El cebador cadena arriba de la sonda se pueden diseñar de manera que se hibriden a la hebra complementaria en estrecha proximidad entre sí. De hecho, el extremo 3' del cebador cadena arriba y el extremo 5' de la sonda puede terminar en otra. En esta situación, la extensión del cebador cadena arriba no es necesaria con el fin de que la polimerasa de ácido nucleico comience a escindir la sonda. En el caso en el que en el que los nucleótidos que intervienen separan el cebador cadena arriba y la sonda, la extensión del cebador es necesaria antes de que la polimerasa de ácido nucleico encuentre el extremo 5' de la sonda. Una vez se produce el contacto y continúa la polimerización, la actividad de la exonucleasa 5'-3' de la polimerasa del ácido nucleico comienza a escindir los mononucleótidos u oligonucleótidos a partir del extremo 5' de la sonda. La digestión de la sonda continúa hasta que la parte restante de la sonda se disocia de la hebra complementaria.

En solución, las dos secciones del extremo se pueden hibridar entre sí para formar un bucle de horquilla. En esta conformación, el tinte indicador e inactivador están en proximidad lo suficientemente próxima que es fluorescente a partir del tinte indicador se inactiva de manera eficaz por el tinte inactivador. La sonda hibridada, por el contrato, da como resultado una conformación linealizada en la que el grado de inactivación disminuye. De este modo, mediante control de los casos de emisión para los dos tintes, es posible controlar de manera indirecta la formación del producto e amplificación.

60 *Sondas*

La sonda marcada se selecciona de manera que su secuencia sea sustancialmente complementaria a un segmento del locus de ensayo o un locus de referencia. Como se ha indicado anteriormente, el sitio del ácido nucleico al que la sonda se une de debe localizar entre los sitios de unión del cebador para los cebadores de amplificación cadena arriba y cadena abajo.

Cebadores

Los cebadores usados en la amplificación se seleccionan de manera que sean capaces de hibridarse a las secuencias de en las regiones flanqueantes del locus que se están amplificando. Los cebadores se eligen para que tengan al menos 5 complementariedad sustancial con las diferentes hebras de los ácidos nucleicos que se están amplificando. Cuando una sonda se utiliza para detectar la formación de los productos de amplificación, los cebadores se seleccionan de tal manera que flanquean la sonda, es decir, se localizan cadena arriba y cadena debajo de la sonda.

El cebador debe tener una longitud suficiente de manera que sea capaz de de cebar la síntesis de los productos de extensión en la presencia de un agente para la polimerización. La longitud y composición del cebador depende de muchos parámetros, incluyendo, por ejemplo, la temperatura a la que la reacción de hibridación se lleva a cabo, proximidad del sitio de unión de la sonda a la del cebador, concentraciones relativas del cebador y sonda y la composición del ácido nucleico particular de la sonda. Típicamente el cebador incluye 15 - 30 nucleótidos. Sin embargo, la longitud del cebador puede ser más o menos dependiente de la complejidad del sitio de unión del cebador y los factores listados anteriormente.

Etiquetas para sondas y cebadores

Las marcas usadas para marcar las sondas o cebadores de la invención actual pueden proporcionar la señal correspondiente a la cantidad del producto de amplificación pueden tomar una diversidad de formas. Como se ha indicado anteriormente con relación a l procedimiento de nucleasa 5' fluorogénica, una señal fluorescente es una señal que se puede medir. Sin embargo, también se pueden realizar mediciones, por ejemplo, controlando la radiactividad, colorimetría, absorción, parámetros magnéticos, o actividad enzimática. De este modo, las etiquetas que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos, cromóforos, isótopos radiactivos, reactivos de densidad de electrones, enzimas, y ligandos que tienen parejas de unión específica (por ejemplo, biotina-avidina).

El control de cambios en la fluorescencia es una forma particularmente útil para controlar la acumulación de los productos de amplificación. Un número de etiquetas útiles para la unión a sondas o cebadores están comercialmente disponibles incluyendo fluoresceína y diversos derivados de fluoresceína tales como FAM, HEX, TET y JOE (todos los cuales están disponibles a partir de Applied Biosystems, Foster City, Calif.); amarillo de lucifer, y derivados de cumarina.

Las etiquetas pueden estar unidas a la sonda o cebador usando una diversidad de técnicas y se puede unir al extremo 5', y/o el extremo 3' y/o en un nucleótido interno. La etiqueta también se puede unir a brazos de espaciador de diversos tamaños que están unidos a la sonda o cebador. Estos brazos espaciadores son útiles para obtener una distancia deseada entre múltiples etiquetas unidas a la sonda o cebador.

En algunos casos, se puede utilizar una sola etiqueta; mientras, en otros casos, tales como con los ensayos de nucleasa 5' fluorogénica por ejemplo, dos o más etiquetas están unidas a la sonda. En los casos en los que la sonda incluye múltiples etiquetas, es en general aconsejable para mantener el espacio entre las etiquetas que es suficiente para permitir la separación de las etiquetas durante la digestión de la sonda mediante la actividad de la nucleasa 5'-3' de la secuencia de la polimerasa de ácido nucleico.

Pacientes que muestran síntomas de Enfermedad

Un número de enfermedades están asociadas a los cambios en el número de copias de un cierto gen. Para los pacientes que tienen síntomas de una enfermedad, el procedimiento de la PCR de tiempo real se puede usar para determinar si el paciente tiene alteraciones del número de copia que se sabe que están unidas a enfermedades que están asociadas a los síntomas que tiene el paciente.

Expresión de la MGAT-XI

Proteínas de fusión MGAT- XI

Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra las secuencias de aminoácidos de la MGAT-X1 y para uso en diversos sistemas de ensayo. Por ejemplo, proteínas de fusión se pueden usar para identificar proteínas que interactúan con partes del péptido MGAT-X1. Los ensayos de cromatografía de proteína o basados en genotecas para las interacciones proteína - proteína, tales como los sistemas de dos híbridos de levaduras o de despliegue en fago, se pueden usar para este propósito. Tales procedimientos se conocen bien en la técnica y también se pueden usar como selecciones de fármaco.

Unas proteína de fusión de la MGAT-X1 comprende dos segmentos de polipéptidos condensados conjuntamente mediante mediante un enlace de péptido. El primer segmento de polipéptido puede comprender al menos 54, 75, 100, 125, 139, 150, 175, 200, 225, 250, ó 275 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2 o de una variante biológicamente activa, tales como los descritos anteriormente. El primer segmento de polipéptido también comprende MGAT-X1 de longitud completa.

El Segundo segmento de polipéptido puede ser una proteína de longitud completa o fragmento de proteína. Las proteínas usadas comúnmente en la construcción de la proteína de fusión incluyen, pero no se limitan a, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteínas autofluorescentes, incluyendo la proteína fluorescente azul (BFP), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), y cloramfenicol acetil-transferasa (CAT). De manera adicional, las etiquetas de epítopes se usan en las construcciones de proteínas de fusión, incluyendo etiquetas de histidina (His), etiquetas de FLAG, etiquetas de hemaglutinina de gripe(HA), etiquetas Myc, etiquetas VSV-G, y etiquetas tioredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta S, fusiones de Lex un dominio de unión a ADN (DBD), fusiones de dominio de unión de ADN GAL4, fusiones de proteína BP16 de virus herpes simplex (HSV) y fusiones de proteína G (por ejemplo G (alfa) 16, Gs, Gi). También se puede modificar por ingeniería genética una proteína de fusión para que contenga un sitio de escisión localizado adyacente a la MGAT-X1.

Preparación de Polinucleótidos

Un polinucleótido de la MGAT-X1 de origen natural se puede aislar sin otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas, y lípidos. Los polinucleótidos se pueden preparar por una célula y aislarse usando técnicas de purificación de ácido nucleico, o sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o mediante el uso de un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutinarios y se conocen en la técnica. Cualquier técnica para obtener un polinucleótido se puede usar para obtener polinucleótidos de la MGAT-X1. Por ejemplo, se pueden usar enzimas de restricción y sondas para aislar fragmentos de polinucleótidos que comprende secuencias de nucleótidos de la MGAT-X1. Los polinucleótidos aislados están en las preparaciones que están libres de al menos 70, 80, o 90% de otras moléculas.

Las moléculas de ADNc de la MGAT-X1 se pueden preparar con técnicas de biología molecular convencionales usando ARNm de la MGAT-X1 como molde. Las moléculas de ADNc de la MGAT-X1 se pueden después replicar usando las técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Se puede usar una técnica de amplificación, tal como PCR para obtener copias adicionales de polinucleótidos de la invención, usando o bien ADN o ADNc genómico humano como molde.

Como alternativa, se pueden usar técnicas de química de síntesis para sintetizar polinucleótidos de la MGAT-X1. La degeneración del código genético permite secuencias de nucleótidos alternativas para sintetizar que codificarán MGAT-X1 que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o su variante biológicamente activa.

Extensión de Polinucleótidos

Se pueden usar diversos procedimientos basándose en PCR para extender las secuencias de ácido nucleico que codifican MGAT-X1, por ejemplo para detectar secuencias cadena arriba del gen de la MGAT-X1 tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, la PCR de sitio de restricción usa cebadores universales para recuperar la secuencia desconocida adyacente a un locus conocido. El ADN genómico se amplifica primero en la presencia de un cebador a una secuencia de engarce y un cebador específico a la región conocida. Las secuencias amplificadas son el sujeto de una segunda ronda de la PCR con el mismo cebador de engarce y otro cebador específico interno al primero. Los productos de cada ronda de la PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y secuenciarse usando transcriptasa inversa.

La PCR inversa también se puede usar para amplificar o extender secuencias que usan cebadores divergentes basándose en una región conocida. Los cebadores se pueden diseñar usando un software comercialmente disponible, tal como el software OLIGO 4.06 Primer Analysis (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), que es de 22 - 30 nucleótidos de longitud, para que tenga un contenido de GC de 50% o más, e hibridarse a la secuencia diana a temperaturas aproximadamente 68 - 72°C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida. Después el fragmento se hace circular mediante ligamiento intramolecular y se usa como un molde de la PCR.

Otro procedimiento que se puede usar es PCR de captura, que implica la amplificación mediante la PCR de los fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en el ADN cromosómico humano y de levadura artificial. En este procedimiento, se pueden usar las digestiones y ligaduras de enzima de restricción múltiples para colocar una secuencia de ADN modificada por ingeniería genética en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de realizar la PCR.

Cuando se seleccionan los ADNc de longitud completa, se prefiere usar genotecas que se hayan seleccionado por tamaño para que incluyan ADNc mayores. Las genotecas cebadas al azar pueden ser esencialmente preferibles par alas situaciones en las que una genoteca de oligo d(T)no produce un ADNc de longitud completa. Las genotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de secuencia en las regiones reguladoras no transcritas de 5'.

Los sistemas de electroforesis de capilar comercialmente disponibles se pueden usar para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de la PCR o productos de secuenciación. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros de flujo libre para la separación electroforética, cuatro tintes fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que están activados por láser, y la detección de las longitudes de onda emitidas por una cámara

con dispositivo acoplado a carga. La intensidad de la salida/luz se puede convertir en señal eléctrica usando un equipo y software apropiado (por ejemplo, GENOTYPER and Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y el procedimiento entero de carga de las muestras a análisis de ordenador y muestra de datos electrónica se puede controlar por ordenador. La electroforesis capilar se prefiere de manera especial para la secuenciación de partes pequeñas de ADN que pudieran estar presentes en cantidades limitadas en una muestra particular.

Obtención de Polipéptidos

La MGAT-X1 se puede obtener, por ejemplo, mediante purificación de células humanas, mediante la expresión de los polinucleótidos de la MGAT-X1, o mediante síntesis química directa.

Purificación de proteínas

La MGAT-X1 se puede purificar a partir de cualquier célula que expresa la transferasa, incluyendo los que se han transferido con las construcciones de expresión que expresan MGAT-X1. Una MGAT-X1 purificada se separa de otros compuestos que normalmente se asocian a MGAT-X1 en la célula, tales como ciertas proteínas, carbohidratos, o lípidos, usando los procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía por exclusión de tamaño, fraccionamiento por sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y electroforesis de gel preparativa.

Expresión de Polinucleótidos de MGAT X1

Para expresar MGAT-X1, el polinucleótido de la MGAT-X1 se puede insertar en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Los procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica se pueden usar para MGAT-X1 y elementos de control de transcripción y de traducción apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis, i recombinación genética *in vivo* [Devlin *et al.*, Science, (1990)].

Una variedad de los sistemas de vector/huésped se puede utilizar para que contenga y exprese las secuencias que codifican MGATX1. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido, o vectores de expresión de ADN de cósmico; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o con vectores de expresión de bacterias (por ejemplo, Ti o plásmidos de pBR322), o sistemas de células animales.

Los elementos de control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas de los potenciadores del vector, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' que interactúan con las proteínas celulares de huésped para sacar la transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su longitud y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos y que se pueden inducir. Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores que se pueden inducir tales como el promotor lacZ híbrido o el fagémido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. El promotor de de polihedrina de baculovirus se puede usar en células de insectos. Los promotores o potenciadores derivados de los genomas de células de plantas (por ejemplo, choque térmico, RUBISCO, y genes de proteína de almacenamiento) o a partir de virus de plantas (por ejemplo, promotores virales o secuencias guía) se pueden clonar en el vector. En los sistemas de células de mamíferos, son preferibles promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que codifica MGAT-X1, se pueden usar vectores basados en SV40 o EBV con un marcador que se puede seleccionar apropiado.

Sistemas de expresión de bacterias y de levaduras

En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar un número de vectores de expresión. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de la MGAT-X1 para la inducción de anticuerpos, se pueden usar vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican de manera fácil. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene). En un vector BLUESCRIPT, se puede ligar una secuencia de la MGAT-X1 en el vector en fase con las secuencias para la Met terminal y los 7 restos posteriores de β -galactosidasa de manera que se produce una proteína híbrida. Los vectores pLN o vectores pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) también se pueden usar para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con la glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en la presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en tales sistemas se pueden diseñar para que incluyan heparina, trombina, o sitios de escisión de la proteasa del factor Xa de manera que el polipéptido clonado de interés se pueda liberar del resto GST también.

Sistemas de expresión de plantas y de insectos

Si se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de las secuencias que codifican MGAT-X1 se pueden proporcionar mediante cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV se pueden usar solos o en combinación con la secuencia guía omega de TMV [Scott *et al.* (1990)]. Como alternativa, promotores de plantas tales como la pequeña unidad de RUBISCO o se pueden usar promotores de choque térmico [Takamatsu *et al.* (1987)]. Estas construcciones se pueden introducir en células de plantas mediante transformación de ADN directa o mediante transfección mediada por patógenos.

También se puede usar un sistema de insecto para expresar MGAT-X1. Por ejemplo, en uno de tales sistemas se usa el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican MGAT-X1 se pueden clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y colocarse bajo control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de la MGAT-X1 hará que el gen de la polihedrina sea inactivo y produzca virus recombinante que carece de proteína de revestimiento. Los virus recombinantes se pueden después usar para infectar células de *S. frugiperda* cells o larvas de *Trichoplusia* en las que se puede expresar MGAT-X1 [Fodor *et al.*, (1993)].

Sistemas de expresión de mamíferos

Se puede usar un número de sistemas de expresión basados en virus para expresar MGAT-X1 en células huésped de mamífero. Por ejemplo, si se usa un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican MGAT-X1 se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que comprende el promotor antiguo y la secuencia guía tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral se puede usar para obtener un virus viable que es capaz de expresar MGAT-X1 en células huésped infectadas [Engelhard *et al.* (1994)]. Si se desea, se pueden usar potenciadores de transcripción, tal como potenciador del virus de sarcoma Rous (RSV), para incrementar la expresión en células huésped de mamíferos.

También se pueden usar cromosomas artificiales humanos (HAC) para administrar fragmentos mayores de AND que pueden estar contenidos y expresados en un plásmido. Los HAC de 6M a 10M se construyen y se distribuyen a las células mediante procedimientos de distribución convencionales (por ejemplo, liposomas, polímeros de amino policationicos, o vesículas). También se pueden usar señales de inicio de específicas para lograr traducción más eficaz de las secuencias que codifican MGAT-X1. Tales señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican MGAT-X1, su codón de inicio, y las secuencias cadena arriba se insertan en el vector de expresión adecuado, no se necesitan señales de control de transcripción o de traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que la secuencia de codificación solamente, o su fragmento, se inserta, se deben proporcionar señales de control de la traducción exógena (incluyendo el codón de inicio ATG). El codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la inserción completa. Los elementos de traducción exógenos y los codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto natural como sintético.

Células huésped

Se puede elegir una cepa de célula por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la MGAT-X1 expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. El procesamiento después de la traducción que escinde una "prepro" del polipéptido también se puede usar para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correcta. Diferentes células huésped que tienen maquinaria celular y mecanismos característicos para las actividades después de la traducción (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38), están disponibles de la Colección Americana de Cultivos (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) y se pueden elegir para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea.

Se prefiere la expresión estable para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable la MGAT-X1 se pueden transformar usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador que se puede seleccionar sobre el mismo o sobre un vector separado. Después de la introducción del vector, las células se pueden dejar crecer durante 1 - 2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador que se puede seleccionar es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de las células que expresan de manera exitosa las secuencias de la MGAT-X1 introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas de manera estable se pueden hacer proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiados al tipo de célula. Se puede usar cualquiera de un número de los sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estas incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina quinasa de virus herpes simplex [Logan & Shenck, (1984)] y la adenina fosforibosiltransferasa [Wigler *et al.*, (1977)] que se pueden emplear en las células tk- o aprt-, respectivamente. También, se pueden usar, resistencia a antimetabolito, antibiótico, o herbicida como la base para la selección. Por ejemplo, *dhfr*- confiere resistencia a metotrexato [Lowy *et al.*, (1980)], *npt* confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 [Wigler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (1980)], y las *pat* confiere resistencia a clorsulfuron y fosfinotricin acetiltransferasa, respectivamente [Colbere-Garapin *et al.*, (1981)]. Se han descrito genes que se pueden seleccionar adicionales. Por ejemplo, *trpB* permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o *hisD*, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina [Murray *et al.*, (1992)]. Se pueden usar marcadores visibles tales como antocianinas, b-glucuronidasa y su sustrato

GUS, y luciferasa su sustrato luciferina, para identificar transformantes y para cuantificar la cantidad de la expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico.

Detección de la expresión de Polipéptido

Aunque la presencia de la expresión de un gen marcador sugiere que un polipéptido de la MGAT-X1 también está presente, su presencia y expresión puede necesitar ser confirmada. Por ejemplo, si se inserta una secuencia que codifica MGAT-X1 dentro de una secuencia de gen marcador, las células transformadas que contienen secuencias que codifican MGAT-X1 se pueden identificar mediante la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, se puede colocar un gen marcador en tándem con una secuencia que codifica MGAT-X1 bajo el control de un solo promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección usualmente indica la expresión del polinucleótido de la MGAT-X1.

Como alternativa, células huésped que contienen un polinucleótido de MGAT-X1 y que expresa MGAT-X1 se puede identificar mediante una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y bioensayo de proteínas o técnicas de inmunoensayo que incluyen tecnologías basadas en membrana, solución o en procesador para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia de polinucleótidos que codifica MGAT-X1 se puede detectar mediante hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación usando sondas o fragmentos o fragmentos de polinucleótidos que codifican MGAT-X1. Los ensayos basados en la amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados entre las secuencias que codifican MGAT-X1 para detectar transformantes que contienen un polinucleótido de la MGAT-X1.

