



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 314 447**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 5/08 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04776530 .0**

⑨6 Fecha de presentación : **15.06.2004**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1633859**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

⑤4 Título: **Línea celular y usos de la misma.**

③0 Prioridad: **17.06.2003 US 463123**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

⑦3 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6A-1, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

⑦2 Inventor/es: **Fry, Dennis, G.;**
Collins, Christine, A. y
Dayton, Brian, D.

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Línea celular y usos de la misma.

5 **Antecedentes de la invención****Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva línea celular, denominada T42402I3.4.2 y a usos de esta línea celular. Por ejemplo, la línea celular puede usarse en la producción de proteína receptora de la hormona concentradora de melanina (MCH) no recombinante y en la identificación de antagonistas, agonistas inversos y agonistas del receptor.

Información antecedente

El receptor de MCH recombinante se ha expresado en una diversidad de líneas celulares y estas líneas celulares se han utilizado para elucidar las rutas de señalización intracelular potenciales del receptor (Griffond y Baker, *Int. Rev. Cytol.* 213: 233-277 (2002) y Hawes *et al.*, *Endocrinology* 141: 4524-4532 (2000)). Además, se ha descrito que varias líneas celulares expresan ARNm de MCHR₁ y/o se unen a ¹²⁵I-MCH o presentan activación del receptor mediada por MCH (Bradley *et al.*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: E584-E592 (2002); Burgaud *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 622-629 (1997); Saito *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 44-50 (2001); Tadayyon *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 709-712 (2000) y Takahashi *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 86: 369-374 (2001)). Sin embargo, algunos de los informes de unión de MCH a diversas líneas celulares pueden no ser correctos debido al alto nivel de unión inespecífica que se observa con algunos de los péptidos marcados con ¹²⁵I usados en estudios publicados (Kokkotou *et al.*, *Neuropeptides* 34: 240-247 (2000)).

También se ha descrito el uso del receptor recombinantes para descubrir antagonistas moleculares pequeños de la activación del receptor de MCH (Takekawa *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 438: 129-135 (2002) y Borowsky *et al.*, *Nature Medicine* 8: 825-830 (2002)).

En vista de lo anterior, existe una necesidad significativa de descubrir métodos de producción del receptor. Una vez que se produzca el receptor, por ejemplo, puede utilizarse para descubrir antagonistas, agonistas y agonistas inversos relacionados con el mismo. También puede utilizarse para elucidar las rutas fisiológicas en las que está implicado el receptor.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención incluye una línea celular aislada denominada T42402I3.4.2 ("I.3.4.2") y que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201.

La presente invención también incluye composiciones que comprenden células de la línea celular o membranas de las células.

Además, la presente invención también incluye la línea celular anterior, en la que se mantiene la sensibilidad a MCH durante más de diez pases de cultivo. La MCH puede ser péptido MCH humano nativo o MCH de otra especie, por ejemplo, MCH de salmón o formas modificadas de dicho péptido MCH, por ejemplo, mediante delecciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos, de tal modo que el péptido resultante conserva su capacidad para unirse a MCHR₁ con una K_d de <100 nM. La línea celular también presenta una CE₅₀ de aproximadamente 90 nM para la movilización de calcio⁺⁺ mediada por MCH. Además, la invención incluye una composición que comprende células de esta línea celular.

Además, la presente invención incluye un método de producción de receptor de MCH que comprende las etapas de cultivar células de la línea celular anterior, o una línea celular derivada de la misma, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la producción del receptor de MCH.

Además, la presente invención incluye un método de identificación de un antagonista o agonista inverso para el receptor de MCH (MCHR), que comprende las etapas de: a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, con un compuesto de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el compuesto de ensayo se una a MCHR producido por las células; b) añadir MCH a dichas células puestas en contacto de la etapa (a); y c) medir el flujo de entrada de calcio intracelular en las células de la etapa (a) en comparación con células de esta línea celular que no se han expuesto al compuesto de ensayo, indicando una disminución en el flujo de entrada de calcio intracelular en las células puestas en contacto en la etapa (a) en comparación con células de la línea celular que no se han expuesto al compuesto de ensayo que el compuesto de ensayo es un antagonista o agonista inverso para el receptor de MCH.

