



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 713**

51 Int. Cl.:
G01N 33/566 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96943623 .7**
86 Fecha de presentación : **10.12.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0870199**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.10.1998**

54 Título: **Ensayos de receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento.**

30 Prioridad: **13.12.1995 US 8584 P**
06.06.1996 US 19259 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US

72 Inventor/es: **Chaung, Lee-Yuh;**
Feighner, Scott, D.;
Howard, Andrew, D.;
Pong, Sheng, S. y
Van der Ploeg, Leonardus

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 268 713 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

Ensayos de receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un ensayo que implica la identificación de receptores de la membrana celular, específicamente receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR). Variando el protocolo pueden identificarse ligandos de los receptores o puede identificarse la presencia de un GHSR.

10 **Antecedentes de la invención**

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona anabólica capaz de promover un crecimiento lineal, una ganancia de peso y una retención corporal completa de nitrógeno. Clásicamente, se cree que la GH es liberada principalmente a partir de células somatotrofas de la pituitaria anterior bajo la regulación coordinada de dos hormonas hipotalámicas, el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRF o GRF) y la somatostatina. Tanto la estimulación por el GHRF como la inhibición por la somatostatina de la liberación de la GH se produce mediante la implicación específica de receptores en la membrana celular del somatotrofo.

Recientemente se han incrementado las pruebas que sugieren que la liberación de GH también es estimulada por un grupo de péptidos cortos denominados péptidos liberadores de hormona del crecimiento (GHRP; GHRP-6, GHRP-2 [hexarelina]). Estos péptidos se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.411.890, en la publicación de patente PCT n° WO 89/07110, en la publicación de patente PCT n° WO 89/07111, en la publicación de patente PCT n° WO 93/04081, y en *J. Endocrinol. Invest.*, 15 (Supl. 4), 45 (1992). Estos péptidos funcionan uniéndose selectivamente a distintos receptores de la membrana celular del somatotrofo, el receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR). Un enfoque médicoquímico ha dado como resultado el diseño de varias clases de compuestos no peptídicos de bajo peso molecular activos por vía oral que se unen específicamente a este receptor y dan como resultado la liberación pulsátil de GH. Dichos compuestos que poseen una actividad secretagoga de la hormona del crecimiento se describen en, por ejemplo, los siguientes documentos: patente de EE.UU. n° 3.239.345; Patente de EE.UU. n° 4.036.979; Patente de EE.UU. n° 4.411.890; Patente de EE.UU. n° 5.206.235; Patente de EE.UU. n° 5.283.241; Patente de EE.UU. n° 5.284.841; Patente de EE.UU. n° 5.310.737; Patente de EE.UU. n° 5.317.017; Patente de EE.UU. n° 5.374.721; Patente de EE.UU. n° 5.430.144; Patente de EE.UU. n° 5.434.261; Patente de EE.UU. n° 5.438.136; Patente de EE.UU. n° 5.494.919; Patente de EE.UU. n° 5.494.920; Patente de EE.UU. n° 5.492.916; Publicación de patente EPO n° 0.144.230; Publicación de patente EPO n° 0.513.974; Publicación de patente PCT n° WO 94/07486; Publicación de patente PCT n° WO 94/08583; Publicación de patente PCT n° WO 94/11012; Publicación de patente PCT n° WO 94/13696; Publicación de patente PCT n° WO 94/19367; Publicación de patente PCT n° WO 95/03289; Publicación de patente PCT n° WO 95/03290; Publicación de patente PCT n° WO 95/09633; Publicación de patente PCT n° WO 95/11029; Publicación de patente PCT n° WO 95/12598; Publicación de patente PCT n° WO 95/13069; Publicación de patente PCT n° WO 95/14666; Publicación de patente PCT n° WO 95/16675; Publicación de patente PCT n° WO 95/16692; Publicación de patente PCT n° WO 95/17422; Publicación de patente PCT n° WO 95/17423; Publicación de patente PCT n° WO 95/34311; Publicación de patente PCT n° WO 96/02530; *Science*, 260, 1640-1643 (11 de junio de 1993); *Ann. Rep. Med. Chem.*, 28, 177-186 (1993); *Bioorg. Med. Chem. Ltrs.*, 4 (22), 2709-2714 (1994); y Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92, 7001-7005 (julio de 1995).

El uso de dichos agentes activos por vía oral que estimulan la liberación pulsátil de GH sería un avance significativo en el tratamiento de la deficiencia de hormona del crecimiento en niños y adultos, y también proporcionaría un beneficio sustancial en aquellas circunstancias en las que los efectos anabólicos de la GH podrían ser explotados clínicamente (por ejemplo, rehabilitación tras una fractura de cadera, en ancianos débiles y en pacientes en recuperación postoperatoria).

Los receptores de la membrana celular que son poco abundantes en las células pueden ser difíciles de aislar, clonar y caracterizar. En el pasado, los ensayos para identificar un receptor en una célula de mamífero o en un ovocito de rana han dependido generalmente de: 1) detectar directamente una interacción receptor-ligando, tal como mediante la unión de un ligando radiomarcado; o 2) detectar indirectamente la unión receptor-ligando detectando bien un suceso intracelular (tal como la movilización de calcio o la identificación de, por ejemplo, una corriente activada por calcio) o un suceso extracelular (tal como una secreción hormonal), que es la consecuencia de la unión del ligando a su receptor. La mayoría de los receptores clonados, que han sido aislados usando un ensayo de expresión funcional, se han basado en líneas celulares inmortalizadas o en tejidos derivados de tumores que están enriquecidos en el receptor de interés.

Existen numerosos receptores que no pueden ser identificados fácilmente usando estos tipos de ensayo, debido a: 1) una escasez de información bioquímica sobre la proteína; 2) la poca abundancia de receptores presentes en la célula; y/o 3) la carencia de una línea celular o de un material tumoral que exprese el receptor. Sería deseable desarrollar un ensayo que pueda usarse para identificar y caracterizar receptores celulares no susceptibles de estudio por medios convencionales.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento de ensayo para determinar la presencia de un ácido nucleico que codifica un receptor de un secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR) que comprende:

a) introducir un ácido nucleico sospechoso de codificar un GHSR en una célula que no expresa de forma natural el receptor en su membrana celular;

b) introducir una molécula detectora o un ácido nucleico que codifica una molécula detectora en la célula, en la que la molécula detectora responde directa o indirectamente a un suceso bioquímico activado por proteínas G;

c) poner en contacto la célula con un secretagogo de la hormona de crecimiento; y

d) determinar si el ácido nucleico codifica un GHSR monitorizando la molécula detectora.

Una forma de realización adicional de esta invención es un ensayo para determinar la presencia de un secretagogo de la hormona de crecimiento. Por lo tanto, esta invención también comprende un procedimiento para determinar la presencia de un secretagogo de la hormona de crecimiento que comprende:

a) introducir un ácido nucleico que codifica un GHSR en una célula que no expresa de forma natural el receptor en su membrana celular en unas condiciones tales que se exprese un GHSR;

b) introducir una molécula detectora o un ácido nucleico que codifica una molécula detectora en la célula, en la que la molécula detectora responde directa o indirectamente a un suceso bioquímico activado por proteínas G;

c) poner en contacto la célula con un compuesto sospechoso de ser un secretagogo de la hormona de crecimiento; y

d) determinar si el compuesto es un secretagogo de la hormona de crecimiento monitorizando la molécula detectora.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es el ADN del GHSR porcino (Tipo I) contenido en el Clon 7-3.

La Figura 2 es la secuencia de aminoácidos del GHSR porcino codificado por el ADN de la Figura 1.

La Figura 3 es el marco abierto de lectura completo del clon de Tipo 1, de la Figura 1.

La Figura 4 es el ADN del GHSR porcino (Tipo II) contenido en el Clon 1375.

La Figura 5 es la secuencia de aminoácidos del GHSR porcino (Tipo II) codificado por el ADN de la Figura 4.

La Figura 6 es el ADN del GHSR humano (Tipo I) contenido en el Clon 1146.

La Figura 7 es la secuencia de aminoácidos del GHSR humano (Tipo I) codificado por el ADN de la Figura 6.

La Figura 8 es el marco abierto de lectura completo del GHSR de Tipo 1, codificado por la secuencia ADN de la Figura 6.

La Figura 9 es el ADN del GHSR humano (Tipo II) contenido en el Clon 1141.

La Figura 10 es la secuencia de aminoácidos del GHSR humano (Tipo II) codificada por el Clon 1141.

La Figura 11 es el ADN del GHSR humano (Tipo I) contenido en el Clon 1143.

La Figura 12 es la secuencia de aminoácidos del GHSR humano (Tipo I) codificada por el Clon 1143.

La Figura 13 compara el ORF porcino de Tipo I (sin el iniciador MET del GHSR completo y sin 12 aminoácidos adicionales) con el dominio homólogo de los receptores porcinos de Tipo II.

La Figura 14 compara el dominio homólogo de los receptores humanos de Tipo I y Tipo II (la secuencia amino terminal carece del iniciador MET y de cuatro aminoácidos adicionales).

La Figura 15 compara los ORF de los receptores porcino de Tipo I y humano de Tipo I (la secuencia amino terminal carece del iniciador MET y de 12 aminoácidos adicionales).

La Figura 16 compara los receptores completos porcino de Tipo II y humano de Tipo II.

ES 2 268 713 T3

La Figura 17 es un diagrama esquemático que representa el mapa físico de los clones de ADNc del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento porcino y humano.

5 La Figura 18 es un gráfico que muestra la farmacología de los receptores expresados de secretagogos de la hormona de crecimiento porcinos y humanos en ovocitos de *Xenopus* usando el ensayo de bioluminiscencia con aequorina.

10 La Figura 19 es una tabla que muestra la farmacología de los receptores expresados de secretagogos de la hormona de crecimiento porcinos y humanos en ovocitos de *Xenopus* usando el ensayo de bioluminiscencia con aequorina y varios secretagogos.

15 La Figura 20 es un gráfico que representa la farmacología del receptor porcino puro de secretagogos de la hormona de crecimiento expresado en células COS-7 usando el ensayo de unión del Compuesto A marcado con ^{35}S .

20 La Figura 21 es una tabla que representa el análisis de competición con el receptor porcino de secretagogos de la hormona de crecimiento puro expresado en células COS-7 usando el ensayo de unión del Compuesto A marcado con ^{35}S y diversos secretagogos y otros ligandos de receptores acoplados a proteínas G (receptores GPC) en un ensayo de competición.

25 La Figura 22 es la secuencia de aminoácidos del GHSR humano completo (Tipo I) codificado por el clon 11304.

Las Figuras 23A y 23B son gráficos de la medida de la unión del [^{35}S]-Compuesto A a membranas de pituitaria anterior porcina.

30 23A muestra los resultados de los experimentos de saturación usando una cantidad fija de membrana. 23B muestra las isotermas de saturación analizadas mediante un análisis de Scatchard.

La Figura 24 muestra la inhibición de la unión del [^{35}S]-Compuesto A a membranas de pituitaria anterior porcina mediante diversos compuestos.

35 La Figura 25 muestra el efecto del GHRP-6 sobre la unión específica del [^{35}S]-Compuesto A a membranas de pituitaria anterior porcina en el equilibrio.

La Figura 26 muestra los efectos de GTP- γ -S y de nucleótido sobre la unión específica del [^{35}S]-Compuesto A a membranas de pituitaria anterior porcina.

40 La Figura 27 es la secuencia de ADN del GHSR de rata desde el codón de inicio Met hasta el codón de terminación. Esta secuencia incluye un intrón.

La Figura 28 es el marco abierto de lectura sólo del GHSR de rata de la Figura 27.

La Figura 29 es la secuencia de aminoácidos deducida del ORF de la Figura 28.

La Figura 30 muestra la expresión del GHSR funcional de rata en células HEK-293 transfectadas.

45 Según se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se aplican las siguientes definiciones:

“Ligandos” son cualquier molécula que se une a un GHSR de esta invención. Los ligandos pueden tener una actividad agonista, agonista parcial, antagonista parcial o antagonista.

50 “Secretagogo de la hormona de crecimiento” o “GHS” es cualquier compuesto o agente que estimula o aumenta directa o indirectamente la liberación de la hormona del crecimiento en un animal.

55 “Compuesto A” es (N-[1(R)-[1,2-dihidro-1-metansulfonilspiro[3H-indol-3,4'-piperidin]-1'-il]carbonil]-2-(fenilmetiloxi)-etil]-2-amino-2-metil-propanamida, descrito en Patchett y col., 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7001-7005.

“Compuesto B” es (3-amino-3-metil-N-(2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1{2'-(1H-tetrazol-5-il)(1,1'-bifenil)-4-il]metil}-1H-1-benzacepin-3(R)il)-butanamida, descrito en Patchett y col., 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7001-7005.

Esta invención se refiere a ensayos de receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento.

60 Se descubrió que las proteínas de esa invención tenían unas características estructurales que eran típicas del dominio 7-transmembrana (TM) que contiene receptores de la superfamilia de receptores unidos a proteínas G (GPC-R o receptores 7-TM). Por lo tanto, los receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento forman nuevos miembros de la familia de receptores GPC-R. Se encontró que los receptores intactos de esta invención tenían las características generales de los GPC-R, incluyendo siete regiones transmembrana, tres bucles intra y extracelulares y la secuencia distintiva de la proteína GPC-R. Los dominios transmembrana y la secuencia distintiva del receptor GPC están marcados en las secuencias proteicas del receptor de GHS de Tipo I en las Figuras 3 y 8. No todas las regiones son necesarias para su funcionamiento.

ES 2 268 713 T3

Los GHSR comparten cierta homología de secuencia con receptores GPC clonados previamente, incluyendo el receptor de neurotensina de rata y humano (aproximadamente un 32% de identidad) y el receptor de TRH de rata y humano (aproximadamente un 30% de identidad).

5 Los GHSR se aislaron y caracterizaron usando técnicas de clonación y expresión en ovocitos de *Xenopus*. La clonación fue difícil debido a tres factores. En primer lugar, antes de esta invención había muy poca información disponible sobre las características bioquímicas y las vías intracelulares efectoras/de señalización de las proteínas. Por lo tanto, las metodologías de clonación que dependen del uso de información sobre la secuencia proteica para el diseño de oligonucleótidos degenerados para cribar bibliotecas de ADNc o que utilizan la PCR no pudieron utilizarse de forma eficaz. Por lo tanto, se necesitaba determinar la bioactividad del receptor.

15 En segundo lugar, el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento no aparece abundantemente - está presente en la membrana celular en una concentración aproximadamente 10 veces menor que la mayoría de los demás receptores de membrana. Con objeto de clonar satisfactoriamente los receptores, se han tomado unas minuciosas precauciones para asegurar que el GHSR estaba representado en una biblioteca de ADNc que se iba a cribar. Esto requería: 1) el aislamiento de ARNm poli(A)+ intacto, no degradado y puro; 2) la optimización de la síntesis de ADNc para maximizar la producción de moléculas completas; y 3) era necesario cribar una biblioteca de un tamaño mayor al normal (aproximadamente de 0,5 a 1×10^7 clones) para aumentar la probabilidad de poder obtener un clon funcional de ADNc.

20 En tercer lugar, no se conoce ninguna línea celular permanente que exprese estos receptores. Por lo tanto, tuvo que usarse tejido primario de pituitaria como fuente de ARNm o de proteínas. Esto es una dificultad añadida porque la mayoría de los tejidos primarios expresan unas cantidades menores de un receptor dado que una línea celular inmortalizada o tejidos tumorales. Además, la extracción quirúrgica de una pituitaria porcina y la extracción de ARNm biológicamente activo intacto para la construcción de una biblioteca de expresión de ADNc es considerablemente más difícil que la extracción del ARNm a partir de una línea celular de cultivo tisular. Junto con la necesidad de obtener continuamente tejido nuevo, están los problemas relacionados con la variabilidad intrínseca entre animales y entre preparaciones.

30 Un aspecto de esta invención está dirigido al desarrollo de un ensayo de cribado extremadamente sensible, consistente, fiable y de alto rendimiento, que podría ser usado para identificar porciones de una biblioteca de ADNc que codifica el receptor.

35 La capacidad para identificar ADNc que codifican receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento dependía de dos descubrimientos realizados según ésta invención: 1) que los sucesos de unión receptor de secretagogo de la hormona de crecimiento-ligando son transducidos a través de proteínas G; y 2) que una subunidad de una proteína G en particular, tal como $G\alpha 11$, debe estar presente en las células con objeto de detectar la actividad del receptor. Sólo cuando se realizaron estos dos descubrimientos pudo diseñarse un ensayo para detectar la presencia de las secuencias de ADN que codifican el GHSR.