Se conocen en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de MGAT-X1, usando o bien anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido. Los ejemplos incluyen ensayo inmuoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Se puede usar un inmunoensayo de dos sitios, basado en monoclonales que usa anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítopes que no interfieren sobre MGAT-X1, o se puede emplear un ensayo de unión competitiva [Hartman & Mulligan, (1988), Hampton *et al.*, (1990)].

Los expertos en la técnica conocen una amplia diversidad de etiquetas y se pueden usar en diversos ensayos de ácido nucleico y aminoácido. Los medios para producir la hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con los polinucleótidos que codifican MGAT-X1 incluyen oligomarcado, traducción de muesca, marcado del extremo, o amplificación de la PCR que usa un nucleótido marcado. Como alternativa, las secuencias que codifican MGAT-X1 se pueden clonar en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles, y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa apropiada tales como T7, T3, o SP6. Estos procedimientos se pueden llevar a cabo usando una diversidad de kits comercialmente disponibles (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, y US Biochemical). Las moléculas indicadoras adecuadas o etiquetas que se pueden usar para facilitar la detección incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

Expresión y Purificación de Polipéptidos

Las células huésped transformadas con secuencias de nucleótidos que codifican MGAT-X1 se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir de cultivo de células. El polipéptido producido por una célula transformada puede estar secretado o contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como entenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican MGAT-X1 se pueden diseñar para contener secuencias de señal que dirigen la secreción de MGAT-X1 soluble mediante una membrana de células procarióticas o eucarióticas o que dirigen la inserción de membrana de la MGAT-X1 unida a membrana.

Como se ha descrito anteriormente, se pueden usar otras construcciones para unir una secuencia que codifica MGAT-X1 a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de proteínas solubles. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metal tales como los módulos histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de la proteína A sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de extensión FLAGS/purificación por afinidad (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Inclusión de secuencias de engarce escindibles tales como los específicos para el Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y MGAT-X1 también se pueden usar para facilitar la purificación. Un vector de expresión tal proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene MGAT-X1 y 6 restos de histidina que precede un sitio de escisión de tioredoxina o de una enteroquinasa. Los restos de histidina facilitan la purificación por IMAC (cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado) Maddox *et al.*, (1983)], mientras el sitio de escisión de la enteroquinasa proporciona un medio para purificar MGAT-X1 a partir de la proteína de fusión [Porath *et al.*, (1992)].

Síntesis química

Las secuencias que codifican MGAT-X1 se pueden sintetizar, completamente o en parte, usando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica [Kroll *et al.* (1993), Caruthers *et al.*, (1980)]. Como alternativa, la propia MGAT-X1 se puede usar usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como síntesis de péptido directa usando técnicas en fase sólida [Hom *et al.*, (1980); Merrifield *et al.*, (1963)]. La síntesis de proteína se puede o bien realizar usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática se puede lograr, por ejemplo, usando El sintetizador de péptidos de Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de la MGAT-X1 se pueden separar de manera separada y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

El péptido recientemente sintetizado se puede purificar sustancialmente mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa. La composición de una MGAT-X1 sintética se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de aminoácidos. De manera adicional, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de la MGAT-X1 se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinarse usando procedimientos químicos con las secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o una proteína de fusión.

Producción de polipéptidos alterados

Como entienden los expertos en la técnica, se puede producir de manera ventajosa las secuencias de nucleótidos que codifica MGAT-X1- que poseen codones de origen no natural. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procariótico o eucariótico particular se puede seleccionar para incrementar la velocidad de la expresión de proteína o para producir una transcripción de ARN que tiene las propiedades deseables, tal como una semivida que es más larga que la de una transcripción generada a partir de la secuencia de origen natural.

Las secuencias de nucleótidos mencionadas en el presente documento se pueden modificar por ingeniería genética usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias que codifican MGAT-X1 por una diversidad de razones, que incluyen, pero no se limitan a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, y/o expresión del polipéptido o producto de ARNm. La recomposición de ADN mediante fragmentación al azar y reensamblaje de los fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos se pueden usar para modificar por ingeniería genética las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio se puede usar para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar la preferencia de codón, producir variantes de ajuste, introducir mutaciones, y así sucesivamente.

Anticuerpos

Cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica se puede generar para que se usa de manera específica a un epítipo de la MGAT-X1. "Anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como sus fragmentos, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de la MGAT-X1. Típicamente, al menos 6, 8, 10, ó 12 aminoácidos contiguos se requieren para formar un epítipo. Sin embargo, los epítipos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25, ó 50 aminoácido. Cualquier anticuerpo que se une de manera específica a un epítipo de MGAT-X1 se puede usar de manera terapéutica, así como en ensayos inmunoquímicos, tales como transferencias de Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en la técnica. Se pueden usar diversos inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Se conocen bien en la técnica numerosos protocolos para ensayos competitivos o inmunoradiométricos. Tales inmunoensayos típicamente implican la medida de formación de complejo entre un inmunógeno y un anticuerpo que se une de manera específica al inmunógeno.

Típicamente, un anticuerpo que se une de manera específica a MGAT-X1 proporciona una señal de detección al menos 5-, 10-, ó 20- veces mayor que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usan en un ensayo inmunoquímico. Preferiblemente, los anticuerpos que se unen de manera específica a MGAT-X1 no detectan otras proteínas en los ensayos inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar MGAT-X1 en solución.

La MGAT-X1 se puede usar para inmunizar a un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, ratón, o ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, MGAT-X1 se puede conjugar a una proteína vehículo, tal como albúmina sérica bovina, tiroglobulina, y hemocianina de lapa californiana. Dependiendo de la especie huésped, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, leucocianina de lapa californiana, y dinitrofenol). Entre otros adyuvantes usados en los seres humanos, BCG (*Bacilos Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Los anticuerpos monoclonales que se usan específicamente a MGAT-X1 se pueden preparar usando cualquier técnica que proporciona la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas, y la técnica de hibridoma EBV [Roberge *et al.*, (1995); Kohler *et al.*, (1985); Kozbor *et al.*, (1985); Cote *et al.*, (1983)].

Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos,” el ajuste de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiada [Cole *et al.* (1984); Morrison *et al.* (1984); Neuberger *et al.* (1984)]. También se pueden usar anticuerpos monoclonales y otros “humanizados” para evitar que un paciente monte una respuesta inmune frente al anticuerpo cuando se usa de manera terapéutica.. Tales anticuerpos pueden ser suficientemente similares a los anticuerpos humanos a usar directamente en terapia o pueden requerir alteración de unos pocos restos clave. Las diferencias de secuencias entre anticuerpos de roedores y secuencias humanas se pueden minimizar reemplazando restos que difieren de aquellos en las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida al sitio de restos individuales o mediante injerto de regiones determinantes complementarias enteras. Los anticuerpos que se unen específicamente a MGAT-X1 pueden contener sitios de unión a antígeno que están o bien parcialmente o totalmente humanizados, como se desvela en el documento de Estados Unidos 5.565.332.

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena se pueden adaptar usando procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de una sola cadena que se unen específicamente a MGAT-X1. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero composición idiotípica distinta, se pueden generar mediante recomposición de cadena a partir de genotecas de inmunoglobulina de combinación al azar [Takeda *et al.*, (1985)]. Los anticuerpos de una sola cadena también se pueden construir usando un procedimiento de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc de hibridoma como molde. Los anticuerpos de una sola cadena pueden ser mono o bi específicos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se enseña la construcción de anticuerpos de una sola cadena tetravalentes biespecíficos. Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de una sola cadena se puede construir usando la síntesis de nucleótidos manual o automática., clonarse en una construcción de expresión que usa procedimientos de ADN recombinante, e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificante, como se desvela más adelante. Como alternativa, los anticuerpos de una sola cadena se pueden producir directamente usando, por ejemplo, tecnología de fago filamentoso [Burton *et al.* (1991); Verhaar *et al.* (1995)].

Los anticuerpos que se unen específicamente a MGAT-X1 también se pueden producir mediante la inducción *in vivo* de la producción en la población de linfocitos o mediante selección de genotecas de inmunoglobulina o paneles de reactivos de unión altamente específicos. Se pueden construir otros tipos de anticuerpos y usarse de manera terapéutica en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, se pueden construir anticuerpos quiméricos como se desvela en el documento WO 93/03151. También se pueden preparar las proteínas de unión que se derivan de las inmunoglobulinas y que son multivalentes y multispecíficas, tales como los “dicuerpos” descritos en el documento WO 94/13804.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden purificar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar por actividad mediante paso en una columna a las que MGAT-X1 está unida. Los anticuerpos unidos se pueden después eluir de la columna usando un tampón con una alta concentración en sal.

Oligonucleótidos no codificantes

Los oligonucleótidos no codificantes son secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN. Una vez se ha introducido en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con secuencias naturales producidas por la célula para formar complejos y bloquear o bien la transcripción o la traducción. Preferiblemente, un oligonucleótido no codificante es de al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede ser de al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50 o más nucleótidos de longitud. Se pueden usar secuencias más largas. Las moléculas de oligonucleótidos no codificantes se pueden proporcionar en una construcción de ADN e introducirse en una célula como se ha descrito anteriormente para disminuir el nivel del producto génico de MGAT-X1 en la célula.

Los oligonucleótidos no codificantes pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar manualmente o mediante un sintetizador automático, mediante unión covalente del extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces de internucleótido no fosfodiéster tales como alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforamidatos, ésteres fosfatos,, carbamatos, acetamida, carboximetil éstrés, carbonatos, y fosfato triésteres.

Las modificaciones de la expresión génica de la MGAT-X1 se pueden obtener mediante diseño de oligonucleótidos no codificantes que formarán complejos dobles con el control, 5', o regiones reguladoras del gen de la MGAT- X1. Se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de inicio de transcripción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 del sitio de partida. De manera similar, la inhibición se puede lograr usando la metodología de apareamiento de bases de “triple hélice”. El emparejamiento de triple hélice es útil debido a que provoca la inhibición de que la capacidad de la doble hélice se abra suficientemente para la unión de las polimerasas, factores de transcripción, o chaperones. Los avances terapéuticos que usan ADN triple se han descrito en la bibliografía [Nicholls *et al.* (1993)]. Un oligonucleótido no codificante se puede usar se puede diseñar para bloquear la traducción de ARNm mediante la prevención de la transcripción de la unión a ribosomas.

No se requiere una complementariedad precisa para la formación del complejo exitoso entre un oligonucleótido no codificante y la secuencia complementaria de un polinucleótido de la MGAT-X1. Los oligonucleótidos no codificantes que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, ó 5 o más tramos de nucleótidos contiguos que son complementarios de manera precisa a un polinucleótido de la MGAT-X1, cada uno separado por un tramo de nucleótidos contiguos que no son complementarios a los nucleótidos MGATX1 adyacentes, pueden proporcionar una especificidad de dirección

suficiente para el ARNm de la MGAT-X1. Preferiblemente, cada tramo de nucleótidos contiguos complementarios es de al menos 4, 5, 6, 7, u 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias que intervienen no complementarias son preferiblemente de 1, 2, 3, ó 4 nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica pueden fácilmente usar el punto de fusión calculado de un par no codificante - codificante para determinar el grado de discordancia que se tolerará entre un oligonucleótido no codificante particular y una secuencia de polinucleótidos de la MGAT-X1 particular. Los oligonucleótidos no codificantes se pueden modificar sin que afecte a su capacidad para hibridarse a un polinucleótido de MGAT-X1. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno o ambos extremos de la molécula no codificante. Por ejemplo, los enlaces de fosfato internucleósido se pueden modificar mediante la adición de restos colesterilo o diamina con números variables de restos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. También se pueden emplear bases modificadas y/o azúcares, tal como arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' en el que el grupo hidroxilo 3' o el grupo fosfato 5' están sustituidos, también se puede emplear en un oligonucleótido no codificante modificado. Estos oligonucleótidos modificados se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica [Gee *et al.* (1994); Agrawal *et al.* (1992); Uhlmann *et al.* (1990)].

15 *Ribozimas*

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica Uhlmann *et al.* (1987); Cech *et al.* (1987), (1990), (1992)]. Las ribozimas se pueden usar para inhibir la función génica mediante escisión de una secuencia de ARN, como se conoce en la técnica (Patente de Estados Unidos N° 5.641.673). El mecanismo de la acción de ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima a ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Los ejemplos incluyen moléculas de ribozima de pez martillo modificadas por ingeniería genética que pueden de manera específica y eficaz catalizar la escisión endonucleolítica de las secuencias de nucleótidos específicas. La secuencia codificante de un polinucleótido de la MGAT-X1 se puede usar para generar ribozimas que se unirán específicamente a ARNm transcrito a partir de un polinucleótido de la MGAT-X1. Los procedimientos de diseño y construcción de ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARNm en trans de una manera altamente específica de secuencia se han desarrollado y descrito en la técnica [Couture & Stinchcomb (1996)]. Por ejemplo, la actividad de escisión de las ribozimas se pueden dirigir a ARN específicos mediante modificación por ingeniería genética de una región discreta de "hibridización" en la ribozima. La región de hibridización contiene una secuencia complementaria al ARN diana y de esta manera se hibrida de manera específica con él.

Los sitios de escisión específica de la ribozima dentro de una diana de ARN de MGAT-X1 se puede identificar mediante exploración de la molécula diana para los sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondiente a la región del ARN diana que contiene el sitio de escisión se puede evaluar por las características estructurales secundarias que pueden hacer que la diana no se pueda trabajar. La idoneidad de las diaans de ARN de MGAT-X1 adecuadas también se pueden evaluar mediante el ensayo de la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando los ensayos de protección de ribonucleasa. Las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 1 y su complemento proporcionan fuentes de secuencias de la región de hibridación adecuadas. Se pueden usar secuencias de hibridación más largas para incrementar la afinidad de la secuencia de hibridación para la diana. Las regiones de hibridación y escisión de la ribozima se pueden relacionar de manera íntegra de manera que tras la hibridación del ARN diana a través de las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir la diana.

Las ribozimas se pueden introducir en las células como parte de una construcción de ADN. Se pueden usar procedimientos mecánicos, tales como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación, o precipitación por fosfato de calcio, para introducir una construcción de ADN que contiene ribozima en las células en las que se desea disminuir la expresión de MGAT-X1. Como alternativa, si se desea que las células retengan de manera estable la construcción de ADN, la construcción se puede suministrar sobre un plásmido y mantener como un elemento separado o integrarse en el genoma de las células, como se conoce en la técnica. Una construcción de ADN que codifica ribozima puede incluir elementos reguladores de la transcripción, tal como un elemento promotor, un potenciador o elemento UAS, y una señal de terminador de la transcripción, para controlar la transcripción de ribozimas en las células (patente de Estados Unidos n° 5.641.673). También se pueden modificar por ingeniería genética las ribozimas para proporcionar un nivel adicional de regulación, de manera que la destrucción de ARNm se produzca solamente cuando se inducen en la célula tanto una ribozima como un gen diana.

55 *Selección/Ensayos de selección*

Reguladores

Los reguladores como se usan en el presente documento, se refiere a agonistas de la MGAT-X1 y antagonistas de la MGAT-X1. Los agonistas de MGAT-X1 son moléculas que, cuando se unen a MGAT-X1, incrementan o prolongan la actividad de la MGAT-X1. Los agonistas de la MGAT-X1 incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, pequeñas moléculas, o cualquier otra molécula que activa MGAT-X1. Los antagonistas de la MGAT-X1 son moléculas que, cuando se unen a MGAT-X1, disminuyen la cantidad de o la duración de la actividad de la MGAT-X1. Los antagonistas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, anticuerpos, pequeñas moléculas, o cualquier otra molécula que disminuye la actividad de la MGAT-X1.

El término “modular,” como aparece en el presente documento, se refiere a un cambio en la actividad de la MGAT-X1. Por ejemplo, modulación puede provocar un incremento o una disminución en la actividad de proteína, características de unión, o cualesquiera otras propiedades biológica, funcional, o inmunológica de la MGAT-X1.

5 Como se usa en el presente documento, las frases “unión específica” o “que se une de manera específica” se refiere a la interacción entre una proteína o péptido y un agonista, un anticuerpo o un antagonista. La interacción depende de la presencia de una estructura particular de la proteína reconocida por la molécula de unión (es decir, el determinante antigénico o epítipo). Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo “A,” la presencia de de un polipéptido que contiene el epítipo A, o la presencia de de A no marcado libre, en la reacción que contiene A marcado libre y el
10 anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado que se une al anticuerpo.

La invención proporciona procedimientos (también denominados en el presente documento como “ensayos de selección”) para identificar compuestos que se pueden usar para el tratamiento de cáncer. Los procedimientos suponen la identificación de compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, pequeñas
15 moléculas u otras moléculas) que se unen a MGAT-X1 y/o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad biológica de la MGAT-X1 o su expresión y después determinar cuales de estos compuestos tienen un efecto sobre los síntomas o enfermedades relacionadas con cáncer, en un ensayo *in vivo*.

Los compuestos candidatos o de ensayo o agentes que se unen a la MGAT-X1 y/o tienen un efecto estimulador o
20 inhibidor sobre la actividad de la expresión de la MGAT-X1 se identifican o bien n ensayos que emplean células que expresan la MGAT-X1 sobre la superficie de la célula (ensayos basados en célula) o en ensayos que con la MGAT-X1 aislada (ensayos sin células). Los diversos ensayos pueden emplear una diversidad de variantes de la MGAT-X1 (por ejemplo, MGAT-X1 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de la MGAT-X1, o una proteína de fusión que incluye toda o parte de la MGAT-X1). Además, MGAT-X1 se puede derivar de cualquier especie de
25 mamífero adecuado (por ejemplo, MGAT-X1 humana, MGAT-X1 de rata o MGAT-X1 murina). El ensayo puede ser un ensayo de unión que supone la medición directa o indirecta de la unión de un compuesto de ensayo o un ligando de la MGAT-X1 conocido a MGAT-X1. El ensayo también puede ser un ensayo de actividad que supone la medición directa o indirecta de la actividad de la MGAT-X1. El ensayo también puede ser un ensayo de expresión que supone la medición directa o indirecta del ARNm de la MGAT-X1 o proteína de la MGAT-X1. Se combinan los diversos
30 ensayos de selección con un ensayo *in vivo* que supone la medición de los efectos del compuesto de ensayo sobre los síntomas de cáncer.

En una realización, la invención proporciona ensayos para seleccionar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a o modulan la actividad de una forma unida a membrana (expresado en la superficie de la célula) de la MGAT-X1. Tales ensayos pueden emplear la MGAT-X1 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de la
35 MGAT-X1, o una proteína de fusión que incluye toda o parte de MGATX1. Como Se desvela en más detalle más adelante, se puede obtener el compuesto de ensayo mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, a partir de genotecas de compuestos convencionales. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo a unir a una forma unida a membrana de MGATX1 se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante acoplamiento del compuesto de ensayo con un radiosótomo o marca enzimática de manera que la unión de del compuesto de ensayo a la célula que expresa la
40 MGAT-X1 se puede medir detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, el compuesto de ensayo se puede marcar con .. ^{125}I , .. ^{35}S , .. ^{14}C , o .. ^3H , bien directa o indirectamente, y detectar el radioisótomo mediante conteo directo de la radioemisión o mediante conteo de centelleo. Como alternativa, el compuesto de ensayo se se puede marcar de manera enzimática con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y
45 detectar la marca enzimática mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en el producto.

En un formato de unión competitiva, el ensayo comprende poner en contacto la célula que expresa MGAT-X1 con un compuesto conocido que se une a MGAT-X1 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de
50 ensayo con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo que interactúa con la célula que expresa MGAT-X1, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo que interactúa con la célula que expresa MGAT-X1 comprende la determinación de de la capacidad del compuesto de ensayo para unirse de manera preferencial a la célula que expresa MGAT-X1 cuando se compara con el compuesto de ensayo.