Además, la presente invención incluye un método de identificación de un agonista para el receptor de MCH que comprende las etapas de: a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, con un compuesto de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el compuesto de ensayo se una a MCHR producido por células de la línea celular; y b) medir el flujo de entrada de

calcio intracelular en las células de la etapa (a) en comparación con células de la línea celular que no se han expuesto al compuesto de ensayo, indicando un aumento en el flujo de entrada de calcio intracelular en las células de la etapa (a) en comparación con células de la línea celular que no se han expuesto al compuesto de ensayo que el compuesto de ensayo es un agonista para el receptor de MCH.

Además, la presente invención incluye un método de determinación de la afinidad de unión de MCH a MCHR, que comprende las etapas de: a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, o membranas de la misma con un conjugado de MCH, en el que el conjugado comprende MCH unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el MCHR producido por células de la línea celular se una a la MCH del conjugado; b) añadir MCH sin marcar al MCHR unido durante un tiempo y en condiciones suficientes para que la MCH sin marcar desplace al conjugado y, en particular, la MCH del conjugado; y c) detectar la intensidad de una señal generada por el compuesto generador de señal, en el que la intensidad de la señal es proporcional al desplazamiento de la MCH conjugada por la MCH sin marcar e indica la afinidad de unión de la MCH del conjugado con el MCHR.

Además, la presente invención incluye un método de identificación de una composición que inhibe la unión de MCH a MCHR, que comprende las etapas de: a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito A.T.C.C. PTA-5201, o membranas de la misma con un compuesto de ensayo sospechoso de inhibir la unión de MCH a MCHR durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el compuesto de ensayo se una al MCHR producido por células de la línea celular; b) añadir un conjugado a las células puestas en contacto de la línea celular de la etapa (a), donde el conjugado comprende MCH unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal medible; y c) medir la inhibición de la unión de MCH a MCHR mediante el compuesto de ensayo por cuantificación de la señal medible generada y comparación de la señal medible generada con una señal de control producida en ausencia del compuesto de ensayo, indicando la señal de control el porcentaje de inhibición cero de la unión de MCH a MCHR, indicando una señal menor obtenida con el uso del compuesto de ensayo en comparación con la señal de control que el compuesto de ensayo inhibe parcialmente o completamente la unión de MCH a MCHR.

La presente invención también incluye un método de diferenciación entre un antagonista y un agonista inverso de MCHR, que comprende las etapas de: a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, o membranas de la misma con un compuesto de ensayo sospechoso de inhibir la activación de MCHR durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el compuesto de ensayo se una al MCHR producido por células de la línea celular; b) añadir un conjugado a las células puestas en contacto en la etapa (a), donde el conjugado comprende MCH unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal medible; y c) medir la inhibición de un nivel basal de actividad de MCHR por el compuesto de ensayo mediante la cuantificación de la señal medible generada y la comparación de la señal medible generada con una señal de control producida en ausencia del compuesto de ensayo. La señal de control indica la actividad basal de MCHR; por lo tanto, una señal menor obtenida con el uso del compuesto de ensayo en comparación con la señal de control indica que el compuesto es un agonista inverso de MCHR, y una señal equivalente obtenida con el uso del compuesto de ensayo en comparación con la señal de control indica que el compuesto es un antagonista de MCHR.