40 *Determinación de que el GHSR es diferente del Receptor de la Hormona de Crecimiento*

Se desarrolló un ensayo con un radioreceptor usando Compuesto A de alta actividad específica (700-1.100 Ci/mmol) marcado con $[^{35}\text{S}]$ (un GHS conocido) como ligando. Se detectó una unión saturable de alta afinidad en las membranas de pituitaria anterior porcina (Figura 23A). El análisis de Scatchard (Figura 23B) indicó la presencia de una única clase de sitios de alta afinidad con una constante de disociación aparente (K_D) de 161 ± 11 pM y una concentración ($B_{\text{máx}}$) de $6,3 \pm 0,6$ fmol/mg de proteína ($n = 4$). Se detectó una unión de alta afinidad específica similar en membranas de pituitaria de rata, indicando un valor de K_D de 180 ± 9 pM y una $B_{\text{máx}}$ de $2,3 \pm 1,1$ fmol/mg de proteína ($n = 3$).

50 La unión de alta afinidad al GHSR forma otro aspecto más de esta invención. Esta invención también está dirigida a un procedimiento para identificar nuevas proteínas del GHSR que comprende marcar un ligando conocido, exponerlo a una supuesta proteína de GHSR y determinar si se produce la unión.

55 La especificidad de la unión del $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A se estableció determinando la capacidad de los secretagogos de la GH de competir con el radioligando por los sitios de unión (Figura 24). El Compuesto A no marcado desplazó completamente al $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A de los sitios de unión específicos con una constante de inhibición, K_i , de 240 pM, que es similar al valor de K_D determinado mediante un análisis de Scatchard. Otros GHS, el GHRP-6 (K_i 6,3 nM), y el Compuesto B antagonista de péptidos (K_i 63 nM) tuvieron unas afinidades del 3,8, el 0,6 y el 0,4%, respectivamente, respecto a las del Compuesto A. El Compuesto C, el estereoisómero biológicamente inactivo del Compuesto B, compitió débilmente con la unión del $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A. La isoterma de saturación para la unión del $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A analizada mediante una representación gráfica recíproca doble demostró que la inhibición del GHRP-6 fue superada por una concentración creciente del $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A (Figura 25). Este resultado muestra que el GHRP-6 interactúa competitivamente con el Compuesto A en el mismo sitio de unión. De forma similar, se demostró que el Compuesto B era un competidor de la unión del $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A. Los agonistas más potentes tuvieron las afinidades más altas por los sitios receptores de la pituitaria. Los compuestos que no compitieron con el $[^{35}\text{S}]$ -Compuesto A a $1 \mu\text{M}$ incluían GHRH, somatostatina, met-enkefalina, sustancia P, galanina, hormona liberadora de gonadotropinas, hormona liberadora de tirotropina, péptido liberador de gastrina, PHM-27, hormona estimulante de los melanocitos, polipéptido-38

ES 2 268 713 T3

activador de la adenilato ciclasa de pituitaria, fenoxibenzamina, dopamina, bromocriptina, metoxamina, benoxatán, isoproterenol, propanolol y clonidina.

Determinación de que el GHSR es un receptor de proteína G

5 Para estudiar si el sitio de unión específico del [³⁵S]-Compuesto A estaba unido a proteínas G, se estudiaron los efectos de los análogos estables de GTP GTP- γ -S y GMP-PNP sobre la unión del [³⁵S]-Compuesto A. Se encontró que GTP- γ -S y GMP-PNP eran potentes inhibidores de la unión del [³⁵S]-Compuesto A, con unos valores de IC₅₀ de 30 y 110 nM, respectivamente (Figura 26). ATP- γ -S era ineficaz. Además, en ausencia de Mg²⁺, sólo se detectó una
10 unión específica del 15-25% del [³⁵S]-Compuesto A en comparación con el control (Mg²⁺ 10 mM), lo que sugiere que la unión específica del [³⁵S]-Compuesto A requería la presencia de Mg²⁺ regula la liberación de GH *in vivo* no se une al sitio del Compuesto A. A partir de estos datos se puede concluir que el receptor está unido a proteínas G.

15 Cuando el GHSR está unido a un ligando (un secretagogo de la hormona de crecimiento), las proteínas G presentes en la célula activan la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), una enzima que libera moléculas de señalización intracelular (diacilglicerol y trifosfato de inositol), que a su vez inician una cascada de sucesos bioquímicos que promueven la movilización de calcio. Según esta invención, la detección de esta cascada bioquímica puede usarse como base para un ensayo.

20 En el ensayo de esta invención puede usarse prácticamente cualquier célula eucariota conveniente. Éstas incluirían ovocitos (los preferidos son los de *Xenopus sp.*), pero también pueden usarse líneas celulares, algunos Ejemplos de las líneas celulares preferidas son líneas celulares de mamíferos, incluyendo COS, HEK-293, CHO, HeLa, NS/0, CV-1, GC, GH3 y VERO.

25 Un componente importante del ensayo es una molécula detectora. Preferiblemente, la molécula detectora responde a un suceso intracelular que es parte de la cascada bioquímica iniciada por la unión GHS-GHSR. Una clase de moléculas detectoras preferidas puede responder a cambios en las concentraciones de calcio. Una molécula detectora preferida que responde a concentraciones de calcio es la aequorina (una fotoproteína de medusa) que actúa sobre el sustrato coelenteracina. Otras moléculas detectoras incluyen quelantes de calcio con capacidad fluorescente, tales
30 como FURA-2 e indo-1.

35 En la célula puede introducirse la propia molécula detectora o los nucleótidos que codifican la molécula detectora, en unas condiciones que permitan la expresión de la molécula detectora. Generalmente se prefiere introducir en la célula nucleótidos, tales como ADN que codifique la molécula detectora, en unas condiciones en las que la célula expresará la molécula detectora.

40 Las proteínas G heterotriméricas, formadas por las subunidades α , β y γ , sirven para transmitir información desde los receptores de la superficie celular hasta los efectores intracelulares, tales como la fosfolipasa C y la adenilato ciclasa. La subunidad α de la proteína G es un componente esencial de la vía de transducción intracelular de señales, activado por la interacción receptor-ligando. En el proceso de la activación del GPCR inducida por ligando, la subunidad $G\alpha$ de un complejo trimérico $G\alpha\beta\gamma$ intercambiará su GDP unido por GTP, y se disociará del heterodímero $\beta\gamma$. La proteína $G\alpha$ disociada sirve como transductor activo de señales, a menudo conjuntamente con el complejo $\beta\gamma$, iniciando así la activación de la vía de transducción intracelular de señales. Las subunidades $G\alpha$ se clasifican en subfamilias según la identidad de la secuencia y el principal tipo de efectores a los que se acoplan: G_{s-} activa la adenilato ciclasa,
45 $G_{i/o/l}$ inhibe la adenilato ciclasa, $G_{q/11}$ activa la PI-PLC, y $G_{12/13}$ es un efector desconocido.

50 Se ha demostrado que la expresión de varios receptores en células heterólogas aumenta mediante la coexpresión de ciertas subunidades $G\alpha$. Esta observación fue la base de la razón para usar las subunidades $G\alpha$ de varias subfamilias junto con una fuente de GHSR (ARNm poliA⁺ porcino) para probar si podía medirse una respuesta funcional inducida por GHS en el sistema de ovocitos de *Xenopus*. Las respuestas inducidas por GHS se detectaron, y se encontró que eran estrictamente dependientes de la coexpresión de $G\alpha 11$, un descubrimiento sin precedentes que esboza la especificidad de la interacción. El descubrimiento de que la expresión del GPCR podría ser completamente dependiente de la adición de una única subunidad de proteína G era inesperado, dado que en todos los trabajos publicados previamente la adición de una subunidad de una proteína G modulaba una actividad ya existente. Aquí se restableció completamente
55 una señal previamente ausente. Este descubrimiento indicó que la ausencia de una señal en huevos de *Xenopus* era completamente dependiente de una subunidad de una proteína G como factor limitante.

60 Para realizar el ensayo puede añadirse la propia subunidad o un ácido nucleico que codifique las subunidad, o ambos, y no es necesario que los sucesos de adición se produzcan conjuntamente.

65 A continuación se introduce en la célula un ácido nucleico o un conjunto de ácidos nucleicos, en el que al menos un ácido nucleico es sospechoso de codificar un GHSR. Cuando se está intentando identificar un posible gen de GHSR a partir de una biblioteca grande, a menudo es más eficaz usar un conjunto de ácidos nucleicos, siendo cada ácido nucleico diferente de los demás ácidos nucleicos del conjunto.

Después de que el ácido o ácidos nucleicos sospechosos de codificar un GHSR han sido introducidos en la célula, la célula se expone a un secretagogo conocido de la hormona del crecimiento, tal como el Compuesto A (L-163.191).

ES 2 268 713 T3

También puede usarse cualquier otro secretagogo de la hormona del crecimiento. Algunos preferidos incluyen: N-[1 (R)-[(1,2-dihidro-1-metansulfonilspiro[3H-indol-3,4'-piperidin]-1'-il)carbonil]-2-(fenilmetiloxi)etil]-2-amino-2-metilpropanamida, o 3-amino-3-metil-N-(2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1-[[2'-1H-tetrazol-5-il](1,1'-bifenil)-4-il]metil)-1H-1-benzacepin-3(R)-il-butanamida, o un compuesto descrito en, por ejemplo, los siguientes documentos: patente de EE.UU. N° 3.239.345; Patente de EE.UU. N° 4.036.979; Patente de EE.UU. N° 4.411.890; Patente de EE.UU. N° 5.206.235; Patente de EE.UU. N° 5.283.241; Patente de EE.UU. N° 5.284.841; Patente de EE.UU. N° 5.310.737; Patente de EE.UU. N° 5.317.017; Patente de EE.UU. N° 5.374.721; Patente de EE.UU. N° 5.430.144; Patente de EE.UU. N° 5.434.261; Patente de EE.UU. N° 5.438.136; Patente de EE.UU. N° 5.494.919; Patente de EE.UU. N° 5.494.920; Patente de EE.UU. N° 5.492.916; Publicación de Patente EPO N° 0.144.230; Publicación de Patente EPO N° 0.513.974; Publicación de Patente PCT N° WO 94/07486; Publicación de Patente PCT N° WO 94/08583; Publicación de Patente PCT N° WO 94/11012; Publicación de Patente PCT N° WO 94/13696; Publicación de Patente PCT N° WO 94/19367; Publicación de Patente PCT N° WO 95/03289; Publicación de Patente PCT N° WO 95/03290; Publicación de Patente PCT N° WO 95/09633; Publicación de Patente PCT N° WO 95/11029; Publicación de Patente PCT N° WO 95/12598; Publicación de Patente PCT N° WO 95/13069; Publicación de Patente PCT N° WO 95/14666; Publicación de Patente PCT N° WO 95/16675; Publicación de Patente PCT N° WO 95/16692; Publicación de Patente PCT N° WO 95/17422; Publicación de Patente PCT N° WO 95/17423; Publicación de Patente PCT N° WO 95/34311; Publicación de Patente PCT N° WO 96/02530; *Science*, 260, 1640-1643 (11 de junio de 1993); *Ann. Rep. Med. Chem.*, 28, 177-186 (1993); *Bioorg. Med. Chem. Ltrs.* 4 (22), 2709-2714 (1994); y *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92, 7001-7005 (julio de 1995), o cualquier otro secretagogo de la hormona del crecimiento.

Si uno o más de los ácidos nucleicos codifica un GHSR, entonces el ligando secretagogo se unirá al receptor, la proteína G se activará, el nivel de calcio fluctuará y la molécula detectora cambiará de forma que pueda ser un monitorizada. Para el sistema que usa aequorina y coelenteracina, la unión receptor-GHS producirá una bioluminiscencia medible.

Si el procedimiento usó un conjunto complejo de ácidos nucleicos, uno o más de los cuales podría codificar el receptor, entonces será necesario un cribado adicional para determinar qué ácido nucleico es responsable de codificar el GHSR. Una vez que se encuentra un resultado positivo, el procedimiento puede repetirse con una subdivisión del conjunto de ácidos nucleicos (por ejemplo, comenzando con aproximadamente 10.000 ácidos nucleicos, y usando después aproximadamente 1.000, después aproximadamente 500, después aproximadamente 50, y después puro). En este procedimiento se prefieren los conjuntos de ARN.

Usando este protocolo general en ovocitos de *Xenopus* con una biblioteca de expresión de ADNc porcino, se identificó que el Clon 7-3 contenía un ácido nucleico que codificaba para un receptor de un secretagogo de la hormona del crecimiento porcino. El clon tiene un tamaño de aproximadamente 1,5 kb, y en dirección 3' del supuesto iniciador metionina (MET), contiene un marco abierto de lectura (ORF) que codifica 302 aminoácidos ($M_r = 34.516$). El ADN y la secuencia deducida de aminoácidos se proporcionan en las Figuras 1 y 2. Cuando se realiza un análisis de hidropatía (por ejemplo, Kyte-Doolittle; Eisenberg, Schwartz, Komaron y Wall) sobre la secuencia proteica del clon 7-3, sólo hay presentes 6 dominios transmembrana predichos en dirección 3' del supuesto iniciador MET. Sin embargo, la traducción del ORF más largo codificado en el clon 7-3 codifica una proteína de 353 aminoácidos ($M_r = 39.787$), pero está desprovisto de un aparente iniciador MET (Figura 3). Siete segmentos transmembrana están codificados en la proteína de 353 aminoácidos más larga, en la que está ausente un codón MET de inicio de la traducción localizado en dirección 5' de TMI (Figura 3). Por lo tanto, el clon 7-3 aparece truncado en su amino terminal, pero es completamente funcional, lo que demuestra que el clon 7-3 es un equivalente funcional de un GHSR natural.

El clon de ADNc resultante (o porciones más cortas de, por ejemplo, sólo 15 nucleótidos de longitud) puede usarse para sondear bibliotecas en condiciones de hibridación para encontrar otros receptores que sean lo suficientemente similares como para que los ácidos nucleicos puedan hibridar, y es particularmente útil para el cribado de bibliotecas de otras especies. Usando este procedimiento se han clonado ADNc de GHSR adicionales humano, porcino y de rata, y se ha clonado su secuencia de nucleótidos. En esta etapa, el experto habitual en la materia apreciará que las condiciones de hibridación pueden variar desde muy rigurosas hasta relajadas. La temperatura apropiada, las concentraciones salinas y los tampones son bien conocidos. Según se usa en este documento, condiciones de "lavado post-hibridacional convencional" significa 6 x SSC a 55°C. Condiciones de "lavado post-hibridacional relajadas" significa 6 x SSC a 30°C.

Se hibridaron una biblioteca de pituitaria porcina, una biblioteca de pituitaria humana y una biblioteca de pituitaria de rata con un ADNc radiomarcado derivado del marco abierto de lectura del clon 7-3 de GHSR porcino. Se aislaron veintiún clones de ADNc de GHSR humano positivos, y cinco conjuntos de bibliotecas porcinas dieron una fuerte señal de hibridación, y contenían clones con insertos mayores que el clon 7-3, a juzgar por el tamaño de su inserto en las inmunotransferencias Southern. También se aisló un único clon de ADNc de rata.

El análisis de la secuencia de nucleótidos reveló dos tipos de ADNc para los ADNc del GHSR tanto humano como porcino. El primero (Tipo I) codifica una proteína representada por el clon 7-3, que codifica 7 dominios TM (la secuencia de aminoácidos de un clon humano completo 11304 se muestra en la Figura 22). El marco abierto de lectura completo se extiende 13 aminoácidos más allá del mayor marco abierto de lectura predicho del clon 7-3, (353 aminoácidos).

ES 2 268 713 T3

El segundo (tipo II) diverge en su secuencia de nucleótidos del ADNc de tipo I en su extremo 3', en el segundo aminoácido predicho del TM-6. En los ADNc de tipo II, el TM-6 está truncado y fusionado con un corto marco de lectura contiguo de sólo 24 aminoácidos, seguido por el codón de terminación de la traducción. El clon porcino 1375 es un ejemplo de un ADNc de Tipo II (Figuras 4 y 5). Estos 24 aminoácidos más allá del TM-6 están altamente conservados cuando se compara el ADNc humano y porcino. El ADN y las secuencias de aminoácidos del GHSR humanos de Tipo I y II se proporcionan en las Figuras 6-12 y 22. Se aísla un ADNc predicho completo que codifica el receptor humano de Tipo I, es decir, una molécula que codifica 7 dominios TM con un iniciador MET en un contexto favorable, precedida por un codón de terminación en marco, y se denomina clon 11304. El ORF predicho del clon 11304 para el GHSR completo de Tipo I mide 366 aminoácidos ($M_r = 41.198$; Figura 22). Un ADNc completo humano de Tipo II codifica un polipéptido de 289 aminoácidos ($M_r = 32.156$; Figuras 9 y 10). Las alineaciones de las secuencias realizadas tanto a nivel de ácidos nucleicos como de proteínas muestran que los GHSR de Tipo I y II están altamente relacionados entre sí y a través de las especies (Figuras 13-16). Las secuencias del GHSR humano y porcino son idénticas en un 93%, y similares en un 98% a nivel de aminoácidos.