En otra realización, el ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que
55 expresa una forma unida a membrana MGAT-X1 (por ejemplo, la MGAT-X1 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de la MGAT-X1, o una proteína de fusión que incluye toda o parte de la MGAT-X1) que se expresa sobre la superficie celular con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad de la forma unida a membrana de la MGAT-X1. La determinación del compuesto de ensayo para modular la actividad de la forma unida a membrana de la MGAT-X1 se
60 puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado para medir la actividad de la MGAT-X1. la actividad de un transportador se puede medir de numerosas formas, no todas las cuales son adecuadas para cualquier transferasa dada.

La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de la MGAT-X1 se puede
65 llevar a cabo, por ejemplo, determinando la capacidad de la MGAT-X1 de unirse o interactuar con una molécula diana. La molécula diana puede ser una molécula con la que se une o interactúa con la MGAT-X1 en la naturaleza, por ejemplo, una molécula sobre la superficie de una célula que expresa MGAT-X1, una molécula sobre la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada a la superficie interna de una

membrana celular o molécula citoplásmica. La molécula diana puede ser un componente de una ruta de transducción de señal que facilita la transducción de una señal extracelular (por ejemplo, una señal generada mediante la unión de un ligando de la MGAT-X1, a través de la membrana celular y en la célula. La molécula diana, puede ser, por ejemplo, una segunda proteína intracelular que tiene actividad catalítica o una proteína que facilita la asociación de las moléculas de señal cadena abajo con la MGAT-X1.

La determinación de la capacidad de la MGAT-X1 de unirse o interactuar con una molécula diana se puede llevar a cabo mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente para la determinación de la unión directa. En una realización, la determinación de la capacidad de un polipéptido de la invención de unirse o interactuar con una molécula diana se puede llevar a cabo mediante la determinación de la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana se puede determinar mediante la detección de la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detección de la actividad catalítica/enzimática de la diana sobre un sustrato apropiado, detección de la inducción de un gen indicador (por ejemplo, un elemento regulador que es sensible a un polipéptido de la invención unido de manera operativa a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, luciferasa), o detección de una respuesta celular.

La presente invención también incluye ensayos sin células. Tales ensayos implican poner en contacto una forma de la MGAT-X1 (por ejemplo, MGAT-X1 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de MGAT-X1, o una proteína de fusión que comprende toda o parte de MGAT-X1) con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a MGAT-X1. La unión del compuesto de ensayo a MGAT-X1 se puede determinar o bien directa o indirectamente como se ha descrito anteriormente. En una realización, el ensayo incluye poner en contacto la MGAT-X1 con un compuesto que se une a MGAT-X1 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con la MGAT-X1, en la que la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con la MGAT-X1 comprende la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de unirse preferentemente a MGAT-X1 cuando se compara con el compuesto conocido.

Los ensayos sin células de la presente invención son susceptibles de usarse o bien una forma unida a membrana de la MGATX1 o su fragmento soluble. En el caso de los ensayos sin células que comprenden la forma unida a membrana del polipéptido, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de manera que la forma unida a membrana del polipéptido se mantiene en solución. Los ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen pero no se limitan a detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecil-glucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton X-100, Triton X-114, Thesit, Isotridecipoli (etilen glicol éter)n, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano, (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), o sulfonato de N-dodecil=N,N-dimetil-3-ammonio-1-propano.

En diversas realizaciones de los procedimientos de ensayo anteriores, puede ser deseable inmovilizar MGAT-X1 (o una molécula diana de la MGAT-X1) para facilitar la separación de las formas que forman complejo de las no forman complejo de una o ambas de las proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a la MGAT-X1, o interacción de la MGAT-X1 con una molécula diana en la presencia y ausencia de un compuesto candidato, se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microvaloración, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que añada un dominio que permita que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) o proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa se pueden adsorber sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical; St. Louis, Mo.) o placas de microvaloración derivadas de glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y o bien la proteína diana no adsorbida o MGAT-X1, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o pocillos de la placa de microvaloración se lavan para retirar cualesquiera componentes no unidos y se mide la formación de complejo o bien directa o indirectamente, por ejemplo, como se he descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz, y el nivel de unión o actividad de la MGAT-X1 se pueden determinar usando técnicas convencionales.

Otras técnicas para la inmovilización de proteínas o matrices también se pueden usar en los ensayos de selección de la invención. Por ejemplo, o bien MGAT-X1 o su molécula Diana se puede inmovilizar utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Se puede preparar polipéptido biotinilado de la invención o moléculas diana a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, Ill.), y se inmovilizan en los pocillos de las placas recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos reactivos con la MGAT-X1 o moléculas diana pero que no interfieren con la unión del polipéptido de la invención a su molécula diana se puede derivatizar a los pocillos de la placa, y diana o polipéptido no unido de la invención atrapados en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos. Los procedimientos para detectar tales complejas, además de los descritos anteriormente para los complejos GST-inmovilizados, incluyen inmunodetección de complejos que usan anticuerpos reactivos con la MGAT-X1 o molécula diana, así como ensayos ligados a enzima que depende de la detección de una actividad enzimática asociada a la MGAT-X1 o molécula diana.

El ensayo de selección también puede implicar el control de la expresión de la MGAT-X1. Por ejemplo, se pueden identificar reguladores de la expresión de la MGAT-X1 en un procedimiento en el que una célula se pone en contacto

con un compuesto candidato y se determina la expresión de la proteína MGAT-X1 o ARNm en la célula. El nivel de expresión de la proteína de la MGAT-X1 o la expresión de ARNm en la ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato se después identificar como un regulador de expresión de la proteína MGAT-X1 o ARNm en la ausencia del compuesto candidato. Después el compuesto candidato se puede identificar como un regulador de expresión de la MGAT-X1 basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de la proteína de la MGAT-X1 o proteína de ARNm es mayor (mayor estadísticamente significativa) en la presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la proteína MGAT-X1 o expresión de ARNm. Como alternativa, cuando la expresión de la proteína de la MGAT-X1 o ARNm es menor (menor estadísticamente significativa) en la presencia del compuesto candidato en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la proteína de la MGAT-X1 o expresión de ARNm. El nivel de la proteína de MGAT-X1 o expresión de ARNm en las células se puede determinar mediante procedimientos descritos a continuación.

Ensayos de unión

Para los ensayos de unión, el compuesto de ensayo es preferiblemente una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio activo del polipéptido de transferasa de la MGAT-X1, haciendo por lo tanto el sitio de unión de ligando inaccesible al sustrato de manera que se evite la actividad biológica normal. Los ejemplos de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas de tipo péptido. Los ligandos potenciales que se unen a un polipéptido de la invención incluyen, pero no se limitan a, los ligandos naturales de la transferasa de la MGAT-X1 y análogos conocidos o derivados de los mismos.

En los ensayos de unión, o bien el compuesto de ensayo o el polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1 pueden comprender una etiqueta detectable, tal como etiqueta fluorescente, radioisotópica, quimioluminiscente, o enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa., quimioluminiscente, o etiqueta enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa. La detección de un compuesto de ensayo que se une a un polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1, se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante conteo de la radioemisión, mediante conteo de centelleo, o determinando la conversión de un sustrato apropiado para un producto detectable. Como alternativa, la unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de transferasa de MGATX1 se puede determinar sin marcar cualquiera de los interactuantes. Por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de ensayo con un polipéptido de transferasa de MGATX1. Un microfisiómetro (por ejemplo, Cytosensor™) es un instrumento que mide la la velocidad a la que una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico dirigible (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden usar como un indicador de la interacción entre un compuesto de ensayo y MGAT-X1 [Haseloff *et al.* (1988)].

La determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo de unirse a MGAT-X1 también se puede llevar a cabo una tecnología tal como Ensayos de Interacción Biomolecular a tiempo real (BIA) [McConnell *et al.* (1992), Sjolander & Urbaniczky (1991)]. BIA es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas a tiempo real, sin marcar ninguno de los intractuantes (por ejemplo, BIAcore™). Los cambios en la resonancia de plasmón de superficie (SPR) del fenómeno óptico se puede usar como una indicación de las reacciones de tiempo real entre moléculas biológicas.

Un polipéptido de tipo MGAT-X1 se puede usar como una “proteína cebo” en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos [Szabo *et al.*, (1995); Zervos *et al.* (1993); Madura *et al.* (1993); Bartel *et al.* (1993)]; documento de ESTADOS UNIDOS N° 5.283.317), para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con MGAT-X1 y modular su actividad.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consta de dominios de unión a ADN y de activación. En resumen, el ensayo utiliza dos construcciones deferentes de ADN. Por ejemplo, en una construcción, el polinucleótido que codifica MGAT-X1 se puede fusionar a un polinucleótido que codifica el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción una secuencia de ADN que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) se puede fusionar a un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si el “cebo” y las proteínas “presa” son capaces de interactuar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de unión a ADN y de activación del factor de transcripción se llevan a una proximidad estrecha. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, LacZ), que está ligado de manera operativa a un sitio regulador de la transcripción sensible al factor de transcripción. La expresión del gen indicador se puede detectar, y las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional se puede aislar y usar para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interactúa con MGAT-X1.

Puede ser deseable inmovilizar o bien la MGAT-X1 (o polinucleótido) o el compuesto de ensayo para facilitar la separación de la forma unida de la forma no unida de uno o ambos interactuantes, así como para acomodar la automatización del ensayo. De este modo, o bien el polipéptido de tipo MGAT-X1 (o polinucleótido) o el compuesto de ensayo se puede unir a un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio o plástico, placas de cultivo de tejidos, pocillos de microvaloración, tubos, procesadores de silicio, o partículas tales como perlas, (que incluyen pero no se limitan a, látex, poliestireno, o perlas de vidrio). Cualquier procedimiento conocido en la técnica se puede usar para unir el polipéptido de tipo MGAT-X1 (o polinucleótido) o compuesto de ensayo a un soporte sólido que incluye el uso de enlaces covalentes y no covalentes, absorción pasiva, o pares de restos de unión unidos respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o compuesto de ensayo y el soporte sólido. Los compuesto de ensayo se unen preferiblemente al soporte sólido en una disposición, de manera que la localización

de los compuestos de ensayo individuales se puedan rastrear. La unión de un compuesto de ensayo a la MGAT-X1 (o un polinucleótido que codifica MGAT-X1) se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microvaloración, tubos de ensayo, y tubos de microcentrifuga.

En una realización, la MGAT-X1 es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite la unión de la MGAT-X1 a un soporte sólido. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa se puede adsorber en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microvaloración derivatizadas de glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y la MGAT-X1 no adsorbida; la mezcla después se incuba en condiciones conductivas para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o pocillos de placas de microvaloración se lavan para retirar cualesquiera componentes. La unión de los interactuantes se puede determinar o bien directa o indirectamente, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar del soporte sólido antes que se determine la unión.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas o polinucleótidos sobre dicho soporte sólido se puede usar en los ensayos de selección de la invención. Por ejemplo, o bien la MGAT-X1 (o a polinucleótido que codifica la MGAT-X1) o un compuesto de ensayo se puede inmovilizar utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. La MGAT-X1 biotinilada (o un polinucleótido que codifica la MGAT-X1 biotinilada) o compuestos de ensayo se puede preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando las técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinylation, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) e inmovilizarse en los pocillos de las placas recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos que se unen de manera específica a MGAT-X1, polinucleótido, o un compuesto de ensayo, pero que no interfieren con un sitio de unión deseado, tal como el sitio activo de MGAT-X1, se puede derivatizar a los pocillos de la placa. La diana o proteína no unida puede estar atrapada en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos.

Los procedimientos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados de GST, incluyen inmunodetección de complejos que usan anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1 o compuesto de ensayo, los ensayos ligados a enzima que dependen de la detección de una actividad sobre el polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1, y electroforesis de gel SDS en condiciones no reductoras.

La selección de los compuestos de ensayo que se unen a un polipéptido de la transferasa de polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1 o polinucleótido también se puede llevar a cabo en una célula intacta. Cualquier célula que comprende un polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1 o polinucleótido se puede usar en sistema de ensayo basado en célula. Un polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1 puede ser de origen natural en la célula o se pueden introducir usando las técnicas tales como las descritas anteriormente. La unión del compuesto de ensayo a MGAT-X1 o un polinucleótido que codifica MGAT-X1 se determina como se ha descrito anteriormente.

Ensayos funcionales

Los compuestos de ensayo se pueden ensayar para determinar la capacidad de aumentar o disminuir MGAT-X1 de un polipéptido de la transferasa de la MGAT-X1. La actividad de la MGAT-X1 se puede medir, por ejemplo, usando procedimientos descritos en los ejemplos específicos, más adelante. La actividad de la MGAT-X1 se puede medir después de poner en contacto o bien MGAT-X1 purificada, una preparación de membrana celular, o una célula intacta con un compuesto de ensayo. Un compuesto de ensayo que disminuye la actividad de la MGAT-X1 en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, ó 100% se identifica como un agente potencial para disminuir la actividad de la MGAT-X1. Un compuesto de ensayo que incrementa la actividad de la MGAT-X1 en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, ó 100% se identifica para como un agente potencial para incrementar la actividad de la MGAT-X1.

Uno de tales procedimientos de selección implica el uso de melanóforos que se transfectan para expresar la MGAT-X1. Tal técnica de selección Se desvela en el documento PCT WO 92/01810 publicado el 6 de febrero de 1992. De este modo, por ejemplo, tal ensayo se puede emplear para seleccionar un compuesto que inhibe la activación del polipéptido de la transferasa de la presente invención poniendo en contacto las células de melanóforos que codifican la transferasa con tanto el ligando de transferasa y un compuesto a seleccionar. La inhibición de la señal generada por el ligando indica que un compuesto es un antagonista potencial para la transferasa, es decir inhibe la activación de la transferasa. La selección se puede emplear para identificar un compuesto que activa la transferasa poniendo en contacto tales células con compuestos a seleccionar y determinar si cada compuesto genera una señal, es decir, activa la transferasa.

Otras técnicas de selección incluyen el uso de células que expresan MGAT-X1 (por ejemplo, células CHO transfectadas) en un sistema que mide los cambios de pH extracelular provocados por la activación de transferasa [Iwabuchi *et al.* (1993)]. Por ejemplo, los compuestos se pueden poner en contacto con una célula que expresa el polipéptido de la transferasa de la presente invención y una segunda respuesta de mensajero por ejemplo, transducción de la señal o cambios de pH, se pueden medir para determinar si el compuesto potencial activa o inhibe la transferasa. Otra de tales técnicas de selección implica la introducción de ARN que codifica MGAT-X1 en oocitos de *Xenopus* para expresar de

manera transitoria la transferasa. Los oocitos de transferasa se pueden poner en contacto con un ligando de transferasa y un compuesto a seleccionar, seguido de la detección de la inhibición o activación de una señal de calcio en el caso de seleccionar compuestos que se cree que inhiben la activación de la transferasa.

5 *Expresión génica*

En otra realización, los compuestos de ensayo que incrementan o disminuyen la expresión génica de la MGAT-X1 se identifican. Como se usa en el presente documento, la frase “se correlaciona” con la expresión de un “polinucleótido” indica que la detección de la presencia de ácidos nucleicos, los mismos o relacionados con una secuencia de ácido nucleico que codifica MGAT-X1, mediante análisis de northern o PCR de tiempo real es indicativo de la presencia de ácidos nucleicos que codifican la MGAT-X1 en una muestra, y por lo tanto se correlaciona con la expresión de la transcripción a partir del polinucleótido que codifica MGAT-X1. El término “microdisposición,” como se usa en el presente documento, se refiere a una disposición de polinucleótidos u oligonucleótidos distintos dispuestos sobre un sustrato, tal como papel, nylon o cualquier otro tipo de membrana, filtro, procesador, portaobjetos de vidrio, o cualquier otro soporte sólido adecuado. Un polinucleótido de la MGAT-X1 se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se determina la expresión de un ARN o producto de polipéptido del polinucleótido de la MGAT-X1. El nivel de expresión de ARNm o polipéptido apropiado en la presencia del compuesto de ensayo se compara con el nivel de expresión de ARNm o polipéptido en la ausencia del compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo se puede después identificar como un regulador de la expresión basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de ARNm o polipéptido es mayor en la presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, el compuesto de ensayo se identifica con un estimulador o potenciador del ARNm o polipéptido es menor en la presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, el compuesto de ensayo se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm o polipéptido.

El nivel de la expresión de ARNm o polipéptido de la MGAT-X1 en las células se puede determinar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica para detectar ARNm o polipéptido. Se pueden usar cualesquiera procedimientos cualitativo o cuantitativo. La presencia de productos de polipéptidos del polinucleótido de la transferasa de la MGAT-X1 se puede determinar, por ejemplo, usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo procedimientos inmunoquímicos tal como radioinmunoensayo, transferencia de Western, e inmunoquímica. Como alternativa, la síntesis de polipéptidos se puede determinar *in vivo*, en un cultivo celular, o en un sistema de traducción *in vitro* mediante la detección de la incorporación de aminoácidos marcado en MGAT-X1.

Tal selección se puede llevar a cabo o bien en un sistema sin células o en una célula intacta. Cualquier célula que expresa el polinucleótido de MGAT-X1 se puede usar en un sistema de ensayo basado en célula. El polinucleótido de la MGAT-X1 puede ser de origen natural en la célula o se puede introducir usando las técnicas tales como los descritos anteriormente. Se puede usar un cultivo primario o una línea celular establecida.

Compuestos de ensayo

Los compuestos de ensayo adecuados para uso en los ensayos de selección se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, genotecas de compuestos convencionales. Los compuestos de ensayo también se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos planteamientos los procedimientos de genoteca combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo: genotecas biológicas; genotecas de fase sólida paralelas dirigidas especialmente o en fase de solución; procedimientos de genoteca sintéticos que requieren desconvolución; el procedimiento de genoteca “una perla un compuesto”; y procedimientos de genoteca sintética que usan selección por cromatografía de afinidad. El planteamiento de genoteca biológica se limita a genotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro planteamientos son aplicables a genotecas de péptido, oligómero no péptido o de moléculas pequeñas de compuestos [Lam *et al.* (1997)].

Los ejemplos de procedimientos para la síntesis de genotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica [Lam *et al.* (1997); DeWitt *et al.* (1993); Erb *et al.* (1994); Zuckermann *et al.* (1994); Cho *et al.* (1993); Carrell *et al.* (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059]. Las genotecas de los compuestos se pueden presentar en solución [Carrell *et al.* (1994), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; Gallop *et al.* (1994)] o sobre perlas [Houghten *et al.* (1992)], chips [Cull *et al.* (1992)], bacteria (documento de ESTADOS UNIDOS N° 5.223.409), esporas (documento de ESTADOS UNIDOS N° 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), plásmidos [Coruzzi *et al.* (1984)] o fago [Nagarenko *et al.* (1997); Felici *et al.* (1991); Cwirla *et al.* (1990); Devlin *et al.* (1990); Sambrook *et al.* (1989)].

Indicaciones y Procedimientos terapéuticos

El presente solicitante encontró que la MGAT-X1 se expresa en diferentes tejidos humanos.

Trastornos de cáncer

La MGAT-X1 humana se expresa en gran cantidad en los siguientes tejidos: tumor de colon, tumor de íleo, tumor de hígado, tumor de útero, tumor de mama, tumor de próstata. la expresión en los tejidos anteriormente mencionados y en particular la expresión diferencial entre el tumor de colon de tejido enfermo y colon de tejido sano, entre tumor de íleo de tejido enfermo y tejido sano, entre tumor de hígado de tejido enfermo e hígado de tejido sano, entre tumor de útero de tejido enfermo y útero de tejido sano, entre tumor de mama de tejido enfermo y mama de tejido sano, entre tumor de próstata de tejido enfermo y próstata de tejido sano demuestra que MGAT-X1 humana o ARNm se

puede utilizar para diagnosticar cáncer. De manera adicional la actividad de la MGAT-X1 se puede modular para tratar cáncer.