Además, la presente invención incluye un método para producir una línea celular que exprese MCHR. Este método comprende las etapas de: a) poner en contacto células IMR32 con ADN que codifica $G\alpha_{16}$ y un marcador de resistencia a antibióticos; b) añadir un antibiótico para el marcador de resistencia a antibióticos a las células puestas en contacto; c) aislar las células resistentes al antibiótico de la etapa (b) y propagar las células aisladas; d) añadir a las células propagadas el antibiótico a una concentración superior a la usada en la etapa (b); y e) aislar las células resultantes de la etapa (d) y propagar las células aisladas para producir una línea celular que produzca MCHR. Las concentraciones crecientes del antibiótico sirven para estabilizar la expresión de los genes que codifican el MCHR, $G\alpha_{16}$ y marcador de resistencia a antibióticos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a muestra la secuencia de aminoácidos de MCHR₁ de las células I3.4.2 (SEC ID N°: 1), deducida a partir de la secuencia de ADN genómico de MCHR₁, y la Figura 1b ilustra un análisis de qPCR de la expresión de MCHR en células parentales e I3.4.2.

La Figura 2 ilustra una curva de respuesta a la dosis de la línea celular I3.4.2 a MCH.

La Figura 3 ilustra la inhibición del flujo de Ca^{++} inducido por MCH por dos antagonistas de MCHR₁.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una línea celular obtenida por ingeniería genética denominada T42402I3.4.2 (o "I3.4.2"), que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, cuyas células producen el receptor de o proteína MCH. La línea celular se obtuvo de la línea celular IMR32 (que tiene el número de denominación de depósito de la ATCC CCL-127, disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manas-

sas, VA 20110-2209) a través de la transfección de un plásmido que codifica la proteína $G\alpha_{16}$. La IMR32 es una línea celular de neuroblastoma humano que expresa ARNm de receptor de la hormona concentradora de melanina (MCHR) (véase, Takahashi *et al.*, anteriormente (2001)); sin embargo, existía una incapacidad para detectar la señalización intracelular en respuesta a MCH en la línea celular IMR32.

La nueva línea celular mantiene la sensibilidad a MCH durante más de diez pases de cultivo y presenta una CE_{50} de aproximadamente 90 nM para la movilización de Ca^{++} mediada por MCH (como se mide usando un lector de placas de formación de imágenes fluorométricas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)). El análisis de secuencia (Figura 1a) indica que la secuencia de MCHR₁ codificada en la línea celular I3.4.2 es la misma que la descrita en la bibliografía (Griffondo y Baker, anteriormente (2002)). Inesperadamente, las células de la línea celular I3.4.2 expresan un nivel mucho mayor de ARNm de MCHR₁ que las células de la línea celular parental IMR32, como se muestra mediante el análisis de qPCR (Figura 1b).

En particular, la línea celular puede ser útil en la producción del receptor de MCH; para el descubrimiento y desarrollo de agonistas, agonistas inversos y antagonistas del receptor de MCH, y también para el estudio de los efectos de MCH, agonistas de MCHR, agonistas inversos de MCHR y antagonistas de MCHR sobre un modelo celular de origen neuronal *in vitro*. Dicha línea celular puede ser un tipo celular más pertinente para el estudio de un antagonista o agonista de receptor neuropeptídico que las líneas celulares de fibroblastos HEK o CHO usadas más comúnmente que expresan receptores recombinantes.

También debería señalarse que muchas rutas de señalización intracelular se ven afectadas por la presencia de MCH. Por lo tanto, un compuesto que se une al receptor de MCH y previene la activación del mismo alterará el curso natural o el resultado de dichas rutas. Por consiguiente, la presente línea celular puede usarse en la identificación de antagonistas o agonistas inversos que afecten a estas rutas. Por ejemplo, la línea celular puede usarse en la identificación de antagonistas o agonistas inversos para el receptor que después impiden la activación de MAPK y la hidrólisis de fosfatidilinositol y permiten la acumulación de AMPc (es decir, productos secundarios o productos finales en las rutas). Como alternativa, si se desea afectar positivamente a estas rutas, se puede usar la línea celular para identificar agonistas que potencien la función del receptor de MCH.