La secuencia de nucleótidos que codifica la extensión amino terminal ausente del clon 7-3 porcino de Tipo I procede del clon humano completo de Tipo I, así como del ADNc humano y porcino de Tipo II. El marco de lectura de los clones completos se extendía 13 aminoácidos más allá de la secuencia amino terminal del clon 7-3, y esta secuencia estaba conservada en 12/13 residuos de aminoácidos cuando se comparaba entre la humana y la porcina. La extensión amino terminal incluye un iniciador de la traducción metionina en un contexto favorable según la regla de Kosak, estando interrumpido el marco de lectura algo más hacia 5' por un codón de terminación. En la Figura 17 se proporciona un mapa físico esquemático de los clones de ADNc de Tipo I y II humanos y porcinos.

El clon de rata también se investigó adicionalmente. El análisis de la secuencia reveló la presencia de una secuencia intrónica no codificante en el nt 790 correspondiente a un sitio de corte y empalme (véanse las Figuras 27, 28 y 29.) El sitio de corte y empalme G/GT aparece dos aminoácidos después de que termine el dominio transmembrana 5 predicho (leucina 263), dividiendo así el GHSR de rata en un segmento amino terminal (que contiene el dominio extracelular, TM-1 hasta TM-5, y los dos primeros bucles intra y extracelulares) y un segmento carboxi terminal (que contiene TM-6, TM-7, los terceros bucles intra y extracelulares, y el dominio intracelular). El punto de inserción y las secuencias de ADN flanqueantes están altamente conservados, y también están presentes en ambos ADNc humano y porcino de Tipo I y II.

Una comparación del marco abierto de lectura completo que codifica la proteína del GHSR de rata entre homólogos humanos y porcinos revela un alto grado de identidad en la secuencia (de rata frente a humano, 95,1%; de rata frente a porcino, 93,4%).

Los ARNc humano y porcino de Tipo I expresados en ovocitos eran funcionales y respondían a concentraciones del Compuesto A que variaban desde $1 \mu\text{M}$ hasta tan bajas como $0,1 \text{ nM}$ en el ensayo de bioluminiscencia con aequorina. Los ARNc humano o porcino derivados del Tipo II que están truncados en el TM-6 no dieron una respuesta cuando fueron inyectados en ovocitos, y éstos representan un subtipo de receptor que puede unirse al GHS, pero que no puede activar de forma eficaz la vía de transducción de señales intracelular. Además, el receptor de Tipo II puede interactuar con otras proteínas, y por lo tanto reconstituir un GHSR funcional. Unas proteínas tales como éstas, que pueden tener una actividad de unión de ligando pero que no son activas en la transducción de señales, son particularmente útiles en los ensayos de unión de ligando. En estos casos también se puede sobre expresar una proteína mutante en la membrana celular y probar la capacidad de unión de los supuestos ligandos marcados. Usando un mutante no señalizador que está constitutivamente en un estado de alta afinidad puede medirse la unión, pero no daría como resultado consecuencias metabólicas adversas. Por lo tanto, el uso de mutantes no señalizadores es un aspecto importante de esta invención.

La caracterización farmacológica de los receptores humano de Tipo I, porcino de Tipo I y de rata en el ensayo de bioluminiscencia con aequorina en ovocitos se resume en las Figuras 18, 19 y 30. Los GHS bioactivos peptidilo y no peptidilo eran activos en un rango de orden de potencia similar al observado para el receptor de pituitaria natural. Una prueba confirmatoria independiente de que el GHSR de Tipo I (mostrado para el clon porcino 7-3) codifica un GHSR completamente funcional es aportada por el descubrimiento de que cuando el clon 7-3 es expresado temporalmente en células COS-7 de mamífero, se observa una unión de alta afinidad ($K_D \sim 0,2 \text{ nM}$), saturable ($B_{\text{máx}} \sim 80 \text{ fmol/mg}$ de proteína) y específica ($> 90\%$ desplazado por Compuesto A no marcado 50 nM) para el ^{35}S -Compuesto A (Figuras 20-21).

Variando los parámetros de los ensayos anteriores se pueden buscar otras incógnitas. Por ejemplo, en el ensayo que detecta si hay presente un ácido nucleico que codifica un GHSR, se puede modificar el ensayo de forma que detecte si hay presente un GHS. En esta forma de realización se introduce en la célula un ácido nucleico que codifica un GHSR, así como un ácido nucleico que codifica una molécula detectora, y una subunidad de una proteína G. La célula se pone en contacto con al menos un compuesto que es un supuesto GHS. Si el compuesto es un GHS, entonces el GHS se unirá al GHSR, y los sucesos intracelulares resultantes pueden ser detectados monitorizando la molécula detectora. Si el compuesto no es un GHS, entonces no se detectará dicha actividad. Este ensayo de GHS forma otro aspecto más de esta invención.

Se ha demostrado que la expresión de varios receptores en células heterólogas está aumentada por la coexpresión de ciertas subunidades $G\alpha$. Esta observación formó la base de la razón de usar las subunidades $G\alpha$ de varias subfamilias junto con una fuente de GHSR (ARNm poliA+ porcino) para probar si podía medirse una respuesta funcional inducida

ES 2 268 713 T3

por GHS en el sistema de ovocitos de *Xenopus*. Las respuestas inducidas por GHS se detectaron, y se descubrió que eran estrictamente dependientes de la coexpresión de $G\alpha 11$, un descubrimiento sin precedentes que esboza la especificidad de la interacción. Por lo tanto, otro aspecto de esta invención es un procedimiento para detectar una respuesta ante GHS que comprende coexpresar una subunidad de una proteína $G\alpha 11$ en una célula que también expresa un GHSR, exponer la célula a un GHS, y detectar la respuesta.

La presencia de $G\alpha 11$ era esencial al usar ARN poliA+ o conjuntos de ARNc complejos (es decir, 10.000 ARNc). Sin embargo, una vez que se obtuvo un clon puro, ya no era esencial el requisito de la adición de la proteína G. Esto indica que la necesidad de la adición de la proteína G dependía de la pureza del ácido nucleico, requiriendo el ensayo más sensible la adición de la subunidad $G\alpha$.

Los ligandos detectados usando los ensayos descritos en este documento pueden usarse en el tratamiento de dolencias que aparecen cuando hay una escasez de hormona de crecimiento, tales como los observados en niños deficientes en hormona de crecimiento, pacientes ancianos con un deterioro musculoesquelético y en recuperación tras una fractura de cadera, pacientes con enfermedades neurodegenerativas y pacientes en recuperación de una cirugía de derivación coronaria, y en la osteoporosis.

Puede usarse diagnósticamente un receptor de GHS, preferiblemente inmovilizado sobre un soporte sólido, para la determinación de la concentración de secretagogos de la hormona de crecimiento, o metabolitos de los mismos, en fluidos fisiológicos, por ejemplo, fluidos corporales, incluyendo suero y extractos tisulares, como por ejemplo en pacientes que están en tratamiento con un secretagogo de la hormona de crecimiento.

La administración de un receptor de GHS aún paciente también puede emplearse con el propósito de: amplificar el efecto neto de un secretagogo de la hormona de crecimiento proporcionando una señal retrógrada aumentada tras la administración del secretagogo de la hormona de crecimiento, disminuyendo así la dosis requerida del secretagogo de la hormona de crecimiento; o disminuyendo el efecto de una sobredosis de un secretagogo de la hormona de crecimiento durante el tratamiento.

Los siguientes Ejemplos no limitantes se presentan para ilustrar mejor la invención.

Ejemplo 1

Preparación del radioligando de alta actividad específica [35 S]-Compuesto A

Se preparó [35 S]-Compuesto A a partir de un precursor apropiado, N-[1(R)-[(1,2-dihidroespiro[3H-indol-3,4'-piperidin]-1'-il)-carbonil]-2-(fenil-metiloxi)etil]-2-amino-t-butoxicarbonil-2-metilpropanamida, usando cloruro de metano [35 S]sulfonilo, según describen Dean DC, y col., 1995, en: Allen J, Voges R (eds) *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*, John Wiley & Sons, Nueva York, págs. 795-801. La purificación mediante HPLC semipreparativa (columna Zorbax SB-fenilo, MeOH/agua al 68%, TFA al 0,1%, 5 ml/min) fue seguida por una escisión con N-t-BOC usando ácido trifluoroacético al 15% en diclorometano (25°C, 3 h) para dar [metilsulfonil- 35 S] Compuesto A con un rendimiento prácticamente cuantitativo. La purificación mediante HPLC (columna Hamilton PRP-1 de 4,6 x 250 mm, gradiente lineal del 50-75% de metanol-agua con HCl 1 mM durante 30 min, 1,3 ml/min) proporcionó el ligando con una pureza radioquímica >99%. La estructura se estableció mediante coelución en HPLC con Compuesto A sin marcar y mediante un análisis espectral de masas. El último procedimiento también indicó una actividad específica de ~ 1.000 Ci/mmol.

Ejemplo 2

Preparación de membranas de pituitaria

Se homogeneizaron glándulas pituitarias anteriores congeladas de cerdos macho (50-80 kg) o de ratas Wistar macho (150-200 g) en un homogenizador de tejidos, en tampón enfriado con hielo (tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2,5 mM, albúmina de suero bovino al 0,1% y 30 µg/ml de bacitracina). Los homogeneizados se centrifugaron durante 5 min a 1.400 x g, y los sobrenadantes resultantes se centrifugaron entonces a 34.000 x g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron en el mismo tampón hasta 1.500 µg de proteína/ml y se almacenaron a -80°C. Las proteínas se determinaron mediante un método Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Ejemplo 3

Ensayo de unión al receptor

La disolución de unión convencional contenía: 400 µl de tampón de Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2,5 mM y [35 S]-Compuesto A 100 pM. Se añadieron las membranas de pituitaria (100 µl, 150 µg de proteína) para iniciar la reacción de unión. Las alícuotas se incubaron a 20°C durante 60 min, y el radioligando unido se separó del libre mediante filtración a través de filtros GF/C previamente tratados con un 0,5% de polietilenoimina en un cosechador celular Brandel. Los filtros se lavaron tres veces con 3 ml de tampón enfriado con hielo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2,5 mM y 0,015% de Triton X-100) y la radioactividad de los filtros se contó en Aquasol 2. La unión específica se definió como la diferencia entre la unión total y la unión no específica ensayadas

ES 2 268 713 T3

en Compuesto A 500 nM no marcado. Las uniones específicas fueron del 65-85 y del 45-60% de la unión total en membranas porcina y de rata, respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los experimentos se repitieron al menos tres veces.

5 Ejemplo 4

Preparación y selección de los ovocitos

Se aislaron ovocitos de *Xenopus laevis* y se inyectaron usando procedimientos convencionales previamente descritos en Arena, y col., 1991, *Mol. Pharmacol.* 40, 368-374, que se incorpora al presente documento como referencia. Se anestesiaron ranas *Xenopus laevis* adultas hembras (adquiridas en Xenopus One, Ann Arbor, MI) con metanosulfonato de tricafina al 0,17%, y se extirparon quirúrgicamente los ovarios y se colocaron en una placa de cultivo de 60 mm (Falcon) que contenía medio OR-2 sin calcio (NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, piruvato sódico 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, 100 μ/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomina, HEPES 5 mM, pH = 7,5; ND-96 de Specialty Media, NJ). Los lóbulos ováricos se abrieron, se lavaron varias veces, y los ovocitos fueron liberados de sus sacos mediante digestión con colagenasa A (Boehringer-Mannheim; al 0,2% durante 2-3 horas a 8°C) en OR-2 sin calcio. Cuando se había eliminado aproximadamente el 50% de las capas foliculares, se seleccionaron ovocitos en las Etapas V y VI y se colocaron en ND-86 con calcio (NaCl 86 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1,8 mM, piruvato sódico 2,5 mM, teofilina 0,5 mM, gentamicina 0,1 mM, HEPES 5 mM [pH = 7,5]). Para cada ronda de inyecciones, típicamente se probó previamente la capacidad de 3-5 ranas de expresar un receptor de control unido a proteínas G (receptor de la hormona liberadora de gonadotropina humana) y mostraron una consistente vía de señalización intracelular mediante fosfolipasa C (incubación con suero de pollo al 1%, que promueve la movilización de calcio mediante una activación de la fosfolipasa C). Basándonos en estos resultados se eligieron 1-2 ranas para la inyección del conjunto de bibliotecas (50 nL de ARNc a una concentración de 25 ng (conjuntos complejos) a 0,5 ng (clon puro) por ovocito, habitualmente de 24 a 48 horas tras el aislamiento de los ovocitos.

Ejemplo 5

Aislamiento del ARNm

Se preparó ARN total de pituitarias (criogenizado en nitrógeno líquido a los 1-2 minutos del sacrificio del animal) porcinas (50-80 kg, raza Yorkshire) mediante un procedimiento modificado de tiocianato de fenol:guanidinio (Chomczynski, y col, 1987 *Anal. Biochem.* 162, 156-159, que se incorpora al presente documento como referencia), usando el reactivo TRI-Reagent LS según las instrucciones del fabricante (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). Típicamente se obtuvieron 5 mg de ARN total a partir de 3,5 g de peso en húmedo de tejido de pituitaria. El ARN poli (A)+ se aisló a partir del ARN total mediante una cromatografía en columna (dos pases) en oligo (dT) celulosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). El rendimiento del ARNm poli (A)+ a partir del ARN total fue habitualmente del 0,5%. El ARN de otros tejidos se aisló de forma similar.

40 Ejemplo 6

Construcción de la biblioteca de ADNc

Se sintetizó ADNc de primera hebra a partir de ARNm poli (A)+ usando una transcriptasa inversa ARNasa (-) M-MLV (Superscript, GIBCOBRL, Gaithersburg, MD) según las instrucciones del fabricante con un cebador-adaptador oligo (dT)/Not I. Tras la síntesis del ADNc de segunda hebra, el ADNc de doble hebra se sometió a las siguientes etapas: 1) ligado a adaptadores EcoR I, 2) digestión con Not I, y 3) enriquecimiento para ADNc grandes y eliminación del exceso de adaptadores mediante una cromatografía de filtración en gel en una columna Sephacryl S-500 (Pharmacia). Las fracciones correspondientes a los ADNc de alto peso molecular se ligaron a pSV-7 digerido con EcoR I/Not I, un vector de expresión eucariota capaz de expresar ADNc clonado en células de mamífero mediante transfección (conducida por el promotor SV-40) y en ovocitos usando transcritos *in vitro* (iniciada a partir del promotor de la ARN polimerasa T7). El pSV-7 se construyó reemplazando el sitio de clonación múltiple de pSG-5 (Stratagene, La Jolla, CA; Green, S. y col., 1988 *Nucleic Acids Res.* 16:369, que se incorpora al presente documento como referencia), por un sitio de clonación múltiple expandido. El ligado vector:ADNc se transformó en la cepa de *E. coli* DH10B (GIBCO-BRL) mediante electroporación con una eficacia de transformación de 1×10^6 ufp/10 ng de ADNc de doble hebra. La biblioteca contenía aproximadamente 3×10^6 clones independientes, de los que más del 95% tenían insertos con un tamaño medio que se aproximaba a 1,65 kb (intervalo, de 0,8-2,8 kb).

Las reservas de biblioteca sin amplificar se congelaron en glicerol a -70°C hasta que se necesitaron. Las alícuotas de la biblioteca se amplificaron una vez antes del cribado mediante una modificación de un procedimiento en estado sólido (Kriegler, M. en *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* Stockton Press, NY 1990). Las reservas de biblioteca se valoraron en placas LB, y después se añadió el equivalente a 500-1.000 colonias a 13 ml de 2 x medio YT que contenía agarosa al 0,3% y 100 μg/ml de carbenicilina en un tubo de polipropileno de 14 ml de fondo redondo (Falcon). La suspensión bacteriana se enfrió en un baño de hielo húmedo durante 1 hora para solidificar la suspensión, y después se hizo crecer en vertical a 37°C durante 24 horas. Las colonias bacterianas resultantes se recogieron mediante centrifugación a 2000 x g a RT durante 10 min, se resuspendieron en 3 ml de 2X YT/carbenicilina. Se tomaron alícuotas para las reservas congeladas (5%) y la preparación de ADN de plásmido.