Los trastornos de cáncer dentro del ámbito de la invención comprenden cualquier enfermedad de un órgano o tejido en mamíferos caracterizados por una multiplicación escasamente controlada o no controlada de células normales o anormales en ese tejido y su efecto sobre el cuerpo como conjunto.

Las enfermedades de cáncer dentro del ámbito la invención comprenden neoplasmas benignos, displasias, hiperplasias así como neoplasmas que muestran desarrollo metastático o cualquier otras transformaciones similares por ejemplo leucoplaquias que a menudo preceden al brote de cáncer. Las células y tejidos son cancerosos cuando se desarrollan más rápidamente que las células normales, que desplazan o se extienden en el tejido sano circundante o cualesquiera otros tejidos del cuerpo descritos como crecimiento metastático, asumen las formas y tamaños anormales, muestran cambios en su relación nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, finalmente pueden cesar. Las células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como conjunto cuando provocan síndromes paraneoplásicos o si se produce cáncer dentro de un órgano o tejido vital, función normal se alterará o se detendrá, con resultados fatales posibles. La última implicación de un órgano vital por cáncer, o bien primario o metastático, puede conducir a la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a extenderse, y la extensión de su extensión se refiere usualmente a una posibilidad del individuo de sobrevivir a la enfermedad. Los cánceres en general se dice que están en una de las tres fases de crecimiento: temprana, o localizada, cuando un tumor todavía está confinada al tejido de origen, o sitio primario, extensión directa, cuando las células cancerosas del tumor han invadido el tejido adyacente o se han extendido solamente a los ganglios linfáticos regionales: o metástasis, en el que las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde el sitio primario, mediante la sangre o sistemas linfáticos, y tienen sitios secundarios establecidos de infección. El cáncer se dice que es maligno debido a su tendencia a provocar la muerte si no se trata. Los tumores benignos usualmente no provocan muerte, aunque pueden si interfieren con una función de cuerpo normal en virtud de su localización, tamaño, o efectos laterales paraneoplásicos. Por lo tanto los tumores benignos caen dentro de la definición de cáncer dentro del ámbito de la invención también. En general, las células cancerosas se dividen a una velocidad mayor que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de tejidos cancerosos y normales no es tanto la rapidez de división celular en el pasado como es la pérdida parcial o completa de restricción de crecimiento en las células cancerosas y su incapacidad para diferenciarse en un tejido útil, limitado del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento de tejido normal. Los tejidos cancerosos pueden expresar ciertos receptores moleculares y probablemente están influenciados por la susceptibilidad e inmunidad del huésped y se sabe que ciertos cánceres de la mama y próstata, por ejemplo, se consideran dependientes de hormonas específicas para su existencia. El término "cáncer" dentro del ámbito de la invención no se limita a la neoplasia benigna simple pero comprende cualquier otro tipo de neoplasia benigna y maligna 1) Carcinoma, 2) Sarcoma, 3) Carcinosarcoma, 4) Cánceres de los tejidos formadores de sangre, 5) tumores de tejidos nerviosos incluyendo el cerebro, 6) cáncer de células de piel. Cáncer de acuerdo con 1) se produce en tejidos epiteliales que cubren el exterior de cuerpo (la piel) y las membranas mucosas de recubrimiento y las estructuras cavitarias internas de los órganos por ejemplo tal como lamaza, el pulmón, los tractos respiratorio y gastrointestinal, las glándulas endocrinas, y el sistema genitourinario. Los elementos de conducto o glandulares pueden persistir en tumores epiteliales, como en tipos de adenocarcinomas, por ejemplo adenocarcinoma de tiroides, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma uterino. Los cánceres de del epitelio de las células con escarificación previa y de ciertas membranas mucosas, tal como por ejemplo, cánceres de la lengua, labio, laringe, vejiga urinaria, cuello uterino o pene, se pueden calificar como carcinomas de de la epidermis o de células escamosas de los tejidos respectivos y están dentro del ámbito de la definición de cáncer también. El cáncer de cuerdo con 2) se desarrolla en tejidos conectivos, incluyendo tejidos fibrosos, tejidos adiposos (grasa), músculo, vasos sanguíneos, hueso, y de cartílago como por ejemplo sarcoma osteogénica; liposarcoma, fibrosarcoma, carcomo sinovial. El cáncer de acuerdo a 3) es cáncer que se desarrolla en tejido tanto epitelial como conectivo. La enfermedad de cáncer dentro del ámbito de esta definición puede ser primario o secundario, en el que primario indica que el cáncer originado en el tejido donde se encuentra en lugar que se establezca como un sitio secundario mediante metástasis a partir de otra lesión. Los cánceres y enfermedades tumorales dentro del ámbito de esta definición pueden ser benignos o malignos y pueden afectar a todas las estructuras anatómicas del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo pero sin limitación comprenden cánceres y enfermedades tumorales de I) la médula ósea y células derivadas de médula ósea (leucemia), II) las glándulas endocrinas y exocrinas como por ejemplo, tiroides, paratiroides, pituitaria, glándulas adrenales, glándulas salivares, páncreas III) la mama, por ejemplo tumores benignos o malignos en las glándulas mamarias de o bien un macho o hembra, los conductos mamarios, adenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma comedo, enfermedad de Páger del pezón, carcinoma inflamatoria de la mujer joven, IV) el pulmón, V) el estómago, VI) el hígado y el bazo, VII) el intestino delgado, VIII) el colon, IX) el hueso y sus tejidos de soporte y conectivo como tumor de hueso maligno o benigno, por ejemplo sarcoma osteogénico maligno, osteoma benigno, tumores de cartílagos; como condrosarcoma maligno o condroma benigno; tumores de médula ósea como mieloma maligno o granuloma eosinófilo benigno, así como tumores metastáticos de tejidos óseos en otros lugares del cuerpo; X) la boca, garganta, laringe, y el esófago XI) la vejiga urinaria y los órganos y estructuras internos y externos del sistema urogenital de macho y hembra como ovarios, útero, cuello del útero, testículos, y glándula de la próstata, XII) la próstata, XIII) el páncreas, como carcinoma de los conductos del páncreas; XIV) el tejido linfático como linfomas y otros tumores de origen linfoide, XV) la piel, XVI) cánceres y enfermedades tumorales de las estructuras anatómicas que pertenecen a la respiración y los sistemas respiratorios que incluyen músculos y revestimientos torácicos, XVII) cáncer primario y secundario de los ganglios linfáticos XVIII) la lengua y las estructuras óseas del paladar duro o sinusitis, XIX) la boca, mejillas, cuello y glándulas salivares, XX) los vasos sanguíneos que incluyen el corazón y los revestimientos, XXI) los músculos lisos o esqueléticos y los ligamentos y los revestimientos, XXII) el sistema nervioso periférico, autónomo, central que incluye cerebelo, XXIII) el tejido adiposo.

Aplicaciones

La presente invención proporciona procedimientos tanto profilácticos como terapéuticos para el cáncer.

5 El procedimiento regulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de la MGAT-X1. Un agente que modula la actividad puede ser un agente como se ha descrito en el presente documento, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando afín de origen natural del polipéptido, un péptido, un peptidomimético, o cualquier molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más de las actividades biológicas de la MGAT-X1. Los ejemplos tales agentes estimuladores incluyen las moléculas de MGAT-
10 X1 y de ácido nucleico activas que codifican una parte de la MGAT-X1. En otra realización, el agente una o más de las actividades biológicas de la MGAT-X1. Los ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico no codificantes y anticuerpos. Estos procedimientos reguladores de se pueden realizar *in vitro* (por ejemplo, mediante cultivo de la célula con el agente) o, como alternativa, *in vivo* (por ejemplo, mediante la administración del agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de un individuo
15 aquejado con una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión no deseada de la actividad de la MGAT-X1 o una proteína en la ruta de señalización de la MGAT-X1. En una realización, el procedimiento implica la administración de un agente como cualquier agente identificado o que es identificable mediante un ensayo de selección como Se desvela en el presente documento, o combinación de tales agentes que se dice que modulan hacia arriba o hacia abajo la expresión o actividad de MGAT-X1 o de cualquier proteína en la ruta de señalización de la MGAT-X1. En otra
20 realización, el procedimiento implica la administración de un regulador de la MGAT-X1 como terapia para compensar la expresión o actividad reducida o no deseable de la MGAT-X1 o una proteína en la ruta de señalización de MGAT-X1.

La estimulación o expresión de la MGAT-X1 es deseable en las situaciones en las que la actividad o expresión
25 es anormalmente baja y en la que la actividad incrementada es probablemente que tenga un efecto beneficioso. De manera inversa, la inhibición de la actividad o expresión de la MGAT-X1 es deseable en las situaciones en las que la actividad o expresión de la MGAT-X1 es anormalmente alta y en la que la disminución de su actividad es probable que tenga un efecto beneficioso.

30 Esta invención además se ilustra por los siguientes ejemplos que no se deben construir considerar como limitantes.

Composiciones farmacéuticas

Esta invención además pertenece a agentes novedosos identificados por los ensayos de selección anteriormente
35 descritos y usos de de los mismos para los tratamientos como se ha descrito en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, y anticuerpos (también denominadas en el presente documento como “compuestos activos”) de la invención se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo y
40 vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento la frase “vehículo farmacéuticamente aceptable” pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conocen bien en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto
45 activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones.

La invención incluye el uso de un oligonucleótido no codificante, un anticuerpo, o una ribozima, que específicamente regula hacia abajo la actividad de la SEQ ID NO: 2 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de cáncer en un mamífero, así como procedimientos para preparar tales composiciones combinando uno o más de tales
50 reguladores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un antagonista de la MGAT-X1 se puede producir usando procedimientos que en general se conocen en la técnica. En particular, la MGAT-X1 purificada se puede usar para producir anticuerpos o para seleccionar genotecas de agentes farmacéuticos para identificar los que se unen específicamente a MGAT-X1. Los anticuerpos para la MGAT-
55 X1 también se pueden generar usando procedimientos que se conocen bien en la técnica. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de una sola cadena, fragmentos Fab, y fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab. Los anticuerpos neutralizantes como aquellos que inhiben la formación de dímeros se prefieren de manera especial para uso terapéutico.

60 En otra realización de la invención, los polinucleótidos que codifican la MGAT-X1, o cualquier fragmento o complemento de los mismos, se puede usar para propósitos terapéuticos. En un aspecto, el complemento del polinucleótido que codifica la MGAT-X1 se puede usar en las situaciones en las que deben ser deseables que bloqueen la transcripción del ARNm. En particular, las células se pueden transformar con secuencias complementarias a los polinucleótidos que codifican MGAT-X1. De este modo, se pueden usar moléculas o fragmentos complementarios para modular la
65 actividad de la MGAT-X1, o para lograr la regulación de la función génica. Tal tecnología se conoce ahora bien en la técnica, y los oligonucleótidos codificantes y no codificantes o fragmentos mayores se pueden diseñar a partir de diversas localizaciones junto con las regiones codificantes o de control de las secuencias que codifican MGAT-X1.

Los vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, o virus herpes o vaccinia, o a partir de diversos plásmidos bacterianos, se pueden usar para la administración de secuencias de nucleótidos al órgano, tejido, o población de células dianas. Los procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores que expresarán la secuencia de ácido nucleico complementaria con los polinucleótidos del gen que codifica MGAT-X1. checklit: Estas técnicas se desvelan, por ejemplo, en [Scott y Smith (1990) Science 249: 386 - 390].

Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos anteriormente se pueden aplicar a cualquier sujeto en necesidad de tal terapia, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y lo más preferiblemente, seres humanos.

Una realización adicional de la invención se refiere a la administración de una composición farmacéutica que contiene MGAT-junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos descritos anteriormente. Tales composiciones farmacéuticas pueden constar de la MGAT-X1, y anticuerpos para la MGAT-X1. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que se pueden administrar en cualquier vehículo farmacéutico estéril, biocompatible que incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solos, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía propuesta de administración. Los ejemplos de las vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, la administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites estables, polietilén glicoles, glicerina, propilén glicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parental se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF; Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluido hasta el grado de que sea fácilmente administrado por jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable como glicerol, propilén glicol, polietilén glicol líquido, y sus mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso del uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de del tamaño de partícula deseado en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo aproximadamente mediante la inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (por ejemplo, a polipéptido o anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido de la esterilización por filtración. En general, la dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada estéril del mismo.

Las composiciones orales en general incluyen un diluyente inerte o vehículo comestible. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina o en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en la forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para uso como un enjuague de boca, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se hace crujir y se expectora o se ingiere.

Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguiente ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar; un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, in agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como pipermin, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran en la forma de una pulverización por aerosol a partir de un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

5 La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para que penetre la barrera. Tales penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede llevar a cabo mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos
10 se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como en general se conocen en la técnica.

Los compuestos también se preparan en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal. Los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo,
15 tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhidruros, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a partir de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstos se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se desvela en el documento de Estados Unidos N° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en una forma de dosificación unitaria para la administración fácil y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas para las dosificaciones adecuadas para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se disponen y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el
30 efecto terapéutico particular a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinación tal como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Diagnóstico

35 En otra realización de la invención, los polinucleótidos que codifican MGAT-X1 se pueden usar para propósitos de diagnóstico. Los polinucleótidos que se pueden usar incluyen secuencias de oligonucleótidos, moléculas de ARN y ADN complementarias, y PNA. Los polinucleótidos se pueden usar para detectar la expresión génica cuantitativa en tejidos de biopsia en los que la expresión de MGAT-X1 puede estar correlacionada con la enfermedad. El ensayo de diagnóstico. El ensayo de diagnóstico se puede usar para distinguir entre ausencia, presencia, y exceso de la expresión de la MGAT-X1, y para controlar la regulación de los niveles de la MGAT-X1 durante la intervención terapéutica.
40

Las secuencias de polinucleótidos que codifican la MGAT-X1 se pueden usar para la diagnosis de un cáncer, asociado a la expresión de la MGAT-X1. Las secuencias de polinucleótidos que codifica la MGAT-X1 se puede usar en análisis de Southern-, Northern-, o de transferencia por puntos, u otras tecnologías basadas en membrana; en las tecnologías de PCR; en ensayos de varilla aforadora, alfiler, y ELISA; y en microdisposiciones que utilizan fluidos o tejidos de biopsias de pacientes para detectar la expresión de la MGAT-X1 alterada. Tales procedimientos cualitativos o cuantitativos se conocen bien en la técnica.
45

En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos que codifican la MGAT-X1 pueden ser útiles en los ensayos que detectan la presencia de trastornos asociados, particularmente los mencionados anteriormente. Las secuencias de nucleótidos que codifican la MGAT-X1 se pueden marcar mediante procedimientos convencionales y añadirse a una muestra de fluido o tejido de un paciente en las condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un período de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y se compara con un valor patrón. Si la cantidad de señal en la muestra del paciente está alterada de manera significativa de la muestra de control comparable, las secuencias de nucleótidos se han hibridado con las secuencias de nucleótidos en la muestra, y la presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican MGAT-X1 en la muestra indica la presencia del trastorno asociado. Tales ensayos también se pueden usar para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico en los estudios animales, en ensayos clínicos, o en el control del tratamiento de un paciente individual.
50

Con el fin de proporcionar una base para la diagnosis de cáncer, asociado a la expresión de la MGAT-X1, se establece un perfil normal o patrón para la expresión. Esto se puede llevar a cabo combinando fluidos corporales o extractos de células tomados de los sujetos normales, o bien animales o humanos, con una secuencia, o un fragmento de los mismos, que codifican la MGAT-X1, en las condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación convencional se puede cuantificar comparando los valores obtenidos de sujetos normales con valores de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores convencionales o sintomáticos de muestras normales se pueden comparar con los valores obtenidos de las muestras de pacientes que son sintomáticos de un trastorno. La desviación de los valores convencionales se usa para establecer la presencia de un trastorno.
60

Otra técnica para la selección de fármacos que se puede usar proporciona un alto rendimiento de selección de los compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a la proteína de interés como se desvela en la solicitud PCT publicada WO84/03564. En este procedimiento, se sintetizan un gran número de compuestos de ensayo pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con la MGAT-X1, o sus fragmentos, y se lavan. La MGATX1 unida después se detecta mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La MGAT-X1 purificada también se puede recubrir directamente sobre placas para uso en las técnicas de selección de fármaco anteriormente mencionadas. Como alternativa, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Se pueden usar ensayos de selección competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a la MGATX1 compiten de manera específica con un compuesto de ensayo para unirse a la MGAT-X1. De esta manera, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antígenicos con la MGAT-X1.

Las transferasas son ubicuas en el huésped mamífero y son responsables de muchas funciones biológicas, incluyendo muchas patologías: de acuerdo con lo anterior, es deseable encontrar compuestos y fármacos que estimulan la actividad de las transferasas por una parte y que pueden inhibir la función de una transferasa por otra parte.

Determinación de una dosis terapéuticamente eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está también dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo que incrementa o disminuye la actividad de la MGAT-X1 con relación a la actividad de la MGAT-X1 que se produce en la ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o bien en los ensayos de cultivo o en modelos animales, usualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Después tal información se puede usar para determinar las dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

La eficacia y toxicidad terapéutica, por ejemplo, DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz al 50% de la población) y DL_{50} (la dosis letal al 50% de la población), se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células o animales experimentales. La relación de dosis de efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos de células y estudios animales se usa en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en tales composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, sensibilidad del paciente, y la vía de administración. La dosificación exacta se determinará por el facultativo, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar los niveles suficientes del ingrediente activo o APRA mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, salud general del sujeto, edad, peso, y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación (es) de fármaco, sensibilidades a la reacción, y tolerancia 7 respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de larga duración se pueden administrar cada 3 o 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y velocidad de eliminación de la formulación particular.

Las cantidades de dosificación normales pueden variar entre 0,1 microgramos y 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente de 1 g, dependiendo de la vía de administración. La guía para las dosificaciones y procedimientos particulares de distribución se proporciona en la bibliografía y en general disponibles para los facultativos. Los expertos en la técnica emplean diferentes formulaciones para los nucleótidos que para las proteínas o sus inhibidores. De manera similar, la distribución de polinucleótidos o polipéptidos será específica para las células, condiciones, localizaciones, etc. Si el reactivo es un anticuerpo de una sola cadena, los polinucleótidos que codifican el anticuerpo se pueden construir e introducir en una célula o bien *in vivo* usando las técnicas bien conocidas incluyendo, pero sin limitación, transferencia de ADN mediada por transferina - polication, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de perlas de látex cubiertas por ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación, "pistola génica," y transfección mediada por DEAE- o fosfato de calcio.

Si el producto de expresión es ARNm, el reactivo es preferiblemente un oligonucleótido no codificante o una ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos no codificante o ribozimas se pueden introducir en las células mediante procedimientos, como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, un reactivo reduce la expresión del gen de la MGAT-X1 o la actividad de la MGAT-X1 en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% con relación a la ausencia del reactivo. La eficacia del mecanismo elegido para disminuir el nivel de expresión del gen de la MGAT-X1 o la actividad de la MGAT-X1 se puede establecer usando los procedimientos bien conocidos en la técnica, tal como hibridación de sondas de nucleótidos para el ARNm específico de MGATX1, RT-PCR cuantitativa, detección inmunológica de la MGAT-X1, o medición de la actividad de la MGAT-X1.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos apropiados. La selección de los agentes apropiados para uso en la terapia de combinación se puede realizar por los expertos en la técnica, de acuerdo con los principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar de manera sinérgica para efectuar el tratamiento o prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Usando este planteamiento, se puede ser capaz de lograr la eficacia terapéutica con dosificaciones inferiores de cada agente, reduciendo de esta manera el potencial de efectos secundarios adversos. Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos anteriormente se pueden aplicar a cualquier sujeto en necesidad de tal terapia, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y lo más preferiblemente, seres humanos.