En relación con la propia hormona, la MCH es un neuropeptido cíclico de 19 aminoácidos que ha demostrado que regula la ingesta de alimento y la homeostasis energética en roedores. Cuando se inyecta por vía intracerebral en el hipotálamo de roedores, la MCH estimula la ingesta de alimento. La expresión de ARNm de MCH está elevada en ratones ob/ob genéticamente obesos y los ratones transgénicos que sobreexpresan MCH son hiperfágicos y obesos. Por el contrario, los ratones transgénicos que no expresan MCH (MCH^{-/-}) son hipofágicos y delgados. Los ratones que no expresan el receptor de MCH (MCHR^{-/-}), aunque no son hipofágicos, continúan estando delgados cuando se alimentan con una dieta rica en grasa (Chen *et al.*, Endocrinol. 143: 2469-2477 (2002); Marsh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 3240-3245 (2002)).

La presente invención puede ilustrarse mediante el uso de los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo I

Generación de la línea celular y determinación de la señalización celular

Se cultivaron células IMR32 (ATCC n° CCL-127) en medio esencial mínimo (MEM)/suero fetal bovino al 10%/gentamicina 50 μ g/ml (medio de cultivo). Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a 200.000 células/pocillo. Para la transfección, se mezcló ADN de un plásmido que codificaba $G\alpha_{16}$ y un marcador de resistencia a zeocina con Lipofectamine 2000 en MEM sin suero, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY). Esta solución se aplicó a células IMR32 en medios de cultivo. Seis horas después, este medio de transfección se retiró y se reemplazó con medio de cultivo recién preparado. Veinticuatro horas después, las células se trataron con tripsina, se resuspendieron y se volvieron a sembrar en placas de cultivo de 6 pocillos a aproximadamente un cuarto de la densidad celular original.

Al día siguiente, se añadió zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA) a una concentración final de 20 μ g/ml. Las células se mantuvieron en este medio con reemplazo periódico hasta que se observaron colonias separadas. Las colonias individuales se aislaron y se propagaron hasta que se obtuvieron poblaciones celulares suficientemente grandes, de tal modo que las muestras de células podían criopreservarse. Después de la criopreservación, las células se evaluaron para la señalización mediada por MCH. Dicha señalización se determinó usando un ensayo similar al descrito en el Ejemplo III en relación con la movilización de Ca^{++} , excepto por que no se incluyeron compuestos antagonistas en el ensayo y se aplicaron concentraciones variables de MCH (de 1 nM a 10 μ M) (Bachem, King of Prussia, PA) a las células para determinar una CE_{50} para activación del receptor.

La línea celular obtenida inicialmente (es decir, I3.4) no presentaba una respuesta estable a MCH. Durante el transcurso de 3-4 pases de cultivo, la respuesta de las células a MCH disminuyó hasta niveles indetectables en el ensayo de movilización de Ca^{++} .

Dicha inestabilidad fenotípica es habitual en líneas celulares transfectadas debido a la elevada tasa de modificaciones genéticas que aparecen en dichas poblaciones celulares. La reselección y subclonación de la línea celular inicial a veces permite el aislamiento de una variante más estable de dentro de la población celular original. El uso de una mayor concentración de agente selectivo aumenta la presión selectiva para un alto nivel de expresión del transgén de resistencia a fármacos. Puesto que el transgén no seleccionado, en este caso $G\alpha_{16}$, está estrechamente ligado genéticamente al transgén de resistencia a fármacos, este proceso de reselección tiende a seleccionar variantes clonales que presentan un alto nivel de expresión tanto del gen marcador como del transgén no seleccionado. Por lo tanto, para recuperar una línea celular sensible a MCH, se descongelaron células criopreservadas y, posteriormente, se volvieron a seleccionar para resistencia a zeocina a 200 $\mu\text{g/ml}$ en un intento por obtener una línea celular con una expresión más estable del fenotipo deseado. Se aislaron colonias celulares individuales, se propagaron y se ensayaron como se ha descrito anteriormente.