ES 2 268 713 T3

Ejemplo 7

Preparación de ADN de plásmido y transcripción del ARNc

5 El ADN de plásmido se purificó a partir de sedimentos de bacterias cultivadas en estado sólido (1.000 conjuntos de 500 clones independientes cada uno) usando el kit Wizard Miniprep según las instrucciones del fabricante (Promega Biotech, Madison, WI). El rendimiento del ADN de plásmido a partir de una amplificación en estado sólido de 14 ml fue de 5-10 μg . En la preparación de la síntesis del ARNc, se digirieron 4 μg de ADN con Not I, y el subsiguiente ADN linealizado se libera de proteína de ARNasa mediante un tratamiento con proteinasa K (10 μg durante 1 hora a 10 37°C), seguido de dos extracciones con fenol, dos con cloroformo/isoamilo y dos precipitaciones con etanol. El ADN se resuspendió en aproximadamente 15 μl de agua exenta de ARNasa y se almacenó a -70°C hasta que se necesitaron. El ARNc se sintetizó usando un kit de Promega Biotech con modificaciones. Cada 50 μl de reacción contenían: 5 μl de plásmido linealizado (aproximadamente 1 μg), Tris-HCl 40 mM (pH = 7,5), MgCl_2 6 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10 mM, DTT 10 mM, 0,05 mg/ml de albúmina de suero bovino, 2 unidades/ml de ARNasin, 800 μM de cada uno de ATP, 15 CTP y UTP, GTP 200 μM , m7G(5')ppp(5')G 800 μM , 80 unidades de polimerasa T7 de ARN, y aproximadamente 20.000 cpm de ^{32}P -CTP como marca para la cuantificación del ARN sintetizado mediante precipitación con TCA. La reacción se incubó durante 3 horas a 30°C; se añadieron 20 unidades de ADNasa exenta de ARNasa, y se dejó continuar la incubación durante 15 min adicionales a 37°C. El ARNc se purificó mediante dos extracciones con fenol, 20 dos con cloroformo/isoamilo, dos precipitaciones con etanol, y se resuspendió a una concentración de 500 ng/ml en agua exenta de ARNasa inmediatamente antes de su uso.

Ejemplo 8

Ensayo de bioluminiscencia con aequorina (ABA) e identificación de los clones

25 El ABA requiere la inyección de ARNc del conjunto de bibliotecas (25 ng/huevo para tamaños de conjunto de 500 a 10.000) con ARNc de aequorina (2 ng/huevo) suplementado con la subunidad $G\alpha 11$ de una proteína G (2 ng/huevo). Para facilitar la estabilización de los transcritos sintéticos de los plásmidos de aequorina y $G\alpha 11$, se modificó el vector de expresión pCDNA-3 (denominado pCDNA-3v2) mediante la inserción (en el sitio de la enzima de restricción Apa I del policonector) de un casete para adjuntar un tramo de poli (A) en todos los ARNc que parten del promotor de la 30 polimerasa T7 de ARN. Este casete incluye (de 5' a 3'): un sitio Bgl II, pA (20) y un sitio Sfi I que puede usarse para la linealización del plásmido. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar un fragmento de ADN correspondiente al marco abierto de lectura (ORF) del ADNc de aequorina con una secuencia de iniciación de la traducción Kosak optimizada (Inouye, S. y col., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 3154-3158). Este ADN se ligó en pCDNA-3v2 linealizado con EcoR I y Kpn I en el sitio EcoR I/Kpn I de pCDNA-3v2. El ADNc de Gal se 35 escindió como un fragmento Cla I/Not I del vector pCMV-5 (Woon, C. y col., 1989 *J. Biol. Chem.* 264: 5687-93), se hizo romo con una polimerasa de ADN Klenow y se insertó en el sitio EcoR V de pCDNA-3v2. El ARNc se inyectó en los ovocitos usando el inyector motorizado "Nanoject" (Drummond Sci. Co., Broomall, PA) en un volumen de 50 nl. Las agujas de inyección se agruparon en una única etapa usando un agrupador de micropipetas Flaming/Brown, Modelo P-87 (Sutter Instrument Co) y las puntas se rompieron usando un aumento de 53X, de forma que se generó un ángulo agudo, siendo el diámetro externo de la aguja <3 μm . Tras la inyección, los ovocitos se incubaron en medio ND-96, con una suave agitación orbital a 18°C en la oscuridad. Los ovocitos se incubaron durante 24 a 48 horas (dependiendo del experimento y del tiempo requerido para la expresión del ARN heterólogo) antes de "cargar" la aequorina expresada con el cromóforo esencial coelenterazina. Los ovocitos se "cargaron" con coelenterazina trans- 45 firiéndolos a placas de 35 mm que contenían 3 ml de medio de carga e incubando durante 2-3 horas con una suave agitación orbital en la oscuridad a 18°C. El medio de carga contenía coelenterazina 10 μM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.) y glutatión reducido 30 pM en medio OR-2 (sin calcio). Entonces los ovocitos fueron devueltos a medio ND-86 con el medio de calcio descrito anteriormente, y la incubación continuó en la oscuridad con una agitación orbital hasta que se iniciaron las medidas de bioluminiscencia. La medida de la expresión del GHSR en los ovocitos se 50 realizó usando un luminómetro Berthold LB953 (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) conectado a un PC con el programa informático Autolumat-PC Control (Wallac Inc., Gaithersburg, MD). Los ovocitos (individualmente o por parejas) fueron transferidos a tubos de plástico (75 x 12 mm, Sarstedt) que contenían 2,9 ml de medio OR-2 exento de Ca^{+2} . Cada conjunto de ARNc se probó usando un mínimo de 3 tubos que contenían ovocitos. Las medidas de bioluminiscencia se desencadenaron mediante la inyección de 0,1 ml de Compuesto A 30 μM (concentración final de 1 μM) y se 55 siguieron los registros durante 2 min para observar las respuestas cinéticas coherentes con una respuesta mediada por IP3.

El conjunto S10-20 se preparó a partir de la biblioteca de ADNc no fraccionada de pituitaria porcina y estaba formado por 10 conjuntos, cada uno de 1.000 clones. El S10-20 dio una señal positiva en los instrumentos luminométricos, y entonces se aprobó individualmente la actividad de los conjuntos de componentes. A partir de los 10 conjuntos de 1.000 clones, sólo el conjunto S271 dio una respuesta positiva. Este conjunto se formó a partir de dos conjuntos de 500 clones denominados P541 y P542. De nuevo, sólo uno de los conjuntos, P541, dio una señal bioluminiscente positiva en presencia de Compuesto A 1 μM . En este punto se determinó el título bacteriano en las reservas en glicerol de P541, de forma que las diluciones pudieron colocarse en placas de agar LB que contenían 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carbenicilina, 65 para rendir aproximadamente 50 colonias por placa. Se recogieron un total de 1527 colonias y se replicaron a partir de 34 placas. Entonces las colonias de la placa original se lavaron, se aislaron los plásmidos, se sintetizó el ARNc y se inyectó en los ovocitos. El ARNc preparado a partir de 8 de las 34 placas dio señales positivas en los ovocitos. Se eligieron dos placas y se hicieron crecer las colonias individuales de estas placas, se aislaron los plásmidos, se preparó

ES 2 268 713 T3

el ARNc y se inyectó en los ovocitos. Una única cepa clínica clonal de cada placa (denominadas clones 7-3 y 28-18) dio una respuesta bioluminiscente positiva al Compuesto A 1 μ M. El clon 7-3 se caracterizó adicionalmente.

Ejemplo 9

5

Caracterización del receptor

La secuenciación del ADN se realizó sobre ambas hebras usando un instrumento automatizado Applied Biosystems (ABI modelo 373) y manualmente mediante el método didesoxi de terminación de la cadena usando Sequenase II (US Biochemical, Cleveland, OH). Las búsquedas en bases de datos (Genbank 88, EMBL 42, Swiss-Prot 31, PIR 40, dEST, Prosite, dbGPCR), las alineaciones de las secuencias y el análisis de las secuencias de nucleótidos y proteínas del GHSR se llevaron a cabo usando el GCG Sequence Analysis Software Package (Madison, WI; acumulación, estructura de péptidos y programas de motivos), y los programas de búsqueda FASTA y BLAST, y el conjunto de programas informáticos PC/Gene de Intelligenetics (San Francisco, CA; programas de análisis de proteínas). Se realizó un análisis por inmunotransferencia Northern usando ARNm total (20 μ g/carril) o poli (A)+ (5-10 μ g/carril) preparado según se describió anteriormente. El ARN se fraccionó en un gel de agarosa al 1% que contenía formaldehído 2,2 M y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Los transfectos se hibridaron con una sonda generada mediante PCR que engloba a la mayoría del ORF predicho por el clon 7-3 (nt 291 a 1132). La sonda se radiomarcó mediante cebado aleatorio con [α]³²P-dCTP hasta una actividad específica de más de 10⁹ dpm/ μ g. Los transfectos se hibridaron previamente a 42°C durante 4 horas en 5 X de SSC, 5 X de disolución de Denhardt, 250 μ g/ml de ARNt, glicina al 1%, SDS al 0,075%, NaPO₄ 50 mM (pH 6) y formamida al 50%. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 42°C durante 20 horas en 5 X de SSC, 1 X de disolución de Denhardt, SDS al 0,1%, NaPO₄ 50 mM y formamida al 50%. Los transfectos de ARN se lavaron con 2 X de SSC, SDS al 0,2% a 42°C y a -70°C. Los marcadores de tamaño del ARN fueron ARNr 28S y 18S y marcadores de ARN transcritos *in vitro* (Novagen). Se hibridaron membranas de nailon que contenían ADN genómico de varias especies digerido con EcoR I y Hind III (Clontech; 10 mg/carril) durante 24 horas a 30°C en 6 X de SSPE, 10 X de Denhardt, SDS al 1% y formamida al 50%. Los transfectos genómicos se lavaron dos veces con 6 X de SSPE a temperatura ambiente, dos veces con 6 X de SSPE a 55°C y dos veces con 4 X de SSPE a 55°C. Se identificaron clones adicionales de GHSR porcinos a partir de la biblioteca de ADNc porcino (descrita anteriormente) mediante hibridación con ADN de plásmido (en conjuntos de 500 clones cada uno) inmovilizados en membranas de nailon en un aparato *slot-blot* (Scheicher and Schuell). Las cepas clínicas clonales puras se identificaron subsiguientemente mediante hibridación de las colonias. Los clones de GHSR porcinos que se extendían adicionalmente en una dirección 5' se identificaron usando procedimientos 5' RACE (Frohman, M. A., 1993 Methods Enzymol. 218: 340-358, que se incorpora como referencia) usando ARNm poli (A)+ de pituitaria porcina como plantilla.

35

Ejemplo 10

GHSR humano

Se obtuvieron homólogos de pituitaria humana del GHSR porcino cribando una biblioteca de ADNc disponible comercialmente construida en el vector lambda ZAP II (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Inicialmente se colocaron en placas aproximadamente 1,86 x 10⁶ fagos y se cribaron usando una porción marcada mediante cebado aleatorio del clon porcino 7-3 (descrito anteriormente) como sonda de hibridación. Se purificaron en placa veintidós clones positivos. Los insertos de estos clones se escindieron del bacteriófago hacia el fagómido pBluescript II SK- mediante coinfección con fago ayudante, según describe el fabricante (Stratagene). Los clones humanos se caracterizaron según se describió anteriormente para el clon porcino.

Ejemplo 11

ADN que codifica un Receptor Secretagogo de Hormona de Crecimiento de Rata (GHSR) de Tipo Ia

Una hibridación cruzada con una rigurosidad reducida fue la estrategia utilizada para aislar el GHSR de rata de tipo Ia. Se colocaron en placas aproximadamente 10⁶ placas de fagos de una biblioteca de ADNc de pituitaria de rata amplificado una vez en λ gt11 (RL1051b; Clontech, Palo Alto, CA) en la cepa de *E. coli* Y1090r-. Las placas se transfirieron a Nytran de máxima resistencia (Schleicher & Schuell, Keene, NH) desnaturalizado, se neutralizaron y se cribaron con un fragmento de 1,6 kb de EcoRI/NotI que contenía las regiones codificantes y no traducidas completas del GHSR porcino, el clon 7-3. Las membranas se incubaron a 30°C en disolución de hibridación previa (formamida al 50%, 2 X de Denhardt, 5 X de SSPE, SDS al 0,1%, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón) durante 3 horas, seguida de una incubación hasta el día siguiente en disolución de hibridación (formamida al 50%, 2 X de Denhardt, 5 X de SSPE, SDS al 0,1%, sulfato de dextrano al 10%, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón) con 1 x 10⁶ cpm/ml de sonda marcada con [³²P]. La sonda se marcó con [³²P]dCTP usando un kit de cebado aleatorio (Gibco BRL, Gaithersburg, ND). Después de la hibridación, los transfectos se lavaron dos veces, cada uno con 2 X de SSC, SDS al 0,1% (a 24°C, después a 37°C y finalmente a 55°C). Se aisló un único clon positivo después de las tres rondas de purificación en placa. El fago que contenía el GHSR se eluyó desde las placas con 1 x de tampón lambda (NaCl 0,1 M, MgSO₄·7H₂O 0,01M, Tris-HCl 35 mM, pH 7,5) siguiendo el crecimiento hasta el día siguiente de aproximadamente 200 ufp/150 mm de placa. Después de una centrifugación de diez minutos a 10.000 x/g para eliminar los desechos, la disolución de fago se trató con 1 μ g/ml de ARNasa A y ADNasa I durante treinta minutos a 24°C, seguida de una precipitación con PEG (8000) al 20%/NaCl 2 M durante dos horas en hielo, y su recogida mediante centrifugación a

65

ES 2 268 713 T3

10.000 x/g durante veinte minutos. El ADN del fago se aisló mediante incubación en SDS al 0,1%, EDTA 30 mM, 50 µg/ml de proteinasa K durante una hora a 68°C, con la subsiguiente extracción con fenol (tres veces) y cloroformo (dos veces) antes de la precipitación con isopropanol hasta el día siguiente. El inserto de ADN de GHSR (~6,4 kb) se subclonó a partir de lamda gtl I en el vector de plásmidos Litmus 28 (New England Biolabs, Beverly, MA). Se calentaron 2 µg de ADN de fago a 65°C durante diez minutos, después se digirieron con 100 unidades de BsiWI (New England Biolab, Bevely, MA) a 37°C hasta el día siguiente. Se purificó en gel un fragmento de 6,5 kb, se electroeluyó y se extrajo con fenol/cloroformo antes de la ligado al vector Litmus 28 digerido con BsiWI.

Se secuenciaron ambas hebras del ADN de doble hebra en un secuenciador automático ABI usando el kit de reacción listo para el ciclo de secuenciación por coloración de la terminación AB1 PRISM (Perkin Elmer; Foster City, CA).

Para las comparaciones de las secuencias y los estudios de expresión funcionales se generó un fragmento de ADN contiguo que codificaba para el ORF completo (desprovisto de la secuencia intermedia) para el GHSR de rata de tipo Ia. Se utilizó la PCR para sintetizar un fragmento amino terminal desde la Met-1 hasta la Val-260 con sitios de restricción añadidos EcoRI (5') y HpaI (3'), mientras que se generó un fragmento carboxilo terminal desde la Lys-261 hasta la Thr-364 con sitios de restricción añadidos Dra I (5') y Not I (3'). El constructo ORF se ensambló en el vector de expresión de mamífero pSV7 mediante un ligado de tres vías con pSV7 digerido con EcoRI/Not I, fragmento NH₂-terminal digerido con EcoRI/Hpa I y fragmento C-terminal digerido con Dra I/Not I.

La actividad funcional del constructo ORF se evaluó transfectando (usando lipofectamina; GIBCO/BRL) 5 µg de ADN de plásmido en la línea celular indicadora que expresa la aequorina (293-AEQI7) cultivada en placas de 60 mm. Después de aproximadamente 40 horas de expresión, la aequorina de las células se cargó durante 2 horas con coelenterazina, las células se recogieron, se lavaron y se sedimentaron mediante una centrifugación a baja velocidad en tubos de luminómetro. La actividad funcional se determinó midiendo la movilización de calcio intracelular dependiente del Compuesto A y la concomitante bioluminiscencia de aequorina inducida por el calcio. En la Fig. 26 se muestran tres muestras replicadas que presentan las respuestas luminescentes inducidas por el Compuesto A.

Ejemplo 12

Ensayos

Se transfectaron células de mamífero (COS-7) con plásmidos de expresión del GHSR usando Lipofectamina (GIBCO-BRL; Hawley-Nelson, 1993, *Focus* 15: 73). Las transfecciones se realizaron en placas de 60 mm en células confluyentes al 80% (aproximadamente 4 x 10⁵ células) con 8 µg de Lipofectamina y 32 µg de ADN de plásmido de GHSR.