Las moléculas de ácido nucleico usadas en la invención son las moléculas de ácido nucleico que están contenidas en un grupo de moléculas de ácido nucleico que constan de (i) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, (ii) moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1, (iii) moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 1, (iv) moléculas de ácido nucleico cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico de (i), (ii), o (iii); y (v) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético, en el que el polipéptido codificado por dicha molécula de ácido nucleico tiene la actividad de la MGAT-X1.

Los polipéptidos usados en la invención son los polipéptidos que están contenidos en un grupo de polipéptidos que constan de (i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 2, (ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 2, (iii) polipéptidos codificados por moléculas de ácido nucleico de la invención y (iv) polipéptidos que muestran al menos 99%, 98%, 95%, 90%, ó 80% de homología con un polipéptido de (i), (ii), o (iii), en el que dicho polipéptido purificado tiene la actividad de la MGAT-X1.

Se desvela un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

Se desvela una célula huésped que contiene un vector de la invención. Se desvela un procedimiento de producción de una MGAT-X1 que comprende las etapas de (i) cultivar una célula huésped de la invención en las condiciones adecuadas y (ii) recuperar la MGAT-X1 del medio de cultivo.

Se desvela un procedimiento para la detección de un polinucleótido que codifica una MGAT-X1 en una muestra que comprende las etapas de (i) hibridar un polinucleótido de la invención al material de ácido nucleico de la muestra, formando por lo tanto un complejo de hibridación; y (ii) detectar dicho complejo de hibridación.

Se desvela un procedimiento para la detección de un polinucleótido que codifica una MGAT-X1 en una muestra que comprende las etapas de (i) hibridar un polinucleótido de la invención a material de ácido nucleico de la muestra, formando por lo tanto un complejo de hibridación; y (ii) detectar dicho complejo de hibridación, en el que antes de la hibridación, el material de ácido nucleico de la muestra se amplifica.

Se desvela un procedimiento para la detección de un polinucleótido de la invención o un polipéptido de la invención que comprende las etapas de (i) poner en contacto una muestra con un reactivo que específicamente interactúa con un polinucleótido de la invención o un polipéptido de la invención, y (ii) detectar dicha interacción.

Los reguladores de una proteína dada, dentro del significado de la invención, se entienden por ser compuestos que alteran o bien directa o indirectamente la actividad de una proteína dada o bien *in vivo* o *in vitro*. La alteración de la actividad puede ser, por ejemplo, pero sin limitación a, mediante efectos alostéricos o mediante afectación de la expresión de la proteína dada.

Otros objetos de la invención son los procedimientos para seleccionar reguladores de la actividad de la acilglicerol aciltransferasa de una MGAT-X1 que comprende las etapas de (i) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la invención, (ii) detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a dicho polipéptido de la invención, en el que el compuesto de ensayos que se unen en (ii) se identifican como reguladores potenciales de la actividad de la MGAT-X1.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que la etapa de contacto está en o en la superficie de una célula.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que la etapa de contacto está en o en la superficie de una célula en el que la célula está *in vitro*.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que la etapa de contacto está en un sistema libre de células.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que el polipéptido de la invención está acoplado a una marca detectable.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que el compuesto está acoplado a una marca detectable.

Se desvelan procedimientos de lo anterior, en los que el compuesto de ensayo desplaza un ligando que primero se une al polipéptido.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que el polipéptido de la invención está unido a un soporte sólido.

Otros objetos de la invención son procedimientos de lo anterior, en los que el compuesto está unido a un soporte sólido.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la actividad de una MGAT-X1 que comprende las etapas de

(i) medir la actividad de un polipéptido de la invención a una cierta concentración de un compuesto de ensayo o en la ausencia de dicho compuesto de ensayo, (ii) medir la actividad de dicho polipéptido a una concentración diferente de dicho compuesto de ensayo, en el que dicho compuesto de ensayo se identifica como un regulador de la actividad de una MGAT-X1 cuando existe una diferencia significativa entre las actividades medidas en (i) y (ii).

Se desvela un procedimiento de selección de reguladores de la actividad de una MGAT-X1 que comprende las etapas de (i) medir la actividad de un polipéptido de la invención a una cierta concentración de un compuesto de ensayo, (ii) medir la actividad de un polipéptido de la invención en la presencia de un compuesto conocido que es regulador de la MGAT-X1. Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la actividad de una MGAT-X1 que comprende los procedimientos anteriormente mencionados, en los que se miden las actividades en una célula. Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la actividad de una MGAT-X1 que comprende los procedimientos anteriormente mencionados, en el que la célula está *in vitro*.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la actividad de a MGAT-X1 que comprende los procedimientos anteriormente mencionados, en los que las actividades se miden en un sistema sin células.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la MGAT-X1 que comprende las etapas de (i).

Poner en contacto un compuesto de ensayo con una molécula de ácido nucleico de la invención, (ii) detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a dicha molécula de ácido nucleico, en el que dicho compuesto de ensayo se identifica como un regulador potencial de la MGAT-X1 cuando se une a dicha molécula de ácido nucleico.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la MGAT-X1 que comprende las etapas de (i) poner en contacto un compuesto de ensayo con una molécula de ácido nucleico de la invención, en el que la molécula de ácido nucleico es un ARN (ii) detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a dicha molécula de ARN, en el que dicho compuesto de ensayo se identifica como un regulador potencial de MGAT-X1 cuando se une a dicha molécula de ARN.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de selección de reguladores de la MGAT-X1 que comprende las etapas de poner en contacto un compuesto de ensayo con una molécula de ácido nucleico de la invención, detecta la unión de dicho compuesto de ensayo a dicha molécula de ácido nucleico, en el que dicho compuesto de ensayo se identifica como un regulador potencial de la MGAT-X1 cuando se une a dicha molécula de ácido nucleico, en el que la etapa de contacto es (i) en o en la superficie de una célula o (ii) en un sistema sin células o en el que (iii) el polipéptido o molécula de ácido nucleico está acoplado a una marca detectable o en el que (iv) el compuesto de ensayo está acoplado a una marca detectable.

Otro objeto de la invención es a procedimiento de regular la actividad de MGAT-X1 en el que MGAT-X1 se pone en contacto con un regulador de la MGAT-X1.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de diagnóstico de cáncer en un mamífero enfermo que comprende las etapas de (i) medir la cantidad de una molécula de ácido nucleico de la invención en una muestra tomada de dicho mamífero enfermo, (ii) comparar los resultados de (i) a la cantidad de dicha molécula de ácido nucleico en uno o varios mamíferos sanos, en el que cáncer se diagnostica en el mamífero enfermo cuando la cantidad de dicha molécula de ácido nucleico en el mamífero enfermo es significativamente diferentes de la cantidad de molécula de ácido nucleico en el mamífero/mamíferos sano (s).

Se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden (i) una molécula de ácido nucleico de la invención, (ii) un vector de la invención, o (iii) un polipéptido de la invención.

Se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden un regulador identificado por procedimientos de la invención para el tratamiento de cáncer, en un mamífero.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un oligonucleótido no codificante, un anticuerpo, o una ribozima, que específicamente regula hacia abajo la actividad de la SEQ ID NO: 2 y el uso de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2 para la preparación de las composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de cáncer, en un mamífero.

Se desvelan procedimientos para la preparación de las composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de cáncer, en un mamífero que comprende las etapas de (i) identificar un regulador de la MGAT-X1 mediante cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados, (ii) determinar si dicho regulador mejora los síntomas de cáncer, en un mamífero, (iii) combinar dicho regulador con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, o una ribozima, que regulan a la baja específicamente la actividad de SEQ ID NO: 2 y el uso de un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 2.

Los ejemplos más adelante se proporcionan para ilustrar la invención sujeto. Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se incluyen con el propósito de limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Investigación de secuencias de homólogos en las bases de datos de secuencias públicas

El grado de homología se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Los procedimientos preferidos para determinar la homología se diseñan para proporcionar la concordancia mayor entre las secuencias ensayadas. Los procedimientos para determinar la homología están recopilados en los programas de ordenador disponibles públicamente tales como BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA. Los programas BLAST están disponibles públicamente a partir de NCBI I otras fuentes en Internet.

Para MGAT-X1 se identificaron los siguientes aciertos para las secuencias conocidas mediante el uso del algoritmo BLAST [Altschul *et al.* (1997)] y el siguiente conjunto de parámetros: matriz = BLOSUM62 y el filtro de complejidad baja. Se investigaron las siguientes bases de datos: NCBI (base de datos no redundante) y base de datos de patente DERWENT (Geneseq). Se encontraron los siguientes aciertos:

>gb|AC128661.3| *Mus musculus* cromosoma 7 clon RP24-567N23,

longitud de secuencia completa = 421625747, Puntuación = 1602 bits (833), Previsión = 0,0, Identities = 833/833 (100%)

>gb|BC039181.1| *Homo sapiens*, Similar a diacilglicerol O-aciltransferasa 2, clon IMAGE: 4746146, ARNm

Longitud = 1152, Puntuación = 1594 bits (829), Previsión = 0,0, Identities = 831/832 (99%)

>NA2002: AAD46546 y 46546 diacilglicerol aciltransferasa Humana (DGAT) homólogo 2 alfa, DC3 ADNc. 1/2003

Longitud = 1240, Puntuación = 1075 bits (559), Previsión = 0,0, Identities = 559/559 (100%)

>ref|XM_228568.1| *Rattus norvegicus* similar a bA351K23.5 (proteína novedosa) [Homosapiens] (LOC302423), ARNm

Longitud = 966, Puntuación = 990 bits (515), Previsión = 0,0, Identities = 779/911 (85%)

>ref|XM_141972.1| *Mus musculus* similar a diacilglicerol O-aciltransferasa homólogo 2; GS1999full [*Homo sapiens*] (LOC245533), ARNm

Longitud = 972, Puntuación = 913 bits (475), Previsión = 0,0, Identities = 695/805 (86%)

>emb|AL357752.19| Secuencia de ADN humano del clon RP13-26D14 sobre el cromosoma Xq13.2-21.1, secuencia completa

Longitud = 178868, Puntuación = 498 bits (259), Previsión = e-138, Identities = 259/259 (100%)

ES 2 313 055 T3

>NA2002: AAD46545 Aad46545 diacilglicerol aciltransferasa de ratón (DGAT) homólogo 2 alfa, DC3 ADNc. 1/2003

Longitud = 435, Puntuación = 448 bits (233), Previsión = e-123, Identities = 364/430 (84%)

>NA2000: AAZ60386 Aaz60386 A diacilglicerol acil transferasa etiqueta de la secuencia expresada relacionada. 5/2000

Longitud = 375, Puntuación = 335 bits (174), Previsión = 3e-89, Identities = 305/371 (82%)

>dbj|BD218492.1| proteínas de la Diacilglicerol acil transferasa

Longitud = 375, Puntuación = 335 bits (174), Previsión = 3e-89, Identities = 305/371 (82%)

>emb|AL671299.18| Secuencia de ADN de ratón del clon RP23-281K21 sobre el cromosoma X, secuencia completa

Longitud = 214997, Puntuación = 304 bits (158), Previsión = 6e-80, Identities = 192/209 (91%)

>gb|AC091784.8| Secuencia genómica para *Mus musculus*, clon RP23- 213D23, secuencia completa

Longitud = 215410, Puntuación = 304 bits (158), Previsión = 6e-80, Identities = 192/209 (91%)

>ref|XM__228583.1| *Rattus norvegicus* similar a bA351K23.5 (proteína novedosa) [*Homo sapiens*] (LOC302425), ARNm

Longitud = 903, Puntuación = 123 bits (64), Previsión = 2e-25, Identities = 122/151 (80%)

>NA2002: _AAD46547 Aad46547 diacilglicerol aciltransferasa humana (DGAT) homólogo 2 alfa, DC4 ADNc. 1/2003

Longitud = 1872, Puntuación = 116 bits (60), Previsión = 3e-23, Identities = 114/141 (80%)

>NA2001A: _ABA18912 Aab18912 polinucleótido relacionado con el sistema nervioso humano SEQ ID NO 11243. 1/2002

Longitud = 3527, Puntuación = 116 bits (60), Expect - 3e-23, Identities = 114/141 (80%).

Ejemplo 2

Perfil de expresión

Se aisló ARN total celular a partir células mediante uno de dos procedimientos convencionales: 1) centrifugación en gradiente de densidad de isotiocianato de guanidina/cloruro de cesio [Kellogg *et al.* (1990)]; o con el protocolo de Tri-Reagent de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). El ARN total preparado por el protocolo de Tri-reagent se trató con ADNasa I para retirar la contaminación de ADN genómica.

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de la MGAT-X1 humana, el ARN total de cada fuente celular o de tejido primero se transcribió de manera inversa. 85 µg de ARN total se transcribió de manera inversa usando 1 µmol de cebadores de hexámeros al azar, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Qiagen, Hilden, Alemania), 3000 U RnaseQut (Invitrogen, Groningen, Holanda) en un volumen final de 680 µl. El tampón de síntesis de la primera hebra y transcriptasa inversa Omniscript (2 u/µl) eran de (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos y se enfrió sobre hielo. El volumen se ajustó hasta 6800 µl con agua, produciendo una concentración final de 12.5 ng/µl de ARN de de partida.

Para la cuantificación relativa de la distribución del ARNm de la MGAT-X1 humano en las células y tejidos se usó el Sistema de Detección de Secuencias de Applied Biosystems 7900HT de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se establecieron para cuantificar la MGAT-X1 humana y los genes controladores positivos de expresión HPRT (hipoxantina fosforibosiltransferasa), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), β-actina, y otros. Los cebadores directos e inversos y sondas para la MGAT-X1 humana se diseñaron usando el software Perkin Elmer ABI Primer Express™ y se sintetizaron mediante TibMolBiol (Berlin, Alemania). La secuencia del cebador directo de la MGAT-X1 humana era: Cebador 1 (SE Q ID NO: 3). La secuencia

ES 2 313 055 T3

del cebador inverso de la MGAT-X1 humana era Cebador 2 (SEQ ID NO: 5). Sonda 1 (SEQ ID NO: 4), marcada con FAM (carboxifluoresceína succinimidil éster) como el tinte indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como el inactivador, se usa como una sonda para la proteína de tipo UST3 1. Se prepararon los siguientes reactivos en un total de 25 μ l: tampón A 1x TaqMan, 5,5 mM $MgCl_2$, 200 nM de dATP, dCTP, dGTP, y dUTP, 0,025 U/ μ l AmpliTaq Gold™, 0,01 U/ μ l AmpErase y Sonda 1 (SEQ ID NO: 4), cebadores directo e inverso de la MGAT-X1 humana cada uno a 200 nM, 200 nM, MGAT-X1 humana sonda marcada con FAM/TAMRA-, y 5 μ l de ADNc de molde. Los parámetros de ciclación térmica eran 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 1 min.

Cálculo de los valores corregidos de CT

El valor de CT (ciclo de umbral) se calcula como se describe en la sección de “Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos”. El valor de CF - (factor para la corrección del ciclo umbral) se calcula como sigue:

1. Se establecieron las reacciones de la PCR para cuantificar los genes controladores positivos de la expresión (HKG) para cada muestra de ADNc.
2. Los valores de CT_{HKG} - (ciclo umbral del gen controlador positivos de la expresión) se calcularon como se ha descrito en la sección “Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos”.
3. Se calculan los valores medios de CT (valor medio de CT de los HKG ensayados sobre uno de los ADNc) de todos los HKG para cada ADNc
(n = número de HKG):
$$\text{Valor medio de } CT_{HKG-n} = (\text{valor de } CT_{HKG1} + \text{valor de } CT_{HKG2} + \dots \text{valor de } CT_{HKG-n})/n$$
4. Valor medio de CT_{panel} (valor medio de CT de todos los HKG en todos los ADNc ensayados) (valor medio de $CT_{HKG1} + \text{valor medio de } CT_{HKG2} + \dots + \text{valor medio de } CT_{HKG-y}$)/y (y = número de ADNc)
5. CF_{ADNc-n} (factor de corrección para ADNc n) = valor medio de CT_{panel} - valor medio de CT_{HKG-n}
6. CT_{ADNc-n} (valor medio de CT del gen ensayado para el ADNc n) + CF_{ADNc-n} (factor de corrección para ADNc n) = $CT_{cor-ADNc-n}$
valor de CT corregido para un gen de ADNc n).

Cálculo de expresión relativa

Definición: el valor mayor de $CT_{cor-ADNc-n} \neq 40$ se define como $CT_{cor-ADNc}$ [alto]

Expresión relativa = $2^{(CT_{cor-ADNc}[\text{alto}] - CT_{cor-ADNc-n})}$.