La línea celular resultante, T42402I3.4.2, mantenía la sensibilidad a MCH, como se midió usando el ensayo de movilización de Ca^{++} , durante más de diez pases de cultivo. Se muestran curvas de la CE_{50} típica para las células en la Figura 2. Se descubrió que la CE_{50} era de 80 nM ($\text{ETM} = 12$, $n = 8$), un valor que es comparable con los informes de CE_{50} de la bibliografía para líneas celulares que expresan MCHR₁ recombinante (Chambers *et al.*, Nature 400: 261-265 (1999); Saito *et al.*, Nature 400: 265-269 (1999); Lembo, Nature Cell Biol. 1: 267-271 (1999); Hawes *et al.*, Endocrinol. 141: 4524-4532 (2000)).

La línea celular I3.4.2 de la presente invención se depositó con la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 15 de mayo de 2003 bajo los términos del Tratado de Budapest y ha recibido la denominación de depósito PTA-5201.

Ejemplo II

Secuencia de MCHR₁ y expresión de ARNM en células I3.4.2

La secuencia de MCHR₁ se determinó para células I3.4.2. En resumen, se lavaron células confluentes con D-PBS para eliminar el medio de cultivo, se lisaron con 5 ml de reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se preparó el ARN siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN resultante se trató con ADNasa RQ1 (Promega, Madison, WI) para reducir el nivel de ADN contaminante. Se realizó una transcripción inversa del ARN con Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, por duplicado, para preparar ADNc como un sustrato para PCR. Se amplificó ADNc usando polimerasa Platinum PFX (Invitrogen, Carlsbad, CA) con los cebadores de PCR enumerados a continuación:

5' exterior CTC AGC TCG GTT GTG GGA GC (SEC ID N°:2)

5' interior AGG CGA CCG GCA CTG GCT GG (SEC ID N°:3)

5' cds ATG GAC CTG GAA GCC TCG CTG CTG CCC (SEC ID N°:4)

3' exterior GGT GGC GTG TTG TGG TGC CC (SEC ID N°:5)

3' interior GAC TTG GAG GTG TGC AG (SEC ID N°:6)

3' cds TCA GGT GCC TTT GCT TTC TGT CCT CTC (SEC ID N°:7)

Las condiciones de ciclado de la PCR eran: 1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C/30 s a 50°C/2 min a 68°C; y un ciclo de 10 min a 68°C. Después de la amplificación inicial usando los cebadores exteriores, se volvió a amplificar una muestra de 1 μl de esta amplificación por PCR inicial (30 ciclos) usando el conjunto de cebadores anidados (interiores) enumerados anteriormente. Los productos de la reacción de PCR anidada se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa y la banda de mayor peso molecular obtenida se purificó en gel y se secuenció. Aunque los productos de la reacción de amplificación eran de mayor tamaño que el esperado en base al tamaño descrito del transcrito de MCHR₁, se secuenció el ADN de ocho productos de PCR generados de forma independiente usando los cebadores enumerados a continuación y la tecnología de secuenciación cíclica Perkin-Elmer Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

ES 2 314 447 T3

Cebadores de secuenciación:

mchrl seq 3.1 5'-TTT CTG TCC TCT CCT CGT CA (SEC ID N°:8)

mchrl seq 3.2 5'-CTG TAG CAC ATA GTA GGG TG (SEC ID N°:9)

mchrl seq 3.3 5'-TAT GCC GCA GCC CAC TGC AC (SEC ID N°:10)

mchrl seq 3.4 5'-AAG ATG ACC GTG GAG TTC CC (SEC ID N°:11)

mchrl seq 5.1 5'-GCT GCC GCA GCC TGC GTG GG (SEC ID N°:12)

mchrl seq 5.2 5'-ACC AGC TCA TGG GCA ATG GG (SEC ID N°:13)

mchrl seq 5.3 5'-GCA TGA CGT CCT CAG TGG CC (SEC ID N°:14)

Los resultados de la secuenciación de ADN indicaban que las bandas secuenciadas se obtuvieron a partir de ADN genómico, probablemente el resultado de una digestión incompleta con RQ1. Puesto que la secuencia genómica contiene sólo un intrón corto, la amplificación de ADN genómico traza no era un resultado improbable del procedimiento usado. La secuencia obtenida es idéntica a la secuencia del GENBANK NM_005297. La secuencia de aminoácidos predicha se muestra en la Figura 1a (SEC ID N°:1).