Se realizó la unión del [³⁵S]-Compuesto A a membranas pituitarias porcinas y a membranas en bruto preparadas a partir de células COS-7 transfectadas con plásmidos de expresión de GHSR. Se prepararon membranas celulares en bruto, en hielo, a partir de transfectantes COS-7, 48 horas después de la transfección. Cada placa de 60 mm se lavó dos veces con 3 ml de PBS, una vez con 1 ml de tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], MgCl₂ 5 mM, EDTA 2,5 mM, 30 µg/ml de bacitracina). Se añadieron 0,5 ml de tampón de homogeneización a cada placa, las células se eliminaron por raspado y después se homogeneizaron usando un dispositivo Polytron (Brinkmann, Syosset, NY; 3 estallidos de 10 s en la posición 4). Entonces el homogeneizado se centrifugó durante 20 min a 11.000 x g a 0°C, y el sedimento de membranas en bruto (que contiene principalmente membranas y núcleos celulares) se resuspendió en tampón de homogeneización suplementado con BSA al 0,06% (0,1 ml/placa de 60 mm) y se mantuvo en hielo. Las reacciones de unión se realizaron a 20°C durante 1 h en un volumen total de 0,5 ml que contiene: 0,1 ml de suspensión de membranas, 10 µl de [³⁵S]-Compuesto A (de 0,05 a 1 nM; actividad específica de aproximadamente 900 Ci/mmol), 10 µl de fármaco competidor y 380-390 µl de tampón de homogeneización. El radioligando unido se separó mediante una rápida filtración a vacío (cosechador celular Brandel de 48 pocillos) a través de filtros GF/C previamente tratados durante 1 h con polietilenoimina al 0,5%. Tras la aplicación de la suspensión de membranas al filtro, los filtros se lavaron 3 veces con 3 ml cada uno de Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], MgCl₂ 10 mM, EDTA 2,5 mM y Triton X-100 al 0,015% enfriado en hielo, y la radioactividad unida en los filtros se cuantificó mediante un recuento de centelleo. La unión específica (> 90% del total) se define como la diferencia entre la unión total y la unión no específica producida en presencia de Compuesto A 50 nM no marcado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para determinar la presencia de un ácido nucleico que codifica un receptor de un secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR) que comprende:
- 10 a) introducir un ácido nucleico sospechoso de codificar un GHSR en una célula que no expresa de forma natural el receptor en su membrana celular;
 - b) introducir una molécula detectora o un ácido nucleico que codifica una molécula detectora en la célula, en la que la molécula detectora responde directa o indirectamente a un suceso bioquímico activado por proteína G;
 - 15 c) poner en contacto la célula con un secretagogo de la hormona de crecimiento; y
 - d) determinar si el ácido nucleico codifica un GHSR monitorizando la molécula detectora.
2. Un procedimiento para determinar la presencia de un secretagogo de la hormona de crecimiento que comprende:
- 20 a) introducir un ácido nucleico que codifica un GHSR en una célula que no expresa de forma natural el receptor en su membrana celular en unas condiciones tales que se exprese un GHSR;
 - b) introducir una molécula detectora o un ácido nucleico que codifica una molécula detectora en la célula, en la que la molécula detectora responde directa o indirectamente a un suceso bioquímico activado por proteína G;
 - 25 c) poner en contacto la célula con un compuesto sospechoso de ser un secretagogo de la hormona de crecimiento; y
 - 30 d) determinar si el compuesto es un secretagogo de la hormona de crecimiento monitorizando la molécula detectora.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de introducir una subunidad de proteína G en la célula.
- 35 4. Un procedimiento según la reivindicación 2 que comprende adicionalmente la etapa de introducir una subunidad de proteína G en la célula.
5. Un procedimiento según la Reivindicación 3 o la Reivindicación 4 en el que la subunidad de proteína G es una subunidad de proteína G-alfa.
- 40 6. Un procedimiento según la Reivindicación 5 en el que la subunidad de proteína G es la subunidad de proteína G- α_{11} .
- 45 7. Un procedimiento según la Reivindicación 3 en el que se introduce en la célula en la etapa a) un conjunto que comprende al menos 500 moléculas de ácidos nucleicos diferentes.
8. Un procedimiento según la Reivindicación 7 en el que el conjunto comprende moléculas de ARN.
- 50 9. Un procedimiento según la Reivindicación 7 en el que tras determinar que el conjunto de moléculas de ácidos nucleicos diferentes comprende un ácido nucleico que codifica un GHSR, se repiten todas las etapas salvo que el conjunto comprende un número menor de moléculas de ácidos nucleicos diferentes.
- 55 10. Un procedimiento según la Reivindicación 4 en el que el resultado de la etapa d) se compara con el obtenido usando un secretagogo conocido de la hormona del crecimiento.
11. Un procedimiento según cualquier Reivindicación previa en el que la molécula detectora es aequorina.

60

65

ES 2 268 713 T3

	10	20	30	40	
	CCTCACGCTGCCAGACCTGGGCTGGGACGCTCCCCCTGAA				40
	AACGACTCGCTAGTGGAGGAGCTGCTGCCGCTCTTCCCA				80
	CGCCGCTGTTGGCGGGCGTCACCGCCACCTGCGTGGCGCT				120
	CTTCGTGGTGGGTATCGCGGGCAACCTGCTCAGATGCTG				160
	GTAGTGTCACGCTTCCGCGAGATGCGCACCAACCAACC				200
	210	220	230	240	
	TCTACCTGTCCAGCATGGCCTTCTCCGACCTACTCATCTT				240
	CCTCTGCATGCCCCCGACCTCTTCCGCCTCTGGCAGTAC				280
	CGGCCTTGAACCTTGGCAACCTGCTCTGAAACTCTTCC				320
	AGTTCGTTAGCGAGAGCTGCACCTACGCCACAGTGCTCAC				360
	CATCACCGCGCTGAGCGTCGAGCGCTACTTCGCCATCTGC				400
	410	420	430	440	
	TTCCCGCTGCGGGCCAAGGTAGTGGTCACCAAGGGCCGGG				440
	TAAAGCTGGTCATCCTGGTCATCTGGGCCGTGGCCTTCTG				480
	CAGCGCCGGGCCATCTTCGTGCTGGTCGGAGTGGAGCAT				520
	GATAACGGCACTGACCCTCGGGACACCAACGAGTGCCGCG				560
	CCACGGAGTTCGCCGTGCGCTCCGGGCTGCTTACCGTCAT				600
	610	620	630	640	
	GGTCTGGGTGTCCAGTGTCTTCTTCTCCTGCCTGTCTTC				640
	TGCCTCACTGTGCTCTATAGCCTCATCGGCAGGAAGCTCT				680
	GGCGGAGGAAGCGCGCGAGGCGGCGGTGGGCTCCTCGCT				720
	CAGGGACCAGAACCACAAACAAACCGTAAAAATGCTGGCT				760
	GTAGTGGTGTTCCTTTCATACTCTGCTGGCTGCCTTCC				800
	810	820	830	840	
	ATGTAGGGCGATATTTATTTTCAAATCCTTGGAGCCTGG				840
	CTCTGTGGAGATTGCTCAGATCAGCCAATACTGCAACCTC				880
	GTGTCCTTTGTCCTTCTACCTCAGTGGCCATCAACC				920
	CTATTCTGTACAACATCATGTCCAAGAAGTATCGGGTGGC				960
	GGTGTTCAAACCTGCTGGGATTTGAGCCCTTCTCACAGAGG				1000
	1010	1020	1030	1040	
	AAACTCTCCACTCTGAAGGATGAAAGTTCTCGGGCCTGGA				1040
	CAGAATCTAGTATTAATACATGA				1063

FIG. 1

ES 2 268 713 T3

10	20	
MLVVSREFRE	RTTTNLYLSS	20
MAFSDLLIFL	CPLDLFRLW	40
QYRPWNLGNL	LCKLFQFVSE	60
SCTYATVLT	TALSVERYFA	80
ICFPLRAKVV	VTKGRVKLVI	100
110	120	
LVIWAVAFCS	AGPIFVLVGV	120
EHDNGTDPRD	TNECRATEFA	140
VRSGLLTVMV	WVSSVFFFLP	160
VFCLTVLYSL	IGRKLWRRKR	180
GEAAVGSSLR	DQNHKQTVKM	200
210	220	
LAVVVFAFIL	CWLPFHVGRY	220
LFSKSLEPGS	VEIAQISQYC	240
NLVSFVLFYL	SAAINPILYN	260
IMSKKYRVAV	FKLLGFEPFS	280
QRKLSTLKDE	SSRAWTESSI	300
310	320	
NT 302		

FIG.2

ES 2 268 713 T3

1
 LTLPLDGLWDA PPENDSLVEE LLPLFPTLL 30

 HELIX 1 60
AGVTATCVAL FVVGIAGNLL TMLVVSRLFRE

 HELIX 2 90
 MRTTTNLYLS SMAFSDLLIF ICMPLDLFRL

 HELIX 3 120
 WQYRPWNLGN LLCKLFQFVS ESCTYATVLT

ITALSVERYF AICFPLRAKV VVTKGRVKLV 150

 HELIX 4 180
ILVIWAVAF C SAGPIFVLVG VEHDNGTDPR

 DTNECRATEF AVRSCLLTVM VWSSVFFFL 210

 HELIX 5 240
PVFCTLVLYS LIGRKLWRRK RGEAAVGSLL

 HELIX 6 270
 RDQNHKQTVK MLAVVFAFI LCWLPHVGR

 YLFSKSLEPG SVEIAQISQY CNLVSFVLFY 300

 HELIX 7 330
LSAINPILY NIMSKKYRVA VFKLLGFEPF

 SQRKLSTLKD ESSRAWTESS INT 353

FIG.3

ES 2 268 713 T3

10	20	30	40	
GCAGCCTCTCACTTCCCTCTTTCCTCTCCTAGCATCCTCC				40
CTGAGAGCCCGCGCTCGATACTCCTTTGCACTCTTTCGCG				80
CCTAAGAGAACCTTCTCTGGGACCAGCCGGCTCCACCCTC				120
TCGGTCTATCCAAGAGCCAGTTAAGCAGAGCCCTAAGCA				160
TGTGGAACGCGACCCCGAGCGAGGAACCGGGGCCAACCT				200
210	220	230	240	
CACGCTGCCAGACCTGGGCTGGGACGCTCCCCGTGAAAAC				240
GACTCGCTAGTGGAGGAGCTGCTGCCGCTTCCCCACGC				280
CGCTGTTGGCGGGCGTCAACGCCACCTGCGTGGCGCTCTT				320
CGTGGTGGGTATCGCGGGCAACCTGCTCAGGATGCTGGTA				360
GTGTCACGCTTCCGCGAGATGCGCACCACCACCAACCTCT				400
410	420	430	440	
ACCTGTCCAGCATGGCCTTCTCCGACCTACTCATCTTCCT				440
CTGCATGCCCCTCGACCTCTTCCGCCTTTGGCAGTACCGG				480
CCTTGGAACCTTGGCAACCTGCTCTGCAAACCTTCCAGT				520
TCGTTAGCGAGAGCTGCACCTACGCCACAGTCTCACCAT				560
CACCGCGCTGAGCGTCGAGCGCTACTTCGCCATCTGCTTC				600
610	620	630	640	
CCGCTGCGGGCCAAGGTAGTGGTCACCAAGGGCCGGGTAA				640
AGCTGGTCATCCTGGTCATCTGGGCCGTGGCCTTCTGCAG				680
CGCCGGGCCCATCTTCGTGCTGGTGGAGTGGAGCATGAT				720
AACGGCACTGACCCTCGGGACACCAACGAGTCCCGGCCA				760
CGGAGTTCGCCGTGCGCTCCGGGCTGCTTACCGTCATGGT				800
810	820	830	840	
CTGGGTGTCCAGTGTCTTCTTCTCCTGCCTGTCTTCTGC				840
CTCACTGTGCTCTATAGCCTCATCGGCAGGAAGCTCTGGC				880
GGAGGAAGCGCGGCGAGGCGGCGGTGGGCTCCTCGCTCAG				920
GGACCAGAACCACAAACAAACCGTAAAAATGCTGGGTGGG				960
TCTCAATGCGCCCTCGAGCTTTCTCTCCGGGTCCCCTCC				1000
1010	1020	1030	1040	
ACTCCTCGTGCCTTTTCTCTTCTCCCTGA				1029

FIG.4

	10	20	30	40	
	·	·	·	·	
MWNATPSEEP	GPNLTLPLD	GDAPPENDSL	VEELLPLFPT	40	
PLLAGVTATC	VALFVVGIAG	NLLTMLVVS	FREMRTTTL	80	
YLSSMAFSDL	LIFLCMPLDL	FRLWQYRPWN	LGNLLCKLFQ	120	
FVSECTYAT	VTITALSVE	RYFAICFPLR	AKVVVTKGRV	160	
KLVILVIWAV	AFCSAGPIFV	LVGVEHDNGT	DPRDTNECRA	200	
	210	220	230	240	
	·	·	·	·	
TEFAVRSGLL	TVMVWSSVF	FFLPVFCLTV	LYSLIGRKLW	240	
RRKRGEAAVG	SSLRDQNHKQ	TVKMLGGSQC	ALELSLPGPL	280	
HSSCLFSSP	289				

FIG.5

ES 2 268 713 T3

10	20	
MLVVSREFEL	RTTTNLYLSS	20
MAFSDLLIFL	CPLDLVRLW	40
QYRPWNFGDL	LCKLFQFVSE	60
SCTYATVLTII	TALSVERYFA	80
ICFPLRAKVV	VTKGRVKLVI	100
110	120	
FVIWAVAFCS	AGPIFVLVGV	120
EHENGTDPWD	TNECRPTEFA	140
VRSGLLIVMV	WVSSIIIIIP	160
VFCLTVLYSL	IGRKLWRRRR	180
GDAVVGASLR	DQNHKQTVKM	200
210	220	
LAVVVFAFIL	CWLPHVGRY	220
LFSKSFEPGS	LEIAQISQYC	240
NLVSFVLFYL	SAAINPILYN	260
IMSKKYRVAV	FRLGFEFPS	280
QRKLSTLKDE	SSRAWTESSI	300
310	320	
NT 302		

FIG.7

ES 2 268 713 T3

1 30
PSEEPGFNLT LADLDWDASP GNDSLGDDELL

HELIX 1 60
QLFPAPLAG VTATCVAFV VGIAGNLLTM

HELIX 2 90
LVSRFRELR TITNLYLSSM AFSDLLIFLC

120
MPLDLVRLWQ YRPWNFGDLL CKLFQFVSES

HELIX 3 150
CTYATVLTIT ALSVERYFAI CFPLRAKVVV

HELIX 4 180
TKGRVKLVIF VIWAVAFCSA GPIFVLVGVV

210
HENGDPWDT NECRPTEFAV RSGLLTVMVV

HELIX 5 240
VSSIFFFLPV FCLTVLYSLI GRKLWRRRRG

HELIX 6 270
DAVVGASLRD QNHKQTVKML AVVVFVAFILC

300
WLPFHVGRYL FSKSFEPGSL EIAQISQYCN

HELIX 7 330
LVSFVLFYLS AAINPILYNI MSKKYRVAVF

360
RLLGFEFVSQ RKLSTLKDES SRAWTESSIN

361
T

FIG.8

ES 2 268 713 T3

10	20	30	40	
GCGCCTCACGCTCCCGCTTCGCGGGCGCCTGGTCCCTGCGG				40
TCCCCACTCGCTGCGACGCTTTGGGAAGTGCAGATGGAA				80
CTGGATCGAGAACGCAAATGCGAGGCAGGGCTGGTGACAG				120
CATCCTCCCTACGCGTCTGCACCCGCTCCTCCCTCGCACC				160
CTCCCGCGCCTAAGCGGACCTCCTCGGGAGCCAGCTCGGT				200
210	220	230	240	
CCAGCCTCCCAGCGCAGTCACGTCCCAGAGCCTGTTCAGC				240
TGAGCCGGCAGCATGTGGAACGCGACGCCAGCGAAGAGC				280
CGGGGTTCAACCTCACACTGGCCGACCTGGACTGGGATGC				320
TTCCCCGGCAACGACTCGCTGGGCGACGAGCTGCTGCAG				360
CTCTTCCCGCGCCGCTGCTGGCGGGCGTCACAGCCACCT				400
410	420	430	440	
GCGTGGCACTCTTCGTGGTGGGTATCGCTGGCAACCTGCT				440
CACCATGCTGGTGGTGTGCGGCTTCGCGAGCTGCGCACC				480
ACCACCAACCTTACCTGTCCAGCATGGCCTTCTCCGATC				520
TGCTCATCTTCTCTGCATGCCCTGGACCTCGTTGCGCT				560
CTGGCAGTACCGGCCCTGGAACCTCGGGACCTCCTCTGC				600
610	620	630	640	
AAACTCTTCCAATTCGTCAGTGAGAGCTGCACCTACGCCA				640
CGGTGCTACCATCACAGCGCTGAGCGTCGAGCGCTACTT				680
CGCCATCTGCTTCCCACTCCGGGCCAAGGTGGTGGTCACC				720
AAGGGGCGGGTGAAGCTGGTCATCTTCGTCATCTGGGCCG				760
TGGCCTTCTGCAGCGCCGGGCCATCTTCGTGCTAGTCGG				800
810	820	830	840	
GGTGGAGCACGAGAACGGCACCGACCTTGGGACACCAAC				840
GAGTGCCGCCACCGAGTTTGCGGTGCGCTCTGGAAGTGC				880
TCACGGTCATGGTGTGGGTGTCCAGCATCTTCTTCTCCT				920
TCCTGTCTTCTGTCTCACGGTCCTTACAGTCTCATCGGC				960
AGGAAGCTGTGGCGGAGGAGGCGGGCGATGCTGTCGTGG				1000