(Tabla pasa a página siguiente)

Perfil de expresión

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Expresión relativa de la MGAT-X1 en diversos tejidos humanos

	Tejido	Expresión Relativa
	Corazón fetal	1
	corazón	1
15	corazón	484
	pericardio	101
	corazón aurícula (derecho)	17
20	corazón aurícula (derecho)	1
	corazón aurícula (izquierdo)	24
	corazón aurícula (izquierdo)	1
25	corazón ventrículo (izquierdo)	1
	corazón ventrículo (derecho)	1
30	corazón ápice	17
	Fibras Purkinje	20
	septo interventricular	20
35	aorta fetal	96
	aorta	30
	aorta	3
40	aorta	1
	válvula de aorta	106
	arteria	96
45	arteria coronaria	3
	arteria coronaria	32
	arteria coronaria	1
50	arteria pulmonar	40
	arteria carótida	11
55	arteria mesentérica	24
	arteria radialis	1
	vena	149
60	válvula pulmonary	1585
	vena (safena magna)	56

ES 2 313 055 T3

	vena (cava)	11
	células endoteliales de la arteria coronaria	137
5	músculo liso de la arteria coronaria	3
	células del músculo liso de la arteria aorta	2
	músculo liso de arteria muscular	7
10	células endoteliales de la aorta	28
	células HUVEC	5
15	células endoteliales de la arteria pulmonar	2
	células endoteliales de la arteria ilíaca	12
	piel	1771
20	glándula adrenal	9
	tiroides	30
	tumor de tiroides	27
25	páncreas	1
	cirrosis de pancreas y hepática	9
	esófago	7
30	tumor de esófago	4
	estómago	21
35	tumor de estómago	17
	colon	20
	tumor de colon	101
40	intestino delgado	21
	íleo	198
	tumor de íleo	24
45	inflamación crónica del íleo	80
	recto	247
	tumor de recto	1
50	hígado fetal	19
	hígado	19
	hígado	1
55	cirrosis de hígado	63
	enfermedad de lupus de hígado	1
60	tumor de hígado	676
	células HEP G2	67
	leucocitos (sangre periférica)	6
65		

ES 2 313 055 T3

	Jurkat (células T)	53
5	Raji (células B)	1
	Medulla ósea	2
	Eritrocitos	1209
10	Ganglio linfático	16
	Timo	28
	trombocitos	446
15	células estromales de la medula ósea	29
	células CD71+ de la medula ósea	1136
	células CD33+ de la medula ósea	765
20	célula CD34+ de la medula ósea	600
	célula CD15+ de la medula ósea	534
25	células CD71+ sanguíneas del cordón	671
	células CD34+ sanguíneas del cordón	471
	neutrófilos de la sangre del cordón	405
30	células T de sangre periférica CD4+	867
	células T de sangre periférica CD8+	6081
	monocitos de la sangre periférica	1121
35	células B de la sangre periférica	8422
	neutrófilos de sangre periférica	138
	bazo	25
40	cirrosis de bazo hígado	6
	músculo esquelético	19
	cartílago	333
45	tejido conectivo de hueso	133
	adiposo	4153
50	cerebro	37
	cerebelo	8
	corteza cerebral	124
55	lóbulo frontal	103
	lóbulo occipital	74
	lóbulo parietal	33
60	lóbulo temporal	55
	sustantia nigra	111
65	caudatum	221

ES 2 313 055 T3

	cuerpo calloso	138
5	nucleus accumbens	128
	putamen	49
	hipocampo	111
10	tálamo	11
	tálamo posteroventral	388
	tálamo dorsalmedial	471
15	hipotálamo	234
	ganglio de la raíz dorsal	36
	médula espinal	38
20	médula espinal (asta ventral)	491
	médula espinal (asta dorsal)	568
25	células H4 de tumor glial	20
	células de progenitor neural	304
	astrocitos	63
30	retina	534
	pulmón fetal	32
	fibroblasto IMR-90 de pulmón fetal	4
35	fibroblasto MRC-5 de pulmón fetal	3
	pulmón	3
	pulmón	6
40	pulmón	1
	lóbulo superior derecho de pulmón	32
	lóbulo medio derecho de pulmón	16
45	lóbulo inferior derecho de pulmón	24
	enfermedad de lupus de pulmón	41
50	tumor de pulmón	97
	COPD de pulmón	36
	Tráquea	16
55	Bronquios primarios	1
	Bronquios secundarios	191
	Células epiteliales bronquiales	37
60	Células del músculo liso bronquiales	14
	Células epiteliales de las vías respiratorias inferiores	49
65	Cuello	28

ES 2 313 055 T3

	Testículos	76
	Células HeLa (tumor de cuello)	1
5	Placenta	18
	Útero	119
	Tumos de útero	14
10	Ovario	27
	Tumor de ovario	57
	Mama	31
15	Tumor de mama	377
	Glándula mamaria	17
20	próstata	6
	próstata	27
	próstata	19
25	próstata BPH	73
	Tumor de próstata	362
	Vejiga	15
30	Vejiga	1
	Vejiga	8
	Uréter	31
35	Pene	343
	Cuerpo cavernoso	1235
40	Riñón fetal	288
	Riñón	16
	Riñón	1
45	Riñón	4
	Tumor de riñón	23
	Células epiteliales de riñón	140
50	Células HEK 293	142

Ejemplo 3

55 *Análisis no codificantes*

El conocimiento de la secuencia de ADNc, correcta, completa que codifica MGAT-X1 permite su uso como una herramienta para la tecnología no codificante en la investigación de la función génica. Los oligonucleótidos, ADNc o fragmentos genómicos que comprenden la hebra no codificante de un polinucleótido que codifica MGAT-X1 se usan o bien *in vitro* o *in vivo* para inhibir la traducción del ARNm. Tal tecnología se conoce bien en la técnica, y moléculas no codificantes se pueden diseñar en diversas localizaciones junto con las secuencias de nucleótidos. Mediante tratamiento de células o animales de ensayo enteros con tales secuencias no codificantes, el gen de interés se cierra de manera eficaz. Frecuentemente, la función del gen se determina mediante la observación del comportamiento a nivel intracelular, celular, de tejido o de organismo (por ejemplo, letalidad, pérdida de función diferenciada, cambios en la morfología, etc.).

ES 2 313 055 T3

Además de usar las secuencias construidas para interrumpir la transcripción de un marco abierto de lectura particular, se obtienen modificaciones de la expresión génica diseñando las secuencias no codificantes a las regiones de intrón, elementos promotor/potenciador, o incluso para tramitar los genes reguladores.

5 Ejemplo 4

Expresión de la MGAT-X1

La expresión de la MGAT-X1 se lleva a cabo mediante la subclonación de los ADNc en los vectores de expresión apropiados y transfectando los vectores en los huéspedes de expresión tales como, por ejemplo, *E. coli*. En un caso particular, el vector de modificación genética de manera que contenga un promotor de la β -galactosidasa, cadena arriba del sitio de clonación, seguido de la secuencia que contiene la metionina amino terminal y los posteriores siete restos de β -galactosidasa. Inmediatamente después de estos ocho restos es un promotor bacteriófago modificado por ingeniería genética útil para el cebado artificial y transcripción y para proporcionar un número de sitios de restricción de endonucleasa para clonación.

La inducción de la cepa bacteriana aislada transfectada con Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) usando procedimientos convencionales produce una proteína de fusión que corresponde a los primeros siete restos de la β -galactosidasa, aproximadamente 15 restos de "engarce", y el péptido codificado dentro del ADNc. Ya que las inserciones del clon de ADNc se generan mediante un procedimiento esencialmente al azar, existe una probabilidad del 33% de que el ADNc incluido se ubique en el marco de lectura correcto para la traducción apropiada. Si el ADNc no es el marco de lectura apropiado, se obtiene mediante supresión o inserción del número apropiado de bases que usan los procedimientos bien conocidos que incluyen mutagénesis *in vitro*, digestión con la endonucleasa III o nucleasa de judía mung, o la inclusión de un engarce de oligonucleótido de una longitud apropiada.

El ADNc de la MGAT-X1 se transfiere en otros vectores que se conoce que son útiles para la expresión de proteínas en huéspedes específicos. Los cebadores de oligonucleótido que contienen sitios de clonación así como un segmento de ADN (aproximadamente 25 bases) suficiente para hibridarse a tramos en ambos extremos del ADNc diana se sintetiza de manera química mediante procedimientos convencionales. Estos procedimientos después se usan para amplificar el segmento del gen deseado mediante la PCR. El segmento del gen resultante se digiere con enzimas de restricción apropiadas en condiciones convencionales y aislarse mediante electroforesis en gel. De manera alternativa, los segmentos de genes similares se producen mediante digestión del ADNc con enzimas de restricción apropiadas. Usando los cebadores apropiados, los segmentos de la secuencia de codificación de más de un gen se ligan conjuntamente y se clonan en vectores apropiados. Es posible optimizar la expresión mediante la construcción de tales secuencias químicas.

Los huéspedes de expresión adecuados para tales moléculas quiméricas incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO) y células 293 humanas, células de insecto tales como células Sf9, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* y células huésped tales como *E. coli*. Para cada uno de estos sistemas de células, un vector de expresión útil también incluye un origen de replicación para permitir la propagación en bacterias, y un marcador que se puede seleccionar tal como el gen de resistencia al antibiótico β -lactamasa que permite la selección de plásmido en bacterias. Además, el vector puede incluir un segundo marcador que se puede seleccionar tal como el gen de neomicina fosfotransferasa que permite la selección en las células huésped eucarióticas transfectadas. Los vectores para uso en huésped de expresión eucariótico requieren los elementos de procesamiento de ARN tal como las secuencias de 3'-poliadenilación si tales no son parte del ADNc de interés.

De manera adicional, el vector contiene promotores o potenciadores que incrementan la expresión génica. Tales promotores son huéspedes específicos e incluyen MMTV, SV40, y promotores de metalotionina para las células de CHO; promotores de trp, lac, tac y T7 para huéspedes bacterianos; y factor alfa, alcohol oxidasa y promotores de PGH para levadura. Los potenciadores de transcripción, tales como el potenciador del virus de sarcoma rous, se usan en células huésped de mamífero. Una vez se obtienen los cultivos homogéneos de las células recombinantes mediante procedimientos de cultivo convencionales, se recuperan grandes cantidades de la MGAT-X1 producida de manera recombinante a partir del medio acondicionado y se analiza usando los procedimientos cromatográficos conocidos en la técnica. Por ejemplo, MGAT-X1 se puede clonar en el vector de expresión pADNc3, como se ejemplifica en el presente documento. Este producto se usa para transformar, por ejemplo, HEK293 o COS mediante procedimiento convencional en la técnica. Específicamente, por ejemplo, usando la transferencia de gen mediada por Lipofectamine (Gibco BRL n° de catálogo 18324-020).

60 Ejemplo 5

Aislamiento del recombinante MGAT-X1

MGAT-X1 se expresa como una proteína quimérica con uno o más dominios de polipéptido adicional añadidos para facilitar la purificación de proteína. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metal tales como los módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados [Appa Rao (1997)] y el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Washington). La inclusión de una secuencia engarce de escisión tal como el Factor Xa o

enteroquinasa (Invitrogen, Groningen, Holanda) entre el dominio de purificación y la secuencia de la MGAT-X1 es útil para facilitar la expresión de la MGAT-X1.

Ejemplo 6

Producción de anticuerpos específicos de la MGAT-X1

Se utilizan dos planteamientos para inducir anticuerpos para MGAT-X1, y cada planteamiento es útil para generar anticuerpos o bien policlonales o monoclonales. En un planteamiento, la proteína desnaturalizada de la separación de HPLC de fase inversa se obtiene en cantidades de hasta 75 mg. Esta proteína desnaturalizada se usa para inducir anticuerpos para inmunizar ratones o conejos que usan protocolos convencionales; aproximadamente 100 μg son adecuados para la inmunización de un ratón, mientras hasta 1 mg se podría usar para inmunizar un conejo. Para identificar hibridomas de ratón, la proteína desnaturalizada se radiomarca y se usa para seleccionar los hibridomas de células B inmunes potenciales para los que producen anticuerpo. Este procedimiento requiere solamente cantidades pequeñas de proteína, tal como 20 mg es suficiente para marcar y seleccionar varios miles de clones.

En el Segundo planteamiento, la secuencia de aminoácidos de un dominio de la MGAT-X1 apropiado, como se deduce de la traducción del ADN, se analiza para determinar las regiones de alta antigenicidad. Los oligopéptidos que comprenden regiones hidrófilas se sintetizan y se usan en protocolos de inmunización adecuados para inducir anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos óptimas para la inmunización están usualmente en el extremo C, el extremo N y los que intervienen, regiones hidrófilas del polipéptido que probablemente se exponen al ambiente externo cuando la proteína está en su conformación natural.

Típicamente, los péptidos seleccionados, aproximadamente de 15 restos de longitud, se sintetizan usando un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems Modelo 431A usando la química de fmoc y se acoplaron a la hemocianina de lapa californiana (KLH; Sigma, St. Louis, MO) mediante reacción con M-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida éster, MBS. Si es necesario, se introduce una cisteína en el extremo N del péptido que permite el acoplamiento a KLH. Se inmunizan los conejos con el complejo péptido KLH en adyuvante de Freund' completo. Los antisueros resultantes se ensayan para determinar la actividad de antipéptido mediante la unión del péptido a plástico, bloqueando con 1% de albúmina sérica bovina, haciendo reaccionar con antisuero, lavando y haciendo reaccionar con IgG marcado (radioactivo o fluorescente), purificado por afinidad, anticuerpo de cabra específico.

Los hibridomas se preparan y se seleccionan usando técnicas convencionales. Los hibridomas de interés se detectan mediante selección con la MGAT-X1 marcada para identificar las fusiones que producen el anticuerpo monoclonal con la actividad deseada. En un protocolo típico, los pocillos de las placas (FAST; Becton-Dickinson, Palo Alto, CA) se recubren durante la incubación con anticuerpos purificados por afinidad, anti-conejo de conejo específico (o antiespecies adecuados 1 g) a 10 mg/ml. Los pocillos recubiertos se bloquean con albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, se lavan y se incuban con los sobrenadantes de hibridomas. Después de lavar los pocillos se incuban con MGAT-X1 marcada a 1 mg/ml. Los sobrenadantes con anticuerpos se unen a la MGAT-X1 más marcada que es detectable en el trasfondo. Después los clones que producen anticuerpos específicos se expanden y se someten a dos ciclos de clonación en la dilución limitante. Los hibridomas clonados se inyectan en ratones tratados con pristano para producir ascitos, y se purifica el anticuerpo monoclonal del fluido de ascitos de ratones mediante cromatografía por afinidad sobre Proteína A. Los anticuerpos monoclonales con afinidades de al menos 10^8 M^{-1} , preferiblemente 10^9 a 10^{10} M^{-1} o mayor, se preparan típicamente mediante procedimientos convencionales.

Ejemplo 7

Ensayo de diagnóstico usando anticuerpos específicos de MGAT-X1

Los anticuerpos particulares de la MGAT-X1 son útiles para investigar la transducción de la señal y la diagnosis de afecciones infecciosas o hereditarias que se caracterizan por diferencias en la cantidad o distribución de MGAT-X1 o productos cadena debajo de una cascada de señalización activa.

Los ensayos de diagnóstico para MGAT-X1 incluyen procedimientos que utilizan anticuerpo y una marca para detectar MGAT-X1 en fluidos corporales humanos, membranas, células, tejidos o extractos de ellos. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se usan con o sin modificación. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcan juntándolos, o bien de manera covalente o no covalente, con una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen una amplia diversidad de marcas y técnicas de conjugación y se han reseñado de manera extensa tanto en la bibliografía científica como de patentes. Las marcas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, substratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, partículas magnéticas, y similares.

Una diversidad de protocolos para medir la MGAT-X1 soluble o unida a membranas, usando anticuerpos o bien policlonales o monoclonales específicos para la proteína, se conocen en la técnica. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo a base de monoclonales de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopes que no interfieren sobre MGAT-X1, pero se puede emplear un ensayo de unión competitiva.

Ejemplo 8

Purificación sobre MGAT-X1 usando Anticuerpos específicos

5 Se purifica MGAT-X1 nativa o recombinante mediante cromatografía de de inmuoafinidad usando los anticuerpos específicos para MGAT-X1. En general, se construye una columna de inmuoafinidad mediante acoplamiento covalente del anticuerpo anti-TRH a una resina cromatográfica activada.

10 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de suero immune o bien mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación sobre Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway N.J.). De manera similar, los anticuerpos se preparan a partir de fluidos de ascitos de ratón mediante precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina purificada parcialmente se une de manera covalente a una resina cromatográfica tal como Sefarosa activada por CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, se bloquea la resina, y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Tales columnas de afinidad se utilizan en la purificación de la MGAT-X1 mediante la preparación de una fracción de células que contienen MGAT-X1 en una forma soluble. Esta preparación se deriva mediante la solubilización de células enteras o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial (con o sin la adición de detergente) o mediante otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, MGAT-X1 soluble que contiene una secuencia de señal se secreta en cantidad útil en el medio en el que las células se desarrollan.

20 Una preparación que contiene la MGAT-X1 soluble se pasa sobre la columna inmunológica, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorberencia preferencial de la MGAT-X1 (por ejemplo, tampones de alta resistencia iónica en la presencia de detergente). Después, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión de anticuerpo/proteína (por ejemplo, un tampón de pH 2 - 3 o una alta concentración de un chaotropo tal como ion urea o tiocianato), y se recoge la MGAT-X1.

Ejemplo 9

30 *Selección de fármacos*

Los compuestos de ensayo se pueden seleccionar para determinar la capacidad diacilglicerol aciltransferasa polipeptidos o polinucleótidos o para afectar a la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa o la expresión del gen de diacilglicerol aciltransferasa usando selección de alto rendimiento. Usando la selección de alto rendimiento, se pueden ensayar muchos compuestos discretos en paralelo al gran número de compuestos de ensayo se puede seleccionar rápidamente. Las técnicas establecidas más ampliamente utilizan plaacs de 96 pocillos. Los pocillos de las placas de mirotitulación típicamente requieren volúmenes de ensayo que varían entre 50 y 500 microlitros. Además de las placas, muchos instrumentos, materiales, pipetas, robótica, lavadores de placas, y lectores de placas están comercialmente disponibles para fijar el formato de 96 pocillos.

40 De manera alternativa “los ensayos de formato libre”, o ensayos que no tienen barrera física entre las muestras se pueden usar. Por ejemplo, un ensayo que usa células de pigmento (melanocitos) en un ensayo homogéneo sencillo para las genotecas de péptidos combinatorias se desvela por Jayawickreme *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614 - 18 (1994). Las células se colocan bajo azarosa en placas petri, después las perlas que llevan compuestos combinatorios se colocan sobre la superficie de azarosa. Los compuestos combinatorios son parcialmente liberados los compuestos de las perlas. Los compuestos activos se pueden visualizar como áreas de pigmentos oscuros porque, como los compuestos se difunden localmente en la matriz del gel, los compuestos activos provocan que las células cambien los colores.

50 Otro ejemplo del formato libre se desvela por Chelsky, “Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches,” reseñado en la Primera Conferencia Anual de la Sociedad para la Selección Biomolecular en Filadelfia, Pa. (Nov. 7 - 10, 1995). Chelsky colocó un ensayo de enzima homogéneo sencillo para carbónico anhidrasa dentro de un gel de azarosa de manera que la enzima en el gel provocaría un cambio de color a lo largo del gel. Después de esto, las perlas que llevan compuestos combinatorios mediante un fotoengarce se colocaron dentro del gel y los compuestos se liberaron parcialmente mediante luz ultravioleta. Los compuestos que inhibían la enzima se observaron como zonas locales de inhibición que tienen menos cambio de color.

60 Todavía otro ejemplo se desvela por Salmon *et al.*, Molecular Diversity 2, 57-63 (1996). En este ejemplo, las genotecas combinatorias se seleccionaron para los compuestos que tenían efectos citotóxicos sobre células de cáncer que se desarrollan en agar.

Otro procedimiento de selección de alto rendimiento se desvela por Beutel *et al.*, patente de Estados Unidos nº 5.976.813. En este procedimiento, las muestras de ensayo se colocan en una matriz porosa. Uno o más componentes de ensayo se colocan después dentro, sobre la parte superior, o en el fondo de una matriz tal como un gel, una hoja de plástico, un filtro, u otra forma de soporte sólido que se manipula fácilmente. Cuando las muestras se introducen a la matriz porosa se difunden suficientemente lento, de manera que los ensayos se pueden realizar sin que las muestras de ensayo se desarrollen conjuntamente.

Ejemplo 10

Diseño de fármaco racional

5 El objetivo de diseño de fármaco racional es producir análogos estructurales polipéptidos biológicamente activos de interés o de moléculas pequeñas con las que interactúan, agonistas, antagonistas, o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se usan para modelar fármacos que son más activos o formas estables del polipéptido o que potencian o interfieren con la función de un polipéptido *in vivo*.

10 En un planteamiento, la estructura de tres dimensiones proteína de interés, o de un complejo inhibidor de proteína, se determina mediante cristalografía de rayos X, mediante modelado por ordenador o, más típicamente, mediante una combinación de los dos planteamientos. Tanto la forma como cargas del polipéptido se debe determinar para elucidar la estructura y para determinar el (los) sitio (s) activo (s) de la molécula. Menos a menudo, la información útil con relación a la estructura de un polipéptido se gana mediante modelado basándose en la estructura de proteínas
15 homólogas. En ambos casos, la información estructural relevante se usa para diseñar inhibidores eficaces. Los ejemplos útiles del diseño de fármaco racional incluyen moléculas que tienen una actividad o estabilidad mejorada o que actúan como inhibidores, agonistas, o antagonistas de los péptidos nativos.

También es posible aislar un anticuerpo específico de Diana, seleccionado mediante ensayo funcional, como se
20 ha descrito anteriormente, y después resolver su estructura cristalina. Este planteamiento, en principio, produce un farmanúcleo en el que se basa el diseño del fármaco. Es posible desviar la cristalografía de proteína en conjunto mediante la generación de anticuerpos antiidiotípicos (anti-ids) a un anticuerpo funcional, farmacológicamente activo. Como una imagen especular de una imagen en el espejo, el sitio de unión de los anti-ids se espera que sea un análogo de la transferasa original. Los anti-ids después se usan para identificar t aislar péptidos de bancos de péptidos producidos
25 de forma química o biológica. Los péptidos aislados después actúan como el farmanúcleo.