La expresión relativa de ARNm de MCHR₁ humano en las líneas celulares I3.4.2 y parental IMR32 se cuantificó usando metodología de qPCR a tiempo real TaqMan[®] usando el ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Se diseñaron cebadores y sondas TaqMan[®] específicos de gen (GSP) para el gen del MCHR₁ humano usando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y se sintetizaron usando química de fosforamidita convencional. Todas las sondas GSP de TaqMan[®] se marcaron en posición 5' con la fluoresceína indicadora (FAM) y se marcaron en posición 3' con la tetrametilrodamina de extinción (TAMARA). Se preparó el ARN celular total con reactivo de Trizol, como se describe por el fabricante, y se trató con ADNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar cualquier ADN genómico contaminante. Se usó el Qiagen QuantiTect Probe RT-PCR kit[®] (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante para detectar los transcritos de MCHR₁. El amplicón de MCHR₁ de 69 pb se amplificó usando los siguientes cebadores:

cebador directo 5'-GCAGTGGGCTGCGGCATA-3' (SEC ID N°:15)

cebador inverso 5'-AAACTGGTACAGGGTGAACCAAGTA-3' (SEC ID N°:16)

sonda TaqMan[®] 5'-[FAM]CCTGCCCAACCCAGACACTGACCTC (SEC ID N°:17) [TAMRA].

La amplificación se llevó a cabo por triplicado en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 100 ng de ARN total en una placa de PCR óptica para termociclado. Las condiciones de reacción de QRT-PCR eran las siguientes: 1 ciclo de 30 min a 50°C/15 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 94°C/1 min a 60°C. Los datos se recogieron durante la fase de extensión de la PCR y se analizaron con el paquete informático ABI-7700 SDS 1.6.3. Los datos se normalizaron para el control interno, amplificación de ARNr 28S. Usando el ARNr 28S y los datos de MCHR₁ para cada muestra, se empleó el método ΔΔCt (PE-ABI Prism 7700 Users Bulletin Number 2) para comparar los valores de expresión relativa de las células I3.4.2 con la línea celular parental IMR32. Los resultados (Figura 1b) indican que la línea celular I3.4.2 expresa el transcrito de MCHR₁ a más de 1000 veces el nivel detectado en la línea celular parental IMR32.

Ejemplo III

Ensayo de movilización de Ca⁺⁺ usando células I3.4.2

La activación del receptor de la hormona concentradora de melanina (MCHR) por la hormona concentradora de melanina (MCHR) induce la liberación de Ca⁺⁺ de los depósitos intracelulares. Esta liberación de calcio intracelular se mide usando un lector de placas de formación de imágenes fluorométricas (FLIPR[™], Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) junto con el reactivo colorante sensible a Ca⁺⁺ (Calcium Assay Reagent, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). La liberación de Ca⁺⁺ de los depósitos intracelulares provoca un aumento en la fluorescencia del colorante que es proporcional a la concentración de Ca⁺⁺. Por lo tanto, este método puede utilizarse para identificar agonistas, antagonistas y agonistas inversos de MCHR₁.