FIG.9A

1010 1020 1030 1040
GTGCCTCGCTCAGGGACCAGAACCACAAGCAAACCGTGAA 1040
AATGCTGGGTGGGTCTCAGCGCGGCTCAGGCTTTCTCTC 1080
GCGGGTCCTATCCTCTCCCTGTGCCTTCTCCCTTCTCTCT 1120
GA 1122

FIG.9B

ES 2 268 713 T3

	10	20	30	40	
MWNATPSEEPGFNLTLADLDWDASPGNDSLGDPELLQLFPA					40
PLLAGVTATCVALFVVGIAGNLLTMLVVSRLFRELRTTTNL					80
YLSSMAFSDLLIFLCMPDLVRLWQYRPWNFGDLLCKLFQ					120
FVSECTYATVLTITALSVERYFAICFPLRAKVVVTKGRV					160
KLVIWAVAFCSAGPIFVLVGVEHNGTDPWDTNECRP					200
	210	220	230	240	
TEFAVRSGLLTVMVWSSIFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLW					240
RRRRGDAVVGASLRDQNHKQTVKMLGGSQRALRLSLAGPI					280
LSLCLLPSL					289

FIG.10

	10	20	30	40	
MPLDLVRLWQYRPWNFGDLLCKLFQFVSECTYATVLTIT					40
ALSVRYFAICFPLRAKVVVTKGRVKLVIWAVAFCSA					80
GPIFVLVGVEHNGTDPWDTNECRPTEFAVRSGLLTVMVW					120
VSSIFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLWRRRRGDAVVGASLRD					160
QNHKQTVKMLAVVVFALCWLPFHVGRYLFKSFEPGSL					200
	210	220	230	240	
EIAQISQYCNLVSFVLFYLSAAINPILYNIMSKKYRVAVF					240
RLLGFEFQSQRKLSLTKDESSRAWTESSINT					271

FIG.12

ES 2 268 713 T3

10	20	30	40	
ATCTGCTCATCTTCCTCTGCATGCCCTGGACCTCGTTCC				40
CCTCTGGCAGTACCGGCCCTGGAACCTCGGGCAGCTCCTC				80
TGCAAACCTCTTCCAATTCGTCAGTGAGAGCTGCACCTACG				120
CCACGGTGCTCACCATCACAGCGCTGAGCGTCGAGCGCTA				160
CTTCGCCATCTGCTTCCCACTCCGGGCCAAGGTGGTGGTC				200
210	220	230	240	
ACCAAGGGGGCGGGTGAAGCTGGTCATCTTCGTCATCTGGG				240
CCGTGGCCTTCTGCAGCGCCGGGCCCATCTTCGTGCTAGT				280
CGGGGTGGAGCACGAGAACGGCACCGACCTTGGGACACC				320
AACGAGTGCCGCCCCACCGAGTTTGCGGTGCGCTCTGGAC				360
TGCTCACGGTCATGGTGTGGGTGTCCAGCATCTTCTTCTT				400
410	420	430	440	
CCTTCCTGTCTTCTGTCTCACGGTCCTCTACAGTCTCATC				440
GGCAGGAAGCTGTGGCGGAGGAGGCGCGCGATGCTGTCTG				480
TGGGTGCCTCGCTCAGGGACCAGAACCACAAGCAAACCGT				520
GAAAATGCTGGCTGTAGTGGTGTGTTGCTTTCATCCTCTGC				560
TGGCTCCCCTTCCACGTAGGGCGATATTTATTTTCAAAT				600
610	620	630	640	
CCTTTGAGCCTGGCTCCTTGGAGATTGCTCAGATCAGCCA				640
GTA CTGCAACCTCGTGTCTTTGTCTTCTACCTCAGT				680
GCTGCCATCAACCCATTCTGTACAACATCATGTCCAAGA				720
AGTACCGGGTGGCAGTGTTTCACTTCTGGGATTCGAACC				760
CTTCTCCCAGAGAAAGCTCTCCACTCTGAAAGATGAAAGT				800
810	820	830	840	
TCTCGGGCCTGGACAGAATCTAGTATTAATACATGA				836

FIG. 11

ES 2 268 713 T3

	v10	v20
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	LTLPDLGWDAPPENDSLVEE	
	LTLPDLGWDAPPENDSLVEE	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LTLPDLGWDAPPENDSLVEE	
	^20	^30
	v30	v40
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	LLPLFPTPLLAGVTATCVAL	
	I.I.PI.FPTPI I AGVTATCVAI	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LLPLFPTPLLAGVTATCVAL	
	^40	^50
	v50	v60
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	FVVGIAGNLLTMLVVSFRFE	
	FVVGIAGNLLTMLVVSFRFE	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	FVVGIAGNLLTMLVVSFRFE	
	^60	^70
	v70	v80
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	MRTTTNLYLSSMAFSDLLIF	
	MRTTTNLYLSSMAFSDLLIF	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	MRTTTNLYLSSMAFSDLLIF	
	^80	^90
	v90	v100
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	LCMPLDLFRLWQYRPWNLGN	
	LCMPLDLFRLWQYRPWNLGN	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LCMPLDLFRLWQYRPWNLGN	
	^100	^110
	v110	v120
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	LLCKLFQFVSESCYATVLT	
	LLCKLFQFVSESCYATVLT	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LLCKLFQFVSESCYATVLT	
	^120	^130
	v130	v140
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	ITALSVERYFAICFPLRAKV	
	ITALSVERYFAICFPLRAKV	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	ITALSVERYFAICFPLRAKV	
	^140	^150
	v150	v160
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	VVTKGRVKLVILVIWAVAF	
	VVTKGRVKLVILVIWAVAF	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	VVTKGRVKLVILVIWAVAF	
	^160	^170

FIG.13A

		v170	v180
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	SAGPIFVLVGVEHDNGTDP		
	SAGPIFVLVGVEHDNGTDP		
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	SAGPIFVLVGVEHDNGTDP		
		^180	^190
		v190	v200
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	DTNECRATEFAVRSGLLTVM		
	DTNECRATEFAVRSGLLTVM		
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	DTNECRATEFAVRSGLLTVM		
		^200	^210
		v210	v220
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	VWVSSVFFFLPVFCLTVLYS		
	VWVSSVFFFLPVFCLTVLYS		
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	VWVSSVFFFLPVFCLTVLYS		
		^220	^230
		v230	v240
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	LIGRKLWRRKRGEAAVGSSL		
	LIGRKLWRRKRGEAAVGSSL		
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LIGRKLWRRKRGEAAVGSSL		
		^240	^250
		v250	v260
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	RDNHKQTVKMLAVVVF		
	RDNHKQTVKML:	A:	
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	RDNHKQTVKMLGGSQCALE		
		^260	^270
		v270	
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	LCWL-PFHVGRYLFSSK		
	L. P:H :..LFS.:		
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LSLPGPLH-SSCLFSSP		
		^280	

FIG. 13B

FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	PSEEPGFNLTADLDWDASP	v10	v20
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	PSEEPGFNLTADLDWDASP		
	^10	^20	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	GNDSLGDELLOLFPAPLLAG	v30	v40
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	GNDSLGDELLOLFPAPLLAG		
	^30	^40	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	VTATCVALFVVGIAGNLLTM	v50	v60
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	VTATCVALFVVGIAGNLLTM		
	^50	^60	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	LVVSRFRELRTTTNLYLSSM	v70	v80
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	LVVSRFRELRTTTNLYLSSM		
	^70	^80	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	AFSDLLIFLCMPLDLVRLWQ	v90	v100
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	AFSDLLIFLCMPLDLVRLWQ		
	^90	^100	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	YRPWNFGDLLCKLFQFVSES	v110	v120
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	YRPWNFGDLLCKLFQFVSES		
	^100	^110	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	CTYATVLTITALSVERYFAI	v130	v140
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	CTYATVLTITALSVERYFAI		
	^130	^140	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	CFPLRAKVVVTKGRVKLVIF	v150	v160
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	CFPLRAKVVVTKGRVKLVIF		
	^150	^160	

FIG.14A

FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	v170	v180
	VIWAVAFCSAGPIFVLVGVE	
	VIWAVAFCSAGPIFVLVGVE	
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	VIWAVAFCSAGPIFVLVGVE	
	^170	^180
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	v190	v200
	HENGTDPWDTNECRPTEFAV	
	HENGTDPWDTNECRPTEFAV	
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	HENGTDPWDTNECRPTEFAV	
	^190	^200
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	v210	v220
	RSGLLTVMVVSSIFFFLPV	
	RSGLLTVMVVSSIFFFLPV	
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	RSGLLTVMVVSSIFFFLPV	
	^210	^220
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	v230	v240
	FCLTVLYSLIGRKLWRRRRG	
	FCLTVLYSLIGRKLWRRRRG	
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	FCLTVLYSLIGRKLWRRRRG	
	^230	^240
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I	v250	v260
	DAVVGASLRDQNHKQTVKML	
	DAVVGASLRDQNHKQTVKML	
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	DAVVGASLRDQNHKQTVKML	
	^250	^260

FIG. 14B

FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v10	v20	v30	v40
	LTL	PDLGWDAPPENDSLVEELLPLFPTPLLAGVTATCVAL		
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	LTL	DL:WDA:P.NDSL :ELL.LFP:PLLAGVTATCVAL		
	^10	^20	^30	^40
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v50	v60	v70	v80
	FVVG	IAGNLLTMLVVS	RFREMR	TTTNYLSSMAFSDLLIF
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	FVVG	IAGNLLTMLVVS	RFRE:RTTTNYLSSMAFSDLLIF	
	^50	^60	^70	^80
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v90	v100	v110	v120
	LCMP	LDLFR	LWQYRPNHLLGNLLCKL	FOFVSESC
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	LCMP	LDLRLWQYRPNW:G:LLCKL	FOFVSESC	TYATVLT
	^90	^100	^110	^120
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v130	v140	v150	v160
	ITALS	VERYFAICFPLRAKVVVT	KGRVKLVILVIWAVAF	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	ITALS	VERYFAICFPLRAKVVVT	KGRVKLV:VIWAVAF	
	^130	^140	^150	^160
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v170	v180	v190	v200
	SAGPI	FVLVGVEH	NGTDP	PRDTNECRATEFAVRSGLLTVM
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	SAGPI	FVLVGVEH:NGTDP:DTNECR:	TEFAVRSGLLTVM	
	^170	^180	^190	^200
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v210	v220	v230	v240
	VWVSS	VFFFLPVFCLTVLYSL	IGRKLWRRKRGEAAVGS	SSL
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	VWVSS	IFFFLPVFCLTVLYSL	IGRKLWRRRRGD	AVGASL
	^210	^220	^230	^240
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v250	v260	v270	v280
	RDQNH	KQTVKMLAVVVF	AFILCWLPHVGRYLF	SKSLEPG
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	RDQNH	KQTVKMLAVVVF	AFILCWLPHVGRYLF	SKSFEPG
	^250	^260	^270	^280
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v290	v300	v310	v320
	SVEIA	QISQYCNLYS	FVLFYLSAAINPILYN	IMSKKYRVA
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	SVEIA	QISQYCNLYS	FVLFYLSAAINPILYN	IMSKKYRVA
	^290	^300	^310	^320
FIG. 3-CLON 7-3 orf PORCINO DE TIPO I	v330	v340	v350	
	VFKLL	GFEPFSORKLSTL	KDESSRAWTESSINT	
FIG. 8-orf1146 HUMANO DE TIPO I				
	VFKLL	GFEPFSORKLSTL	KDESSRAWTESSINT	
	^330	^340	^350	^360

FIG.15

ES 2 268 713 T3

		v10	v20
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	M	W	NATPSEEPGNLTL
	M	W	NATPSEEPG NLTLDL:
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	M	W	NATPSEEPGNLTLADLD
		^10	^20
		v30	v40
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	W	D	APPENDSLVEELLPLFPT
	W	D	A:P.NDSL :ELL.LFP:
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	W	D	ASPGNDSLGDPELLQFPA
		^30	^40
		v50	v60
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	P	L	LAGVTATCVALFVVGIAG
	P	L	LAGVTATCVALFVVGIAG
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	P	L	LAGVTATCVALFVVGIAG
		^50	^60
		v70	v80
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	N	L	TMLVVSFRFREMRTTTL
	N	L	TMLVVSFRF:RTTTL
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	N	L	TMLVVSFRFRELRTTTL
		^70	^80
		v90	v100
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	Y	L	SMAFSDLLIFLCMPDL
	Y	L	SMAFSDLLIFLCMPDL
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	Y	L	SMAFSDLLIFLCMPDL
		^90	^100
		v110	v120
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	F	R	LWQYRPWNLGNLLCKLFQ
	F	R	LWQYRPW:N:G:LLCKLFQ
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	V	R	LWQYRPWNGDLLCKLFQ
		^110	^120
		v130	v140
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	F	V	SECTYATVLTITALSVE
	F	V	SECTYATVLTITALSVE
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	F	V	SECTYATVLTITALSVE
		^130	^140
		v150	v160
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	R	Y	FAICFPLRAKVVVTKGRV
	R	Y	FAICFPLRAKVVVTKGRV
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	R	Y	FAICFPLRAKVVVTKGRV
		^150	^160

FIG.16A

	v170	v180
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	KLVI	KLVI
	VIWAVAFCSAGPIFV	VIWAVAFCSAGPIFV
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	KLVI	KLVI
	FVIWAVAFCSAGPIFV	FVIWAVAFCSAGPIFV
	^170	^180
	v190	v200
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	LVGVEH	LVGVEH
	NGTDP	NGTDP
	PRDTNECRA	DTNECR
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	LVGVEH	LVGVEH
	ENGTD	ENGTD
	PWDTNECRP	PWDTNECRP
	^190	^200
	v210	v220
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	TEFAVRSGLL	TEFAVRSGLL
	TVMVWSSVF	TVMVWSS:F
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	TEFAVRSGLL	TEFAVRSGLL
	TVMVWSSIF	TVMVWSSIF
	^210	^220
	v230	v240
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	FFLPVFCL	FFLPVFCL
	TVLYSLIGRKLW	TVLYSLIGRKLW
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	FFLPVFCL	FFLPVFCL
	TVLYSLIGRKLW	TVLYSLIGRKLW
	^230	^240
	v250	v260
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	RRKRGEAA	RRKRGEAA
	VGSSLRDQNHKQ	VG:SLRDQNHKQ
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	RRRRGDA	RRRRGDA
	VVGASLRDQNHKQ	VVGASLRDQNHKQ
	^250	^260
	v270	v280
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	TVKMLGGSQ	TVKMLGGSQ
	AL	AL
	LSL:GP:	LSL:GP:
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	TVKMLGGSQ	TVKMLGGSQ
	RALRLSLAGPI	RALRLSLAGPI
	^270	^280
FIG. 5-CLON 1375 m PORCINO DE TIPO II	HSSCLFSS	
	S CL: :S	
FIG. 10-CLON 1141m HUMANO DE TIPO II	LSLCLLPS	