En virtud de la presente invención, se prepara cantidad suficiente de polipéptido disponible para realizar tales estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de MGAT-X1 proporcionada en el presente documento proporciona la guía de aquellas que emplean técnicas de modelación por
30 ordenador.

Ejemplo 11

Uso y Administración de Anticuerpos, Inhibidores, o Antagonistas

Anticuerpos, inhibidores, o antagonistas de la MGAT-X1 u otros tratamientos y compuestos que son limitadores de la transducción de la señal (LST), proporcionan efectos diferentes cuando se administran de manera terapéutica. LST se formulan en un medio vehículo acuoso no tóxico, inerte, farmacéuticamente aceptable, preferiblemente a un
40 pH de aproximadamente 5 a 8, más preferiblemente 6 a 8, aunque el pH puede variar de acuerdo con las características del anticuerpo, inhibidor, o antagonista que se formula y la afección a tratar. Las características de los LST incluyen la solubilidad de la molécula, se semivida y antigenicidad/inmunogenicidad. Estas y otras características ayudan en la definición de un vehículo eficaz. Las proteínas humanas nativas se prefieren como LST, pero las moléculas orgánicas o sintéticas que se producen a partir de selecciones de fármacos son igualmente eficaces en situaciones particulares.

Los LST se administran mediante vías de administración que incluyen pero no se limitan a cremas y geles tópicos; pulverización y aerosol transmucosal; parche transdérmico y venda; formulaciones inyectables, intravenosas y de lavado; y líquidos y pastillas administrados por vía oral particularmente formuladas para resistir las enzimas ácidas del estómago. La formulación particular, dosis exacta, y vía de administración se determina por el médico asistente y
50 varía de acuerdo con cada situación específica.

Tales determinaciones se realizan mediante la consideración de múltiples variables tales como la afección a tratar, el LST a administrar, y el perfil farmacocinética de un LST particular. Los factores adicionales que se tienen en cuenta incluyen gravedad de estado patológico, la edad del paciente, peso, género y dieta, tiempo y frecuencia de la
55 administración de LST, posible combinación con otros fármacos, sensibilidades de reacción, y tolerancia/respuesta a la terapia. Las formulaciones de LST de larga duración se puede administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y velocidad de eliminación del LST particular.

Las cantidades de dosificación normal varía entre 0,1 y 10⁵ µg, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. La guía para las dosificaciones y procedimientos particulares de la distribución se proporciona en la bibliografía; véanse las patentes de Estados Unidos números 4.657.760; 5.206.344; ó 5.225.212. Los expertos en la técnica emplean diferentes formulaciones para los LST. La administración a las células tales como células nerviosas necesita la administración de una manera diferente de la de otras células tales como células endoteliales vasculares.
65

Se contempla que la transducción de señal anormal, trauma o enfermedades que disparan la actividad de MGAT-X1 se pueden tratar con los LST. Estas afecciones o enfermedades se diagnostican de manera específica mediante los ensayos descritos anteriormente, y tal ensayo se debe realizar en los casos sospechosos de infecciones virales,

bacterianas o fúngicas, respuestas alérgicas, lesión mecánica asociada a trauma, enfermedades hereditarias, linfoma o carcinoma, u otras afecciones que activan los genes de tejidos linfoides o neuronales.

Ejemplo 12

Producción de animales No-humanos transgénicos

Los sistemas de modelos animales que elucidan los papeles fisiológicos y de comportamiento de la MGAT-X1 transferasa se producen creando animales transgénicos no humanos en los que la actividad de la MGAT-X1 transferasa o bien se incrementa o disminuye, o la secuencia de aminoácidos de la MGAT-X1 transferasa expresada se altera, mediante una diversidad de técnicas. Los ejemplos de estas técnicas incluyen, pero no se limitan a: 1) Inserción de versiones normales o mutantes de ADN que codifican una MGAT-X1 transferasa, mediante microinyección, electroporación, transfección retroviral u otros medios bien conocidos por los expertos en la técnica, en embriones fertilizados de manera apropiada con el fin de producir un animal transgénico o 2) recombinación homóloga de versiones mutantes o normales, humanas o animales de estos genes con el locus del gen nativo en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión o la estructura de estas secuencias de la MGAT-X1 transferasa. La técnica de la recombinación homóloga se conoce bien en la técnica. Reemplaza el gen nativo con el gen insertado y por lo tanto es útil para producir un animal que no puede expresar las MGAT-X1 transferasas nativas pero no expresan, por ejemplo, una MGAT-X1 transferasa mutante insertada, que tiene reemplazada la MGAT-X1 transferasa nativa en el genoma de animales mediante recombinación, dando como resultado la no expresión de la transferasa. La microinyección añade genes al genoma, pero no los elimina, y la técnica es útil para producir un animal que se expresa y expresa la MGAT-X1 transferasa, dando como resultado la sobreexpresión de la MGAT-X1 transferasa.

Un medio disponible para producir un animal transgénico, con un ratón como ejemplo, es como sigue: se aparean ratones hembra, y los huevos fertilizados resultantes se diseccionan fuera de sus oviductos. Los huevos se almacenan en un medio apropiado tal como medio M2 de cloruro de cesio. ADN o ADNc que codifica MGAT-X1 se purifica a partir de un vector mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los promotores que se pueden inducir pueden condensarse a la región codificante del AND que proporciona un medio experimental para regular la expresión del transgen. De manera alternativa o además, los elementos reguladores específicos se pueden condensar con la región codificante para permitir la expresión específica de tejido del transgen. El ADN, en una solución tamponada con fosfato de manera apropiada, se colocan en una aguja de microinyección (que se puede preparar a partir de tubos capilares que usan un extractor de tuberías) y el huevo a inyectar se pone en un portaobjetos por depresión. La aguja se inserta en el pronúcleo del huevo, y se inyecta la solución de ADN. El huevo inyectado se transfiere después en el oviducto de un ratón pseudopreñado que es un ratón estimulado por las hormonas apropiadas con el fin de mantener el falso embarazo, cuando procede del útero, los implantes, se desarrolla hasta el final. Como se ha indicado anteriormente, la microinyección no es solamente el procedimiento para insertar ADN en el huevo pero se sa aquí solamente para propósitos ejemplares.

Ejemplo 13

Ensayo de unión

Para los ensayos de unión, el compuesto de ensayo es preferiblemente una pequeña molécula que se une a un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa, reduciendo por lo tanto la actividad biológica del polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa. Los ejemplos de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de péptidos o de tipo péptidos pequeñas. En los ensayos de unión, o bien el compuesto de ensayo o el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa polipéptido puede comprender una marca detectable, tal como una marca fluorescente, radioisotópica, quimioluminiscente, o enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa. Se puede después llevar a cabo la detección de un compuesto de ensayo que se une al polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa, por ejemplo, mediante conteo directo de la radioemisión, mediante centelleo, o mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado para un producto detectable.

Como alternativa, la unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de acilglicerol aciltransferasa se puede determinar sin marcar cualquiera de los interactuantes por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de ensayo con un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa. Un microfisiómetro (por ejemplo, Cytosensor™) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su ambiente usando un sensor potenciométrico dirigible por la luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden usar como un indicador de la interacción entre un compuesto de ensayo y un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa (McConnell *et al.*, Science 257, 1906 - 1912, 1992).

La determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo de unirse a un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa también se puede llevar a cabo usando una tecnología tal como Análisis de Interacción Biomolecular de tiempo real (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338 - 2345, 1991, y Szabo *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699 - 705, 1995). BIA es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore™). Los cambios en la resonancia de plasmón de superficie (SPR) de fenómeno óptico se pueden usar como una indicación de las reacciones de tiempo real entre moléculas de tiempo.

Todavía en otro aspecto de la invención, un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa se puede usar como una “proteína cebo” en un ensayo de tres híbridos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.283.317; Zervos *et al.*, Cell 72, 223 - 232, 1993; Madura *et al.*, J. Biol. Chem. 268, 12046 - 12054, 1993; Bartel *et al.*, Biotechniques 14, 920 - 924, 1993; Iwabuchi *et al.*, Oncogene 8, 1693 - 1696, 1993; y Brent W094/10300), para identificar otras proteínas que se unen a o interactúan con el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa y modulan su actividad.

El sistema de dos híbridos basado en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción que constan de unión de ADN separables y dominios de activación. En resumen, el ensayo utiliza dos construcciones deferentes de ADN. Por ejemplo, en una construcción, el polinucleótido que codifica un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa se puede condensar a un polipéptido que codifica el dominio de unión de ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción una secuencia de que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) se puede condensar a un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y “presa” son capaces de interactuar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de unión de ADN y de activación del factor e transcripción están en proximidad estrecha. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, acZ), que se une de manera operativa a un sitio de transcripción regulador sensible al factor de transcripción. Se puede detectar la expresión de gen indicador, y las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional se puede aislar y usar para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interactúa con el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa.

Puede ser deseable inmovilizar o bien el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa (o polinucleótido) o el compuesto de ensayo para facilitar la separación de las formas unidas de las no unidas de uno o ambos de los interactuantes, sí como para acomodar la automatización del ensayo. De este modo, el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa (o polinucleótido) o el compuesto de ensayo se puede unir a un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio o de plástico, placas de cultivo de tejidos, pocillos de microvaloración, tubos, procesadores de silicio, o partículas tales como perlas, (que incluyen pero no se limitan a, látex, poliestireno, o perlas de vidrio). Cualquier procedimiento conocido en la técnica se puede usar para unir el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa (o un polinucleótido) o compuesto de ensayo a un soporte sólido, que incluye el uso de al polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa (o polinucleótido) o compuesto de ensayo a un soporte sólido, incluyendo el uso de enlaces covalentes y no covalentes, absorción positiva, o pares de restos de unión unidos respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o compuesto de ensayo y el soporte sólido. Los compuestos de ensayo se unen preferiblemente al soporte sólido en una disposición, de manera que la localización de los compuestos de ensayo individuales se puede rastrear. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa o (polinucleótido) se puede llevar a cabo en cualquier vehículo adecuado para recubrir los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microvaloración, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga.

En una realización, el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa es una proteína de fusión que comprende un dominio que comprende un dominio que permite que el polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa se una a un soporte sólido. Por ejemplo, proteínas de fusión de la glutatión-S-transferasa se pueden adsorber sobre las perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microvaloración derivatizadas de glutatión que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa no adsorbido; la mezcla después se incuba en condiciones para la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas o pocillos de las placas de microvaloración se lavan para retirar los componentes no unidos. La unión de los interactuantes se puede determinar o bien directa o indirectamente, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar del soporte sólido antes de que se determine la unión.

Se pueden usar otras técnicas para la inmovilización de proteínas o polinucleótidos sobre un soporte sólido en los ensayos de selección de la invención. Por ejemplo, o bien un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa (o polinucleótido) o un compuesto de ensayos puede inmovilizar utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Los polipéptidos de la acilglicerol aciltransferasa biotinilados (o polinucleótidos) o compuestos de ensayo se pueden preparar a partir de biotin-NHS(N-hidroxisuccinimida) usando las técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) y se inmovilizan en los pocillos de las placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa, polinucleótido, o un compuesto de ensayo, pero que no interfieren con un sitio de unión deseado, tal como el sitio activo del polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa, se pueden derivatizar a los pocillos de la placa. La diana o proteína no unida se puede atrapar en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos.

Los procedimientos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados por GST, incluyen la inmunodetección de complejos que usan anticuerpos que usan anticuerpos que específicamente se unen al polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa o compuesto de ensayo, ensayos ligados a enzima que dependen de la detección de una actividad del polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa, y electroforesis en gel de SDS en condiciones no reductoras.

La selección de los compuestos de ensayo que se unen al polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa o polinucleótido también se puede llevar a cabo En una célula intacta. Cualquier célula que comprende un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa o polinucleótido se puede usar en un sistema de ensayo basado en células. Un polinu-

cleótido de la acilglicerol aciltransferasa puede ser de origen natural en la célula o se puede introducir usando las técnicas tales como las descritas anteriormente. La unión del compuesto de ensayo a un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa o polinucleótido se determina como se ha descrito anteriormente.

- 5 El polipéptido purificado de la acilglicerol aciltransferasas que comprende una proteína de la glutatión-S-transferasa y absorbida sobre pocillos derivatizados de glutatión de placas de microvaloración de 96 pocillos se ponen en contacto con los compuestos de ensayo de una genoteca de pequeñas moléculas a pH 7,0 en una solución tampón fisiológica, los polipéptidos de la acilglicerol aciltransferasas comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera o más de SEQ ID NO: 6 a 10. Los compuestos de ensayo comprenden una etiqueta fluorescente. Las
10 muestras se incuban durante 5 minutos a una hora. Las muestras de control se incuban en la ausencia de un compuesto de ensayo.

- La solución de tampón que contiene los compuestos de ensayo se lava de los pocillos. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa se detecta mediante mediciones de fluorescencia del contenido
15 de los pocillos. Un compuesto de ensayo que incrementa la fluorescencia en un pocillo en al menos 15% con relación a la fluorescencia de un pocillo en el que un compuesto de ensayo no incubado se identifica como un compuesto que se une a un polipéptido relacionado con el factor de ADO-ribosilación.

Ejemplo 14

20 *Actividad Funcional*

- Los ensayos funcionales se pueden llevar a cabo como se ha descrito en los ejemplos específico, después de poner en contacto o bien un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa o en una célula intacta de un compuesto de ensayo.
25 Un compuesto de ensayo que disminuye una actividad funcional de un polipéptido de la acilglicerol aciltransferasa humano en al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, ó 100% se identifica como un agente potencial para disminuir la actividad de la proteína de la acilglicerol aciltransferasa. Un compuesto de ensayo que incrementa la actividad funcional en al menos 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, ó 100% se identifica como un agente potencial para
30 incrementar la actividad de la proteína de la acilglicerol aciltransferasa.

Ejemplo 15

Efecto del compuesto de ensayo sobre transporte aniónico

- 35 El transporte de sustrato marcado con ^3H en la presencia o ausencia de un compuesto de ensayo se puede medir como se ha descrito en Hsiang *et al.* (1999, *supra*). En resumen, las células 293c18 se transfectan con las construcciones de tipo human OATP2- humanas usando LipofectAMINE Plus (Life Technologies, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se retira el medio, y se lavan las células una vez en DMEM sin suero. El sustrato
40 marcado con ^3H , o bien solo o en la presencia de un compuesto de ensayo, se añade en el mismo medio y se incuba a temperatura ambiente durante 5 - 10 minutos. Las células se lavan rápidamente una vez con DMEM enfriado con hielo que contiene 5% de albúmina sérica bovina, después se lava tres veces con DMEM enfriado con hielo. Se lisan las células en 0,1 N NaOH. La incorporación radiomarcada se determina mediante conteo por centelleo líquido.

45 Ejemplo 16

Purificación parcial

- Las referencias que describen al menos la purificación parcial de la acilglicerol aciltransferasa de fuentes de origen natural incluyen: Kamisaka *et al.*, "Purification and Characterization of Diacylglycerol Aciltransferasa from the Lipid Body Fraction of Oleaginous Fungus," J. Biochem (Tokyo) 1997 (6) 1107 - 1114 [Kamisaki *et al.*, (1997)]; Little
50 *et al.*, "Solubilization and Characterization of Diacylglycerol Aciltransferasa from Microspore-Derived Cultures of Oilseed Rape," Biochem J. (Dec. 15, 1994) 304 (Pt 3): 951 - 958 [Little *et al.*, (1994)]; Andersson *et al.*, "Purification of Diacylglycerol: acyltransferase from Rat Liver to Near Homogeneity," J. Lipid Res. (March 1994) 35: 535 - 545
55 [Anderson *et al.*, (1994)]; Polokoff & Bell, "Solubilization, Partial Purification and Characterization of Rat Liver Microsomal Diacylglycerol: acyltransferase", Biochim. Biophys. Acta (1980) 618: 129-142 [Polokoff *et al.*, (1980)].

Ejemplo 17

60 *Ensayo de la acilglicerol aciltransferasa*

- Ensayo de la acilglicerol aciltransferasa [Bhat *et al.*, (1998)]. MGAT se purificó parcialmente a partir de hígados de ratas Sprague-Dawley de 8 día de edad obtenidas a partir de hembras embarazadas (Zivic-Miller) (7). Después de la etapa de cromatografía por hidroxilapatita, la preparación de enzima solubilizada y altamente purificada está libre de
65 fosfolípidos. Se almacenaron alícuotas a - 70 °C. MGAT se ensayó en micelas mezcladas. En resumen, se solubilizaron lípidos secos en 0,2% de Triton X-100 y se añadieron a la mezcla de reacción. Las concentraciones de cada lípido y el sustrato hidrófobo de MGAT 2-monoC18: 1- sn-glicerol se expresan como un porcentaje de moles, calculado por la ecuación: $100 \times \{[\text{lípido añadido}] / ([\text{lípido total}] + [\text{Triton X-100}])\}$. Se ensayó la actividad de la MGAT en un

ES 2 313 055 T3

volumen de 200 l que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,5 mg/ml BSA, 0,22% Triton X-100 (3 mM concentración de micela), 150 M 2-MO, 25 M [3H]palmitoil-CoA (115 Ci/mol), 0,25-0,5 g de proteína purificada por hidroxilapatita, y las concentraciones indicadas de lípidos especificada. Las concentraciones de palmitoil-CoA, que es soluble en agua, se reseñan como concentraciones molares, debido a que los inventores no pueden estar seguros sobre la cantidad que se reparte en las micelas, particularmente en la presencia de BSA. Las concentraciones de palmitoil-CoA mayores que 60 M no se usaron debido a que no se observó inhibición. Después de 5 minutos de incubación a 23°C, los productos se extrajeron y se analizaron. Cuando es necesario, una parte del extracto de heptano se cromatografió con los lípidos vehículo sobre placas G de gel de sílice de 10 cm en heptano/isopropil éter/ácido acético (60:40:4; v/v), y las áreas de triacilglicerol y diradilglicerol se rasparon y se contaron. Todos los ensayos contenían las cantidades óptimas de sustratos y se midieron en sus cantidades iniciales. Se desvela otro ensayo para la acilglicerol aciltransferasa en el documento de Estados Unidos 6.607.893.

Referencias

- Documento de Estados Unidos N° 4.522.811
- Documento de Estados Unidos N° 4.683.195
- Documento de Estados Unidos N° 4.800.195
- Documento de Estados Unidos N° 4.965.188
- Documento de Estados Unidos N° 5.223.409
- Documento de Estados Unidos N° 5.283.317
- Documento de Estados Unidos N° 5.403.484
- Documento de Estados Unidos N° 5.565.332
- Documento de Estados Unidos N° 5.571.698
- Documento de Estados Unidos N° 5.641.673
- Documento de Estados Unidos N° 6.607.893
- Documento WO 84/03564
- Documento WO 92/01810
- Documento WO 93/03151
- Documento WO 94/13804
- Documento WO 01/04283
- Documento WO 01/04297
- Documento WO 01/46258
- Agrawal et al.**, *Trends Biotechnol.* 10, 152 - 158, 1992
- Anderson et al.**, (1994), *J. Lipid Res.* 35: 535 - 545
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ**; *Nucleic Acids Res* 1997 sep 1; 25 (17): 3389 - 402
- Appa Rao KB, Garg LC, Panda AK, Totey SM**; *Proteína Expr Purif* 1997 nov; 11 (2): 201 - 8
- Barnes, P.J.** Mechanisms in COPD. *Differences from asthma.* Chest 2000, 117: 10S14S
- Bartel et al.**, *BioTechniques* 14, 920 - 924, 1993
- Bhat et al.**, (1998), *Biochemistry.*; 37 (17):_5916-22.
- Becker-Andre, M.**, *Meth. Mol. Cell Biol.* 2: 189 - 201 (1991)
- Botstein D, W. R., Skolnick M, Davis R W.**, *Am J Hum Genet.* 32: 314-31, 1980.