FIG. 16B

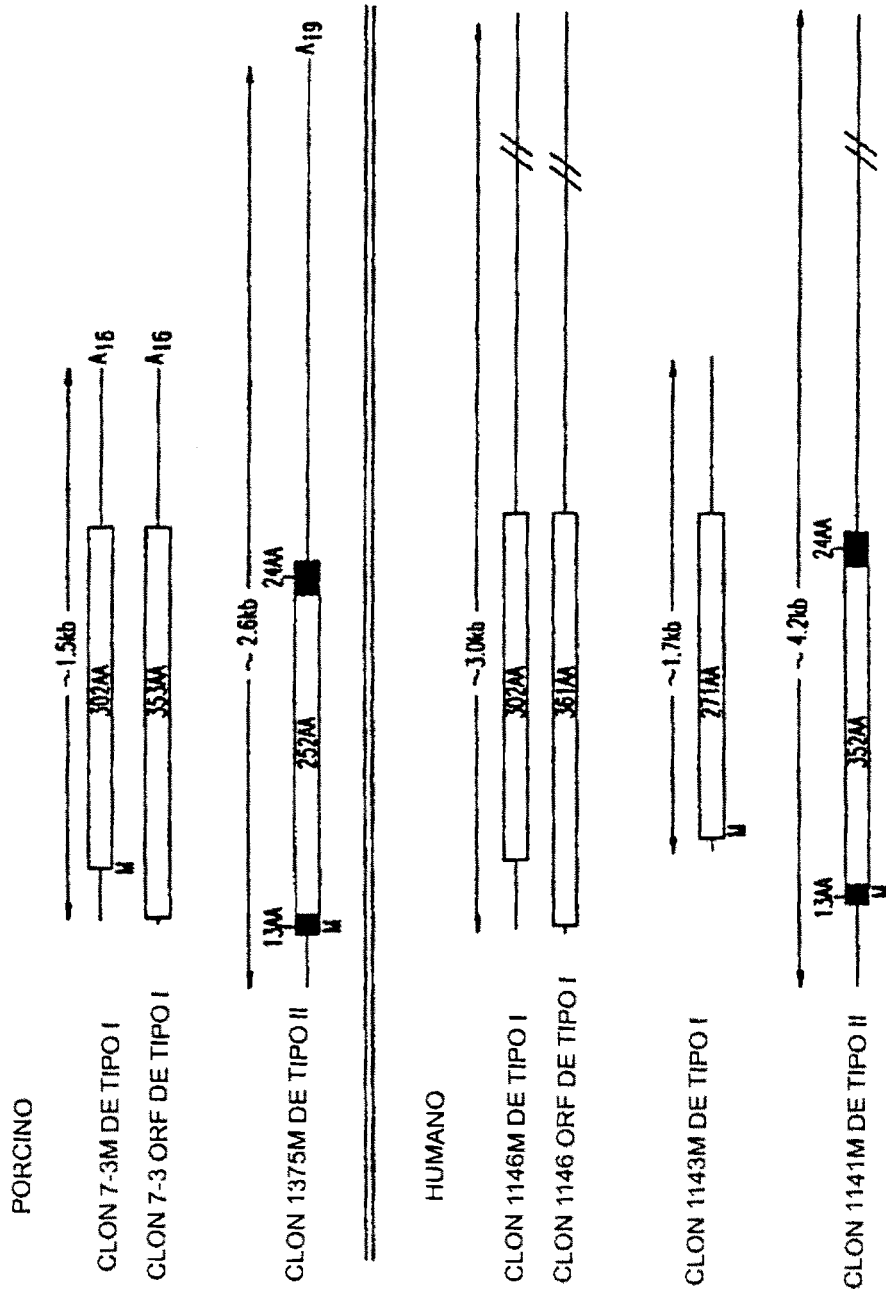


FIG.17

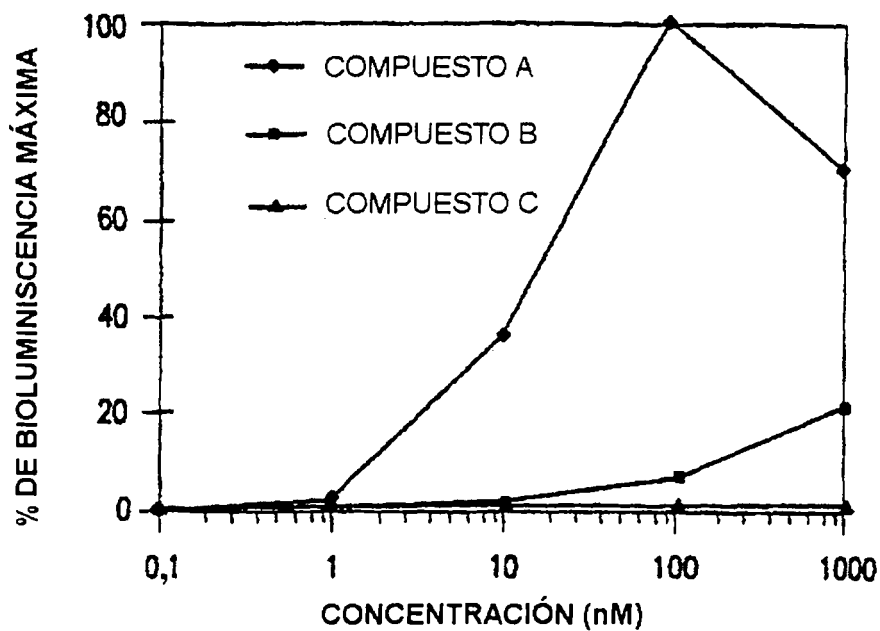


FIG.18

(100nM)	CLON PORCINO 7-3		CLON HUMANO 1146	
	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
COMPUESTO A (100 nm) (1000nM)	13.553 9.176	2.692	1.353 3.091	2.228
COMPUESTO B (100 nM) COMPUESTO C (100 nM)	717 100	425 58	113 96	108 67
GHRP-2 (1000 nM) GHRP-6 (1000 nM)	2.492 5.003		1542 617	

FIG.19

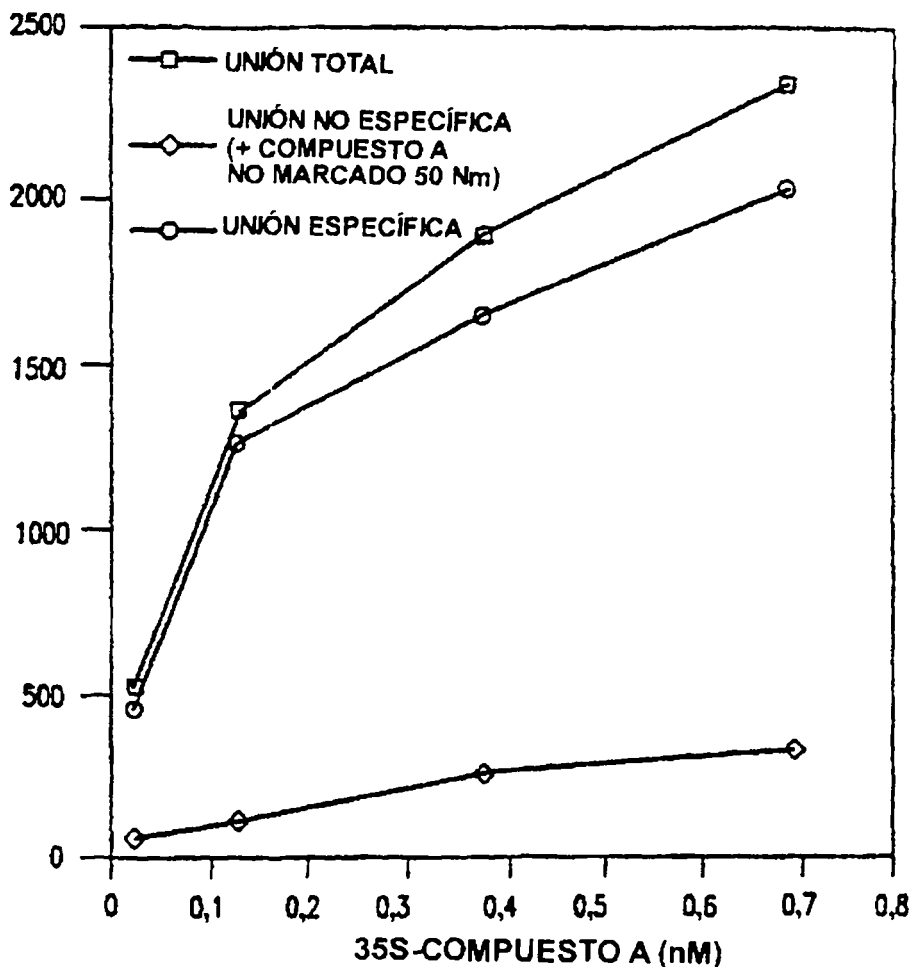


FIG.20

LIGANDO	INHIBICIÓN (% DE LA UNIÓN ESPECÍFICA DE CONTROL)
COMPUESTO A a 5nM	97
GHRP-6 a 10 nM	84
COMPUESTO C	
1.692,428 a 1 μ M	43
GALAMINA a 10 μ M	44
AMENOMEDINA a 10 μ M	19

FIG.21

1 MWNATPSEEP GFNLTADLD WDASPGNDSL GDELLQLFPA PLLAGVTATC
51 VALFVVGIAG NLLTMLVVSF FRELRTTTNL YLSSMAFSDL LIFLCMPLDL
101 VRLWQYRPWN FGDLLCKLFQ FVSECTYAT VLTITALSVE RYFAICFPLR
151 AKVVVTKGRV KLVIFVIWAV AFCSAGPIFV LVGVEHENG TDPWDTNECRP
201 TEFAVRSGLL TVMVWVSSIF FFLPVFCLTV LYSLIGRKLW RRRRGDAVVG
251 ASLRDQNHKQ TVKMLAVVVF AFILCWLPFH VGRYLFSKSF EPGSLEIAQI
301 SQYCNLVSFV LFYLSAAINP ILYNIMSKKY RVAVFRLG FEPFSQRKLS
351 LKDESSRAW TESSINT*

FIG.22

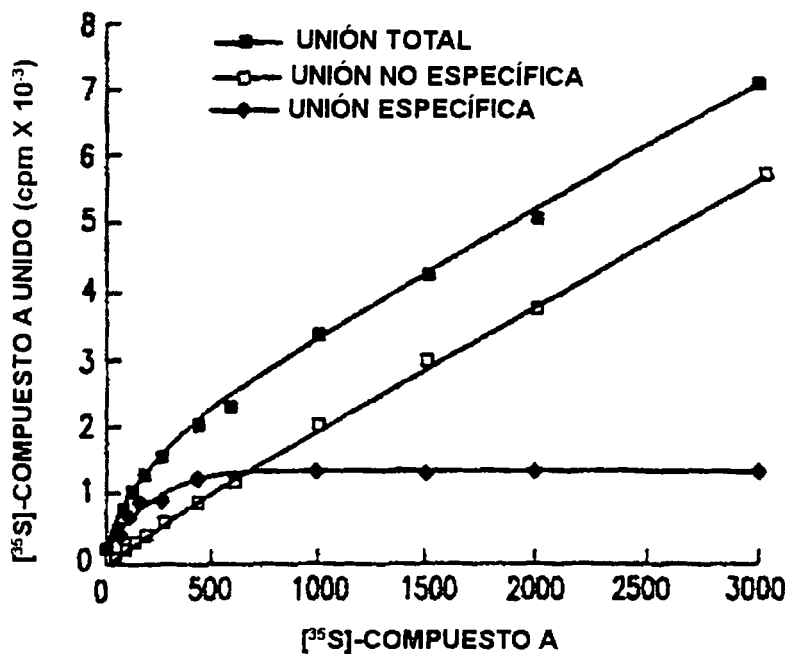


FIG.23A

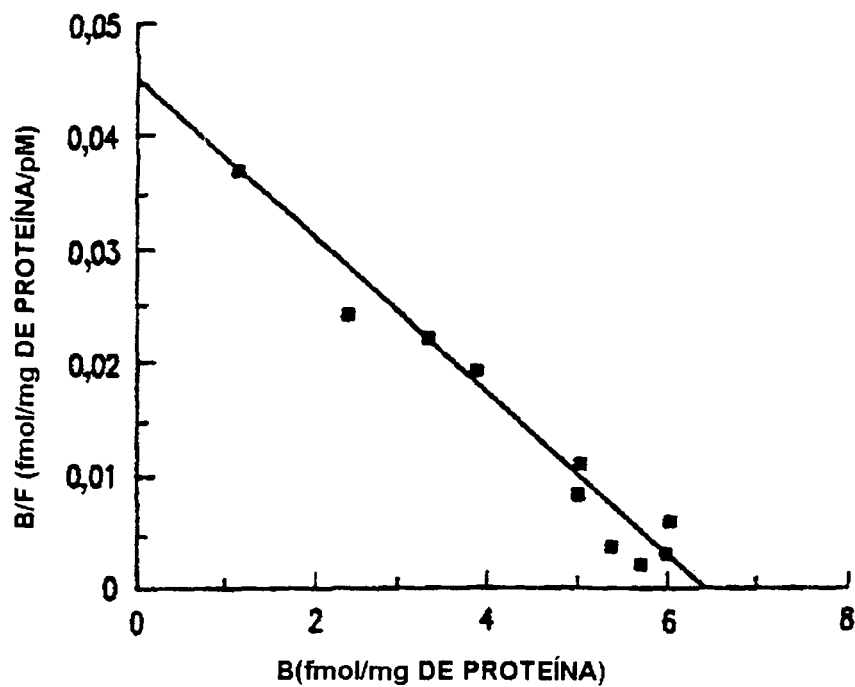


FIG.23B

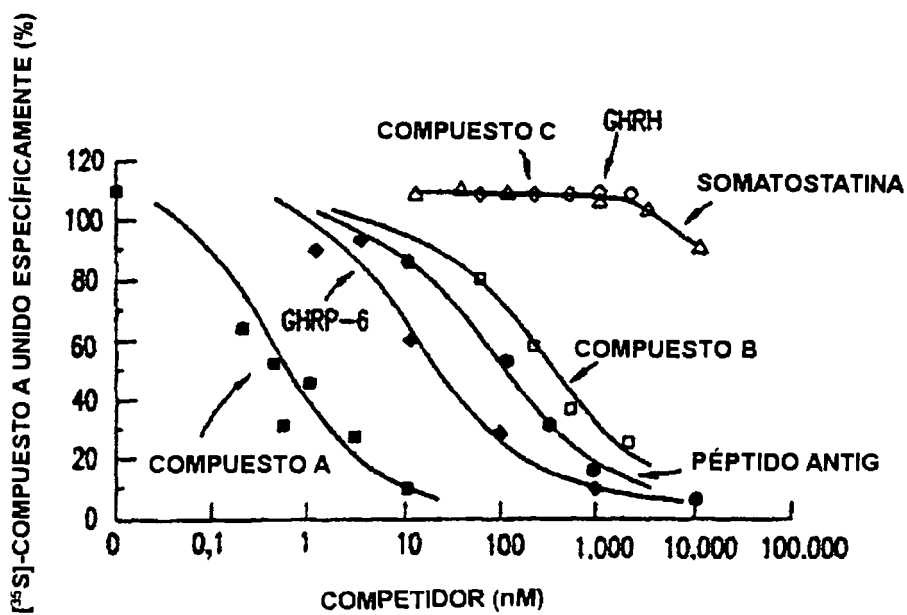


FIG.24

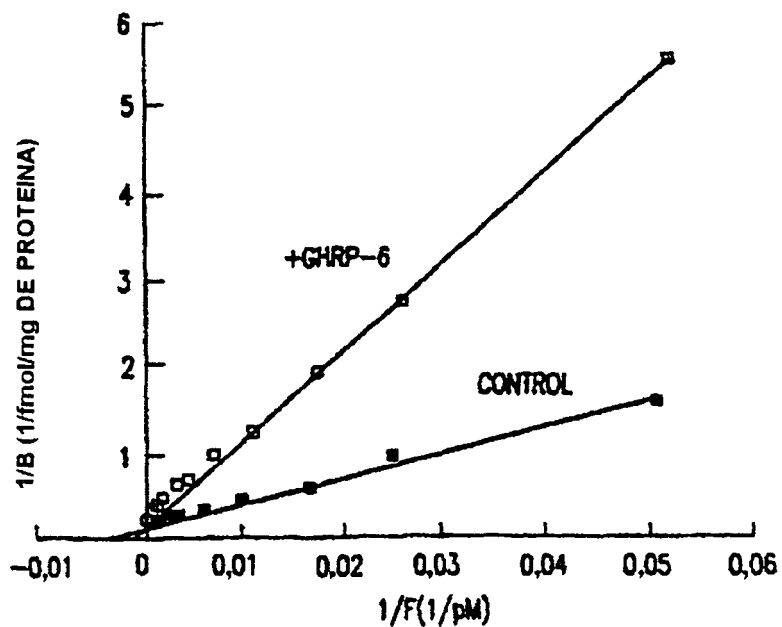


FIG.25

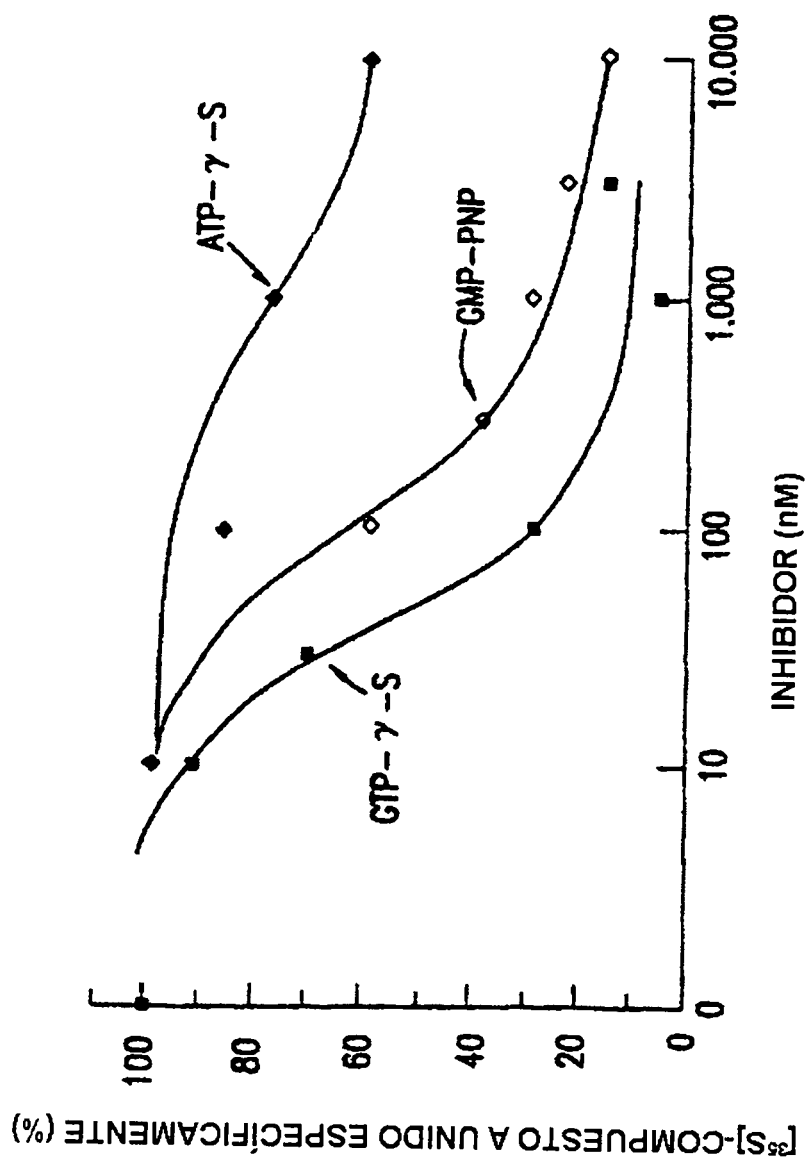


FIG.26

10	20	30	40	50	60
ATG TGG AAC GCG ACC CCC AGC GAG GAG CCG GAG CCT AAC GTC ACG TTG GAC CTG GAT TGG					60
GAC GCT TCC CCC GGC AAC GAC TCA CTG CCT GAC GAA CTG CTG CCG CTG TTC CCC GCT CCG					120
CTG CTG GCA GGC GTC ACC GCC ACC TGC GTG GCG CTC TTC GTG GGC ATC TCA GGC AAC					180
CTG CTC ACT ATG CTG GTG TCC CGC TTC CGC GAG CTG CGC ACC ACC AAC CTC TAC					240
CTG TCC AGC ATG GCC TTC TCG GAT CTG CTC ATC TTC CTG TGC ATG CCG CTG GAC CTC GTC					300
310	320	330	340	350	360
CGC CTC TGG CAG TAC CGG CCC TGG AAC TTC GGC GAC CTG CTC TGC AAA CTC TTC CAG TTT					360
GTC AGC GAG AGC TGC ACC TAC GCC ACG GTC CTC ACC ATC ACC GCG CTG AGC GTC GAG CGC					420
TAC TTC GCC ATC TGC TTC CCT CTG CGG GCC AAG GTG GTC ACT AAG GGC CGC GTG AAG					480
CTG GTC ATC CTT GTC ATC TGG GCC GTG GCT TTC TGC AGC GCG GGG CCC ATC TTC GTG CTG					540
GTG GGC GTG GAG CAC GAA AAC GGC ACA GAT CCC CGG GAC ACC AAC GAA TGC CGC GCC ACC					600
610	620	630	640	650	660
GAG TTC GCT GTG CGC TCT GGG CTG TCT GGG CTG CTC ACC GTC ATG GTG TGG GTG TCC AGC GTC TTC TTC					660
TTT CTA CCG GTC TTC TGC CTC ACT GTG CTC TAC AGT CTC ATC GGG AGG AAG CTA TCG CGG					720
AGA CGC GGA GAT GCA GCG GTG GGC GCC TCG CTC CGG GAC CAG AAC CAC AAG CAG ACA GTG					780
AAG ATG CTT Ggt gag tcc tgg cac ccg ctg acc ttt ctt ccc cca ctg cct gcc ctt ccc					840
cag cgg cct cta ttt ctg ttt ctc atc atc tcc gct ccc caa gtc tct caa gtc tct gtc					900

FIG.27A

```

910          920          930          940          950          960
.           .           .           .           .           .
ttt ctc tgc ctc tct cac ctt ggt tct cgg tct cac tgc ttt ctg ttt tct tcc tgt ctt 960
ttc ctg tat ctt gtc cac gaa aaa gaa ccc tca tat tgg taa ttc ctt aaa acg agg aac 1020
ctt ggt ctg gga aaa ttg gtc caa gat gga aat acc tca cgg ttt att gag ccc cta att 1080
ggt aac ggt tta gct tct tgt ctc aca tag aat ttg tgg tta tca aag taa taa tat taa 1140
ggt aag cag gca ggt aat ggg ttt aga aat cac tcc atg gta agt cta acc aca aat ttg 1200

1210          1220          1230          1240          1250          1260
.           .           .           .           .           .
ggt cac tct gtt aag gac ggc tta tag atg tat ttt gtt tgt ttt caa tat tgg gat ttg 1260
ttt tct gcc ctg cat ctt tct cag ata att aca tcc act ctg ttt agt cta tgg ttt tgc 1320
cag gag ggg ctt cat gct ggg gtc tcc ttt ttc ttg ttt ttg tat ttg tct ccc cag taa 1380
tat agg cca gga tag ggt gga gaa gtc atc ctt tcc tca aac tgt cct tca gga agg tct 1440
ggg tac tga acg gtt act gca taa act ctg ctt ccc caa agg cat gtg ctt ggt gtg gta 1500

1510          1520          1530          1540          1550          1560
.           .           .           .           .           .
aag tca tga aga tgg tgc tca tga tgt cca aga gga acc tct gat ctc act ttt caa ggg att 1560
tca tgt ttg ctg aca ttt aat act tgt tag ttt ttg cag ggg gat gat ttc tca ttt gca 1620
att tta tta ttc tca aat tct gca tgt cag aat gtt aga gat ttc tca ggg atg tca ggt 1680
tct gtt tcc aga tga gtg att gcc ctg tgt cct cca ttg gac tgt aaa ctc ata tgc acc 1740
aga cag ggt cta cat tgc tgc cgt ggt gca tag cct tcc atg tgt cac tta gtc cta aag 1800

```

FIG.27B

```

1810      1820      1830      1840      1850      1860
aga agt tac taa taa cct aat ctc act aat ctc act ggc atc tca atg ccg atc cca ttg 1860
tca fct gaa aat ttg aag ggg aca tta aag tgg cac agg gac cag aac aat att ttt ctc 1920
tca ttg ctg aat ttt aaa aac aat cta aaa aat tgg aat tct tga aga aac tat ctt ata 1980
tga cta aaa tga agc ctt ggg agt cta att att att gtc tgg ctt acc tgc ccc ccc 2040
cac tac tta tat ctt tta gag atg aca cag act tgc ttt ccc tgt ggc tac taa tcc caa 2100

2110      2120      2130      2140      2150      2160
ttg cac att cag tcc ctt gat aga ctt act cta aaa atc taa gtt cag cgg tcc acg aaa 2160
cat aac aaa gcc tgt cct aaa aca gca aga aag aaa gaa aga aag aaa gca aga aag aaa 2220
gca aga aag aaa gaa aga aca cag aag aca aac aag gtc ttt ccc cat tcc cta aca tac 2280
agg aat gga aat tat taa gtc tac gtg ata gcc aat gca tct gtt tct tca gta tgc cca 2340
caa ggg tgc tgc cgg agc cat tgc tca ggg ctg gag tat tta ctg ggc atg ctt gac ccc 2400

2410      2420      2430      2440      2450      2460
agc atg gag ggt gag aag tgc tcc tgg gaa ctc tga tcc act gct gtg gtg gag agc aaa 2460
cac ctg gcc tca ttt ata ctt gtt gtc tgt ata atg cat ata aat ggg gga taa tca tta 2520
cta aac tgt tta gct gag cct cat gtc agt caa tca caa agc aga gta att acc aca cag 2580
act ggg aag ctc agt gaa gat tgt tag cgg ttg gtc tga cag tct tgc tgt gtg cta tag 2640
tgt tag acc caa cgg agg cag tat tta toa gga ggg cag ggt tcc atg ttt ccc gtg tta 2700

```

FIG.27C

```

2710      .      2720      2730      2740      2750      2760
aag agc aag aga tga tgt ttg tca gta ggc atg cag ctc atg gtg aaa aga aag tcc aga . 2760
ctt aaa gat gtg aag tga ttt gtg ctt tgc ccc acc ctg aca gtc tct ctc tgt gtg cst 2820
tca GCT GTG GTG GTG TTT GCT TTC ATC CTC TGC TGG TGG CTG CCC TTC CAC GTG GGA AGA TAC 2880
CTC TTT TCC AAG TCC TTC GAG CCT GGC TCT CTG GAG ATC GCT CAG ATC AGC CAG TAC TGC 2940
AAC CTG GTG TCC TTT GTC CTC TTC TAC CTC AGC GCT GCC ATC AAC CCC ATT CTG TAC AAC 3000

3010      3020      3030      3040      3050      3060
ATC ATG TCC AAG AAG TAC CGG GTG GCA GTG TTC AAA CTG CTA GGA TTT GAA ICC TTC TCC . 3060
CAG AGA AAG CTT TCC ACT CTG AAG GAT GAG AGT TCC CGG GCC TGG ACA AAG TCG AGC ATC 3120
AAC ACA TGA 3129

```

FIG.27D

10	20	30	40	50	60
ATG TGG AAC GCG ACC CCC AGC GAG GAG CCG GAG CCT AAC GTC ACG TTG GAC CTG GAT TGG					60
GAC GCT TCC CCC GGC AAC GAC TCA CTG CCT GAC GAA CTG CTG CCG CTG TTC CCC GCT CCG					120
CTG CTG GCA GGC GTC ACC GCC ACC TGC GTG GCG CTC TTC GTG GTG GGC ATC TCA GGC AAC					180
CTG CTC ACT ATG CTG GTG TCC CGC TTC CGC GAG CTG CGC ACC ACC ACC AAC CTC TAC					240
CTG TCC AGC ATG GGC TTC TCG GAT CTG CTC ATC TTC CTG TGC ATG CCG CTG GAC CTC GTC					300
310	320	330	340	350	360
CGC CTC TGG CAG TAC CCG CCC TGG AAC TTC GGC GAC CTG CTC TGC AAA CTC TTC CAG TTT					360
GTC ACC GAG AGC TGC ACC TAC GCC ACG GTC CTC ACC ATC ACC GCG CTG AGC GTC GAG CGC					420
TAC TTC GCC ATC TGC TTC CCT CTG CCG GCC AAG GTG GTC ACT AAG GGC CGC GTG AAG					480
CTG GTC ATC CTT GTC ATC TGG GCC GTG GCT TTC TGC AGC GCG GGG CCC ATC TTC GTG CTG					540
GTG GGC GTG GAG CAC GAA AAC GGC ACA GAT CCC CGG GAC ACC AAC GAA TGC CGC GCC ACC					600
610	620	630	640	650	660
GAG TTC GCT GTG CGC TCT GGG CTG CTC ACC GTC ATG GTG TGG GTG TCC AGC GTC TTC TTC					660
TTT CTA CCG GTC TTC TGC CTC ACT GTG CTC TAC AGT CTC ATC GGG AGG AAG CTA TGG CCG					720
AGA CGC GGA GAT GCA GCG GTG GGC GCC TCG CTC CCG GAC CAG AAC CAC AAG CAG ACA GTG					780
AAG ATG CTT GCT GTG GTG TTT GCT TTC ATC CTC TGC TGG CTG CCC TTC CAC GTG GGA					840
AGA TAC CTC TTT TCC AAG TCC TTC GAG CCT GGC TCT CTG GAG ATC GCT CAG ATC AGC CAG					900

FIG.28A

910	TAC TGC AAC CTG GTG TCC TTT GTC CTC TTC TAC CTC AGC GCT GCC ATC AAC CCC ATT CTG	960
	TAC AAC ATC ATG TCC AAG AAG TAC CGG GTG GCA GTG TTC AAA CTG CTA GGA TTT GAA TCC	950
	TTC TCC CAG AGA AAG CTT TCC ACT CTG AAG GAT GAG AGT TCC CGG GCC TGG ACA AAG TCG	940
	AGC ATC AAC ACA	930
		920
		910
		1092
		1020
		960

FIG.28B

ES 2 268 713 T3

10	20	30	40	50	
MWNATPSEEP	EPNVTLDLDW	DASPGNDSL	DELLPLFPAP	LLAGVTATCV	50
ALFVVGISGN	LLTNLVSRF	RELRTTTNLY	LSSMAFSDL	IFLCMPDLV	100
RLWQYRPWNF	GDLLCKLFQF	VSECTYATV	LTITALSVER	YFAICFPLRA	150
KVVVTKGRVK	LVILVIWAVA	FCSAGPIFVL	VGVEHENGTD	PRDTNECRAT	200
EFAVRSGLLT	VMVWSSVFF	FLPVFCLTVL	YSLIGRKLWR	RRGDAAVGAS	250
260	270	280	290	300	
LRDQNHKQTV	KMLAVVVF	ILCWLPFHVG	RYLFSKSFEP	GSLEIAQISQ	300
YCNLVSVFLF	YLSAAINPIL	YNIMSKKYRV	AVFKLLGFES	FSQRKLSTLK	350
DESSRAWTKS	SINT	364			

FIG.29

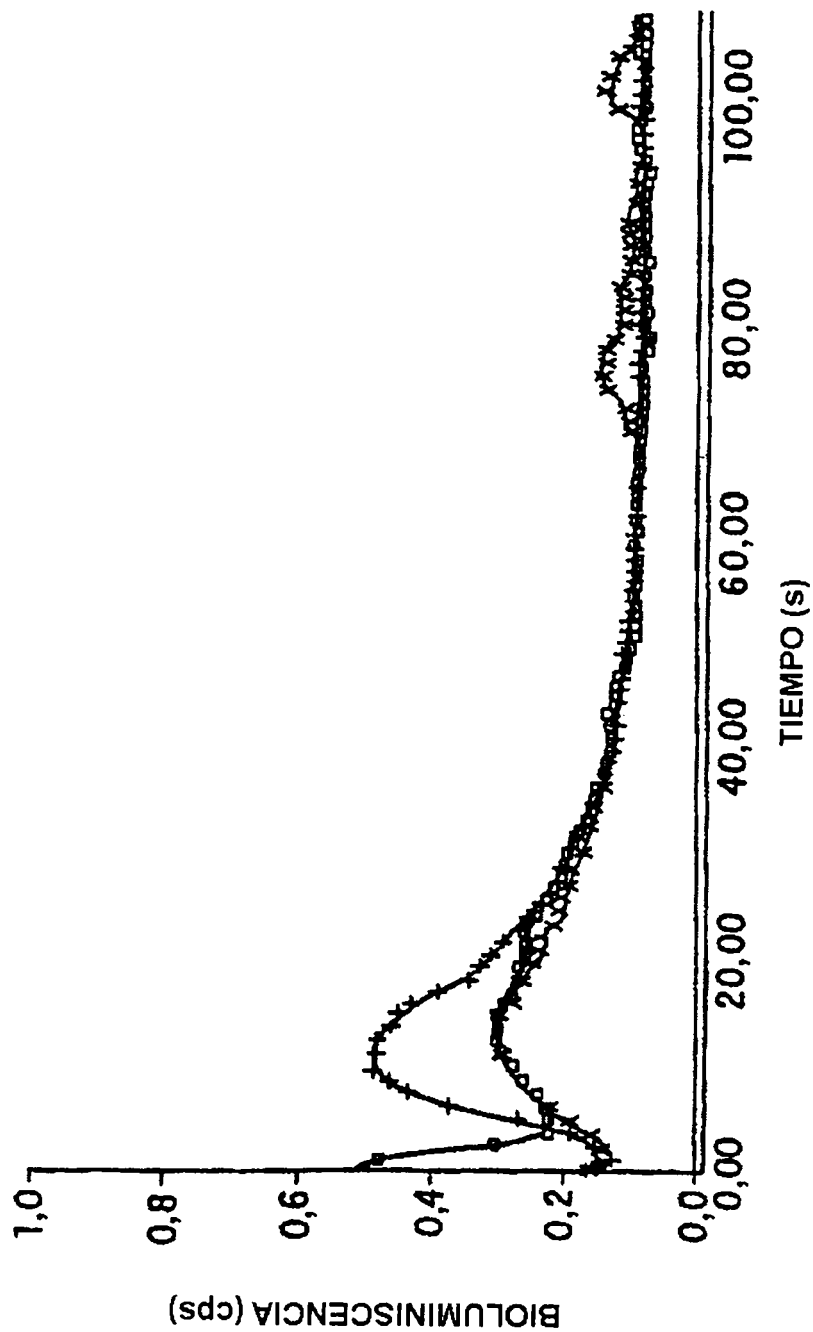


FIG. 30