- Buhman et al.**, *J. Biol. Chem.*; 277; 25474 - 25479
- Burton**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120 - 23, 1991
- 5 **Carrell et al.** (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059
- Caruthers et al.**, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215 - 223, 1980
- Cases et al.**, (2001), *J. Biol. Chem.*; 276 (42); 38870 - 38876
- 10 **Cao et al.**, (2003), *J. Biol. Chem.*; 278 (28); 25657 - 25663
- Cao et al.**, (2003); *J. Biol. Chem.*; 278 (16); 13860 - 13866
- 15 **Cawkwell L, B. S., Lewis F A, Dixon M F, Taylor G R, Quirke P**, *Br J Cancer*. 67: 1262 - 7, 1993.
- Cech**, *Science* 236, 1532 - 1539; 1987
- Cech**, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543 - 568; 1990
- 20 **Cech**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605 - 609; 1992
- Chen et al.**, (2001), *J. Clin. Invest.*; 111 (11); 1715 - 1722
- 25 **Cho et al.** (1993) *Science* 261: 1303
- Colbere-Garapin et al.**, *J. Mol. Biol.* 150, 1 - 14, 1981
- Cole et al.**, *Mol. Cell Biol.* 62, 109 - 120, 1984)
- 30 **Coruzzi et al.**, *EMBO J.* 3, 1671 - 1680, 1984
- Cote et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026 - 2030; 1983
- 35 **Couture & Stinchcomb**, *Trends Genet.* 12, 510 - 515, 1996
- Cull et al.** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865 - 1869
- Cwirla et al.** (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378 - 6382
- 40 **Devlin** (1990) *Science* 249: 404 - 406
- DeWitt et al.** (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909
- 45 **Engelhard et al.**, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224 - 3227, 1994
- Erb et al.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422
- Felici** (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301 - 310
- 50 **Fodor** (1993) *Nature* 364: 555 - 556
- Gallop et al.** (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233
- 55 **Gee et al.**, in Huber & Carr, *MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994
- Gergen and Weiss**, *Am Rev Respir Dis* 146: 823-824, 1992
- 60 **Gibson**, U. E. M., Heid, C. A. and **Williams**, P. M., *Genome Research*. 6: 995 - 1001, 1996.
- Hampton et al.**, *SEROLOGICAL PROCEDIMIENTOS: A LABORATORY MANUAL*, APS Press, St. Paul, Minn., 1990
- 65 **Hartman & Mulligan**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047 - 51, 1988
- Haseloff et al.** *Nature* 334, 585 - 591, 1988

ES 2 313 055 T3

- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M.,** *Genome Research*, 6: 986-994, 1996.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. and Gelfand, D. H.,** PNAS. 88: 7276-7280, 1991.
- 5 **Horn et al.** *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225 - 232, 1980
- Houghten (1992)** *Bio/Techniques* 13: 412 - 421
- Iwabuchi et al.,** *Oncogene* 8, 1693 - 1696, 1993
- 10 **Jeffreys A J, W. V., Thein S L,** *Nature*. 316: 76 - 9, 1985.
- Johnson et al.,** *Endoc. Rev.* 10, 317 - 331, 1989
- 15 **Kamisaki et al., (1997)** *J. Biochem* (Tokyo) (6) 1107 - 1114
- Kellogg, D. E., et al.,** *Anal. Biochem.* 189: 202 - 208 (1990)
- Kohler et al.,** *Nature* 256, 495 - 497, 1985
- 20 **Kozbor et al.,** *J. Immunol. Procedimientos* 81, 31 - 42, 1985
- Kroll et al.,** *DNA Cell Biol.* 12, 441 - 453, 1993
- 25 **Lardizabal et al. (2001),** *J. Biol. Chem.*; 276 (42); 38862 - 38869
- Lam (1991)** *Nature* 354: 82 - 84
- Lam (1997)** *Anticancer Drug Des.* 12: 145
- 30 **Lam KS.** Application of combinatorial library procedimientos in cancer research and drug discovery. *Anticancer Drug Des* 1997 Apr; 12 (3): 145 - 67
- Little et al., (1994),** *Biochem J.* 304 (Pt 3): 951 - 958
- 35 **Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. y Deetz, K.,** PCR Procedimientos and Applications 357 - 362, 1995.
- Logan & Shenk,** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655 - 3659, 1984
- 40 **Lowy et al.,** *Cell* 22, 817 - 23, 1980
- Maddox et al.,** *J. Exp. Med.* 158, 1211 - 1216, 1983
- 45 **Madura et al.,** *J. Biol. Chem.* 268, 12046 - 12054, 1993
- Maniatis et al.,** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press
- 50 **McConnell et al.,** *Science* 257, 1906 - 1912, 1992
- Merrifield,** *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 - 2154, 1963
- Morrison et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851 - 6855, 1984
- 55 **Murray,** 1992, *supra*
- Nagarenko, I. A., et al.** *Nucleic Acids Research* 25: 16 - 21 (1997)
- 60 **Neuberger et al.,** *Nature* 312, 604 - 608, 1984
- Nicholls et al.,** 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91)
- Piatak, M. J., et al.,** *BioTechniques* 14: 70 - 81 (1993)
- 65 **Piatak, M. J., et al.,** *Science* 259: 1749 - 1754 (1993))
- Porath et al.,** *Prot. Exp. Purif.* 3, 263 - 281, 1992

ES 2 313 055 T3

Polokof et al., (1980), *Biochim. Biophys. Acta* 618: 129 - 142

Roberge et al., *Science* 269, 202 - 204, 1995

5 **Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Scott and Smith (1990) *Science* 249: 386 - 390

10 **Sharp, P. A., et al.**, *Procedimientos Enzymol.* 65: 750 - 768, 1980

Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338 - 2345, 1991

Southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98: 503 - 517, 1975

15 **Smith et al.**, (2000), *Nature Genet.* 25; 87 - 90

Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699 - 705, 1995

20 **Takamatsu** *EMBO J.* 6, 307 - 311, 1987

Takeda et al., *Nature* 314, 452-454, 1985

Thomas, P. S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 5201 - 5205, 1980

25 **Uhlmann et al.**, *Chem. Rev.* 90, 543 - 584, 1990

Uhlmann et al., *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539 - 3542, 1987

30 **Verhaar et al.**, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497 - 501

Weber et al., *Genomics.* 7: 524 - 30, 1990.

Wigler et al., *Cell* 11, 223 - 32, 1977

35 **Wigler et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567 - 70, 1980

Yen et al., (2003), *J. Biol. Chem.*; 278 (20); 18632 - 18537

40 **Zervos et al.**, *Cell* 72, 223 - 232, 1993

Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37: 2678.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para seleccionar reguladores de la actividad de acilglicerol aciltransferasa de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2 útil en el tratamiento de cáncer en un mamífero, que comprende las etapas de
- poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido de la SEQ ID NO: 2,
 - detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a dicho polipéptido,
- en el que los compuestos de ensayo que se une bajo (ii) se identifican como reguladores potenciales de la actividad de la SEQ ID NO: 2 útil en el tratamiento de cáncer.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto está en o junto a la superficie de una célula.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la célula está *in vitro*.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto es en un sistema sin células.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido está acoplado a una marca detectable.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto está acoplado a una marca detectable.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido está unido a un soporte sólido.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto está unido a un soporte sólido.
9. Un procedimiento de selección de reguladores de la actividad de la acilglicerol aciltransferasa de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2 útil en el tratamiento de cáncer en un mamífero, que comprende las etapas de:
- medir la actividad de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2 a una cierta concentración de un compuesto de ensayo o en la ausencia de dicho compuesto de ensayo,
 - medir la actividad de dicho polipéptido a una concentración diferente de dicho compuesto de ensayo,
- en el que dicho compuesto de ensayo se identifica como un regulador de la actividad de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2 cuando existe una diferencia significativa entre las actividades medidas en (i) y (ii).
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las actividades se miden en una célula.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la célula está *in vitro*.
12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las actividades se miden en un sistema sin células.
13. Un procedimiento para seleccionar reguladores de la actividad de acilglicerol aciltransferasa de la SEQ ID NO: 2 útil en el tratamiento de cáncer en un mamífero, que comprende las etapas de
- poner en contacto un compuesto de ensayo con una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1,
 - detectar la unión de dicho compuesto de ensayo a dicha molécula de ácido nucleico,
- en el que dicho compuesto de ensayo se identifica como un regulador potencial de la actividad de la acilglicerol aciltransferasa de la SEQ ID NO: 2 cuando se une a dicha molécula de ácido nucleico.
14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la molécula de ácido nucleico es ARN.
15. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa de contacto es en o junto a la superficie de una célula.
16. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa de contacto es en un sistema sin células.
17. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la molécula de polipéptido o de ácido nucleico está acoplada a una marca detectable.
18. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el compuesto de ensayo está acoplado a una marca detectable.

ES 2 313 055 T3

19. Un procedimiento de diagnosis de cáncer en un mamífero que comprende las etapas de

i) medir la cantidad de una SEQ ID NO: molécula de ácido nucleico en una muestra tomada dicho mamífero enfermo,

ii) comparar el resultado de (i) con la cantidad de dicha molécula de ácido nucleico en uno o varios mamíferos sanos,

en el que cáncer se diagnostica en el mamífero enfermo cuando la cantidad de dicha molécula de ácido nucleico en el mamífero enfermo es significativamente diferente de la cantidad de dicha molécula de ácido nucleico en el (los) mamífero (s) sano(s).

20. Uso de

i) un oligonucleótido no codificante,

ii) un anticuerpo, o

iii) una ribozima,

que regula específicamente hacia abajo la actividad de la acilglicerol aciltransferasa de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 18 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de cáncer en un mamífero.

21. Uso de

i) un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 1 o

ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2

para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de cáncer en un mamífero.

Fig. 1

SEQ ID NO:1

5'- ACTGTTCTGAGATCTTTGCCTCCCTCAGGCTCCCGAGAATCATGGCTCAT
TCCAAGCAGCCTAGTCACTTCCAGAGTCTGATGCTTCTGCAGTGGCCTTT
GAGCTACCTTGCCATCTTTTGGATCTTGCAGCCATTGTTTCGTCTACCTGC
TGTTTACATCCTTGTGGCCGCTACCAGTGCTTTACTTTGCCTGGTTGTTC
CTGGACTGGAAGACCCCAGAGCGAGGTGGCAGGCGTTCGGCCTGGGTAAG
GAACTGGTGTGTCTGGACCCACATCAGGGACTATTTCCCCATTACGATCC
TGAAGACAAAGGACCTATCACCTGAGCACAACTACCTCATGGGGGTTTCAC
CCCCATGGCCTCCTGACCTTTGGCGCCTTCTGCAACTTCTGCACTGAGGC
CACAGGCTTCTCGAAGACCTTCCCAGGCATCACTCCTCACTTGGCCACGC
TGTCTTGGTTCTTCAAGATCCCCTTTGTTAGGGAGTACCTCATGGCCAAA
GGTGTGTGCTCTGTGAGCCAGCCAGCCATCAACTATCTGCTGAGCCATGG
CACTGGCAACCTCGTGGGCATTGTAGTGGGAGGTGTGGGTGAGGCCCTGC
AAAGTGTGCCCAACACCACCACCTCATCCTCCAGAAGCGCAAGGGGTTC
GTGCGCACAGCCCTCCAGCATGGGGCTCATCTGGTCCCCACCTTCACTTT
TGGGGAAACTGAGGTGTATGATCAGGTGCTGTTCCATAAGGATAGCAGGA
TGTACAAGTTCCAGAGCTGCTTCCGCCGTATCTTTGGTTTCTACTGTTGT
GTCTTCTATGGACAAAGCTTCTGTCAAGGCTCCACTGGGCTCCTGCATA
CTCCAGGCCTATTGTCACTGTGGTTGGGGAGCCTCTGCCACTGCCCCAAA
TTGAAAAGCCAAGCCAGGAGATGGTGGACAAATACCATGCACTTTATATG
GATGCTCTGCACAACTGTTTCGACCAGCATAAGACCCACTATGGCTGCTC
AGAGACCCAAAAGCTGTTTTTCTGTGAATGAAGGTACTGCATGCCCAGG
AGCACAGGAGTGCCTGCCTTGAAGAAGAGACTCATCTGCCACTAACCAAA
GACAGGCAGGAGATGAGGGAGGTTATATGTG

3'

Fig. 2:

SEQ ID NO:2

MAHSKQPSHFQSLMLLQWPLSYLAIFWILQPLFVYLLFTSLWPLPVLYFA
WLFLDWKTPERGGRSAWVRNWCWVTHRDYFPITILKT'KDLSPEHNYLM
GVHPHGLLTFGAFCNFCTEATGFSKTFPGITPHLATLSWFFKIPFVREYL
MAKGVCSVSQPAINYLLSHGTGNLVGIVVGGVGEALQSV'PNTTTLILQKR
KGFVRTALQHGAHLVPTFTFGETEVYDQVLFHKDSRMYK'FQSCFERRIFGF
YCCVFYQGQSFQSGSTGLLPYSRPIVTVVGEPLPLPQIEKPSQEMVDKYHA
LYMDALHKLFDQHKTHYGCSETQKLFFL

Fig. 3:

SEQ ID NO:3

5'-CCAGGCCTATTGTC'ACTGTG-3'

Fig. 4:

SEQ ID NO:4

5'-CTGGCTTGGCTTTTCA'ATTT-3'

Fig. 5:

SEQ ID NO:5

5'-TTGGGGAGCCTCTGCC'ACTGC-3'

ES 2 313 055 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Bayer AG, BHC	
5	<120> Proteína MGAT-X1 de tipo acilglicerol aciltransferasa y sus usos	
	<130> Le A 36 894	
10	<160> 5	
	<170> PatentIn version 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 1131	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 1	
	actgttctga gatctttgcc tccctcaggc tcccagagaat catggctcat toccaagcagc 60	
25	ctagtcactt ccagagtctg atgctttctgc agtggccttt gagctacctt gccatctttt 120	
	ggatcttgca gccattgttc gtctacctgc tgtttacatc cttgtggcgg ctaccagtgc 180	
	tttactttgc ctgggtgttc ctggactgga agaccccaga gcgagggtggc aggcgttcgg 240	
30	cctgggtaag gaactggtgt gtctggaccc acatcaggga ctattttccc attacgatcc 300	
	tgaagacaaa ggacctatca cctgagcaca actacctcat ggggggtcac ccccatggcc 360	
	tcctgacctt tggcgccctc tgcaacttct gcactgaggc cacaggcttc tcgaagacct 420	
35	tcccaggcat cactcctcac ttggccacgc tgtcctgggt cttcaagatc ccctttgtta 480	
	gggagtacct catggccaaa ggtgtgtgct ctgtgagcca gccagccatc aactatctgc 540	
	tgagccatgg cactggcaac ctctgtggga ttgtagtggg aggtgtgggt gaggccctgc 600	
40	aaagtgtgcc caacaccacc accctcatcc tccagaagcg caaggggttc gtgcgcacag 660	
	ccctccagca tggggctcat ctgggtcccca ccttcacttt tggggaaaact gagggtgatg 720	
	atcagggtgct gttccataag gatagcagga tgtacaagtt ccagagctgc ttccgccgta 780	
45	tctttggttt ctactgttgt gtcttctatg gacaaagctt ctgtcaaggc tccactgggc 840	
	tcctgccata ctccaggcct attgtcactg tggttgggga gcctctgcca ctgccccaaa 900	
	ttgaaaagcc aagccaggag atggtggaca aataccatgc acttttatatg gatgctctgc 960	
50	acaaactggt cgaccagcat aagaccact atggctgctc agagacccaa aagctgtttt 1020	
	tcctgtgaat gaaggctact catgcccagg agcacaggag tgcctgcctt gaagaagaga 1080	
	ctcatctgcc actaaccaaa gacaggcagg agatgaggga ggttatatgt g 1131	
55	<210> 2	
	<211> 328	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60		
65		

ES 2 313 055 T3

<400> 2

	Met	Ala	His	Ser	Lys	Gln	Pro	Ser	His	Phe	Gln	Ser	Leu	Met	Leu	Leu
5	1				5					10					15	
	Gln	Trp	Pro	Leu	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ile	Phe	Trp	Ile	Leu	Gln	Pro	Leu
				20					25					30		
10	Phe	Val	Tyr	Leu	Leu	Phe	Thr	Ser	Leu	Trp	Pro	Leu	Pro	Val	Leu	Tyr
			35					40						45		
	Phe	Ala	Trp	Leu	Phe	Leu	Asp	Trp	Lys	Thr	Pro	Glu	Arg	Gly	Gly	Arg
15		50					55					60				
	Arg	Ser	Ala	Trp	Val	Arg	Asn	Trp	Cys	Val	Trp	Thr	His	Ile	Arg	Asp
	65					70					75				80	
20	Tyr	Phe	Pro	Ile	Thr	Ile	Leu	Lys	Thr	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	Glu	His
				85						90					95	
	Asn	Tyr	Leu	Met	Gly	Val	His	Pro	His	Gly	Leu	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala
25				100					105						110	
	Phe	Cys	Asn	Phe	Cys	Thr	Glu	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Lys	Thr	Phe	Pro
			115						120					125		
30	Gly	Ile	Thr	Pro	His	Leu	Ala	Thr	Leu	Ser	Trp	Phe	Phe	Lys	Ile	Pro
			130						135					140		
	Phe	Val	Arg	Glu	Tyr	Leu	Met	Ala	Lys	Gly	Val	Cys	Ser	Val	Ser	Gln
35						150					155					160
	Pro	Ala	Ile	Asn	Tyr	Leu	Leu	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Asn	Leu	Val	Gly
					165						170				175	
40	Ile	Val	Val	Gly	Gly	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Gln	Ser	Val	Pro	Asn	Thr
				180						185					190	
	Thr	Thr	Leu	Ile	Leu	Gln	Lys	Arg	Lys	Gly	Phe	Val	Arg	Thr	Ala	Leu
45				195					200					205		
	Gln	His	Gly	Ala	His	Leu	Val	Pro	Thr	Phe	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Glu
		210						215					220			
50	Val	Tyr	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	His	Lys	Asp	Ser	Arg	Met	Tyr	Lys	Phe
					230						235					240
55	Gln	Ser	Cys	Phe	Arg	Arg	Ile	Phe	Gly	Phe	Tyr	Cys	Cys	Val	Phe	Tyr
				245						250					255	
	Gly	Gln	Ser	Phe	Cys	Gln	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Ser	Arg
60				260					265					270		
	Pro	Ile	Val	Thr	Val	Val	Gly	Glu	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu
				275					280					285		

65

ES 2 313 055 T3

	Lys	Pro	Ser	Gln	Glu	Met	Val	Asp	Lys	Tyr	His	Ala	Leu	Tyr	Met	Asp	
	290						295						300				
5	Ala	Leu	His	Lys	Leu	Phe	Asp	Gln	His	Lys	Thr	His	Tyr	Gly	Cys	Ser	
	305						310						315			320	
	Glu	Thr	Gln	Lys	Leu	Phe	Phe	Leu									
10				325													
	<210> 3																
	<211> 20																
15	<212> ADN																
	<213> secuencia artificial																
	<220>																
20	<223> cebador directo																
	<400> 3																
25	ccaggcctat tgtcactgtg															20	
	<210> 4																
	<211> 20																
30	<212> ADN																
	<213> secuencia artificial																
	<220>																
	<223> cebador inverso																
35	<400> 4																
	ctggcttggc tttcaattt															20	
40	<210> 5																
	<211> 21																
	<212> ADN																
45	<213> secuencia artificial																
	<220>																
	<223> sonda																
50	<400> 5																
	ttggggagcc tctgccactg c															21	
55																	
60																	
65																	