Rutinariamente, el porcentaje de inhibición de la movilización de Ca^{++} por un compuesto de ensayo se determinará a concentraciones de compuesto de ensayo finales de 0,1 μM y 2 μM , en lugar de por determinación de los valores de CI_{50} . Este procedimiento aumentará el índice y el número de compuestos que pueden explorarse por su actividad. Pueden obtenerse valores de CI_{50} para compuestos de ensayo seleccionados de alta prioridad usando esencialmente el mismo procedimiento de ensayo mediante ensayo de múltiples concentraciones de un compuesto de ensayo. Para confirmar la utilidad de la línea celular descrita en este documento para el ensayo mostrado anteriormente, las CI_{50} se determinaron para dos antagonistas de MCHR_1 , T-226296 (desarrollado por Takeda Chemical Industries, Tsukuba, Japan) y SNAP-7941 (desarrollado por Synaptic Pharmaceutical Corp., Paramus, NJ), recientemente descritos en la bibliografía (Takekawa *et al.*, *Europ. J. Pharmacol.* 438: 129-135 (2002); Borowsky *et al.*, *Nature Medicine* 8: 793-800 (2002)). En estas publicaciones, se demostró que los compuestos inhibían la unión de MCH marcada con ^{125}I a MCHR_1 y la activación de la señalización intracelular por MCH. Los resultados (véase la Figura 3) demuestran que el flujo de Ca^{++} intracelular estimulado por MCH se inhibe en la línea celular T42402I3.4.2, como se esperaba, por los antagonistas de MCHR_1 T-226296 y SNAP-7941.

En particular, el ensayo se lleva a cabo de la forma siguiente: las células se cultivan en MEM/suero fetal bovino al 10%/gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /zeocina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se siembran en placas a 100.000 células/pocillo en placas de ensayo 96 FLIPRTM recubiertas con poli-D-lisina (BD Biosciences, Bedford, MA). Después de dos días, las células se cargaron con el reactivo de ensayo de calcio durante una hora a 37°C. Se preparan los compuestos de ensayo a 60 μM en dimetilsulfóxido al 6%. La placa de células se coloca en el FLIPRTM y se suministran 50 μl /pocillo de compuesto de ensayo. La señal de calcio se sigue durante 3 minutos para ensayar para actividad agonista potencial por los compuestos de ensayo. Después, se añaden 50 μl /pocillo de MCH humana 6 μM (en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) que contiene albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA)) y la señal de calcio inducida por ligando se sigue durante 3 minutos adicionales. La actividad antagonista, como se determina por la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir el flujo de Ca^{++} inducido por MCH, se calcula como porcentaje de inhibición como se describe mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - ((\text{fTC} - \text{fB})/(\text{fMCH} - \text{fB}))] \times 100$$

fTC = fluorescencia inducida por MCH en presencia de compuesto de ensayo;

fMCH = fluorescencia inducida por MCH en ausencia de compuesto de ensayo; y

fB = fluorescencia basal.

Habitualmente la MCH (1 μM) provoca una respuesta de 5.000-6.000 unidades relativas de fluorescencia (URF) con unas medidas basales de aproximadamente 700 URF. La fluorescencia del reactivo de ensayo de calcio se mide a 488 nm, con una exposición de 0,40 s y F-stop = 2,0 y el láser ajustado a una salida de luz constante a 0,20-0,40 W.

Debe señalarse que se esperaría que tanto antagonistas como agonistas inversos produjeran resultados similares en este ensayo. Se ha descubierto que ambos tipos de agentes son útiles terapéuticamente para la inhibición de la señalización por diversos GPCR.

Ejemplo IV

Ensayo de unión a ligando

Se utilizan ampliamente diversos ensayos para medir la unión de un ligando a su receptor y su inhibición y se conocen bien por los especialistas en la técnica. Puede medirse la unión de MCH a MCHR_1 usando dichos ensayos. El ensayo también puede usarse para identificar inhibidores de la unión de MCH. Dichos inhibidores pueden ser péptidos o composiciones moleculares pequeñas. Por ejemplo, puede usarse ^{125}I -MCH (o MCH marcada con una molécula fluorescente, biotina, otro radiomarcador, etc.) como un indicador y puede presentarse MCHR_1 en la superficie de una célula intacta. Las células se retiran del sustrato de cultivo usando un tampón de disociación de células no enzimático (Invitrogen, Grand Island, NY) y se cuentan usando un hemocitómetro. La densidad celular se ajusta a $2,2 \times 10^6$ células/ml usando tampón de unión (HEPES 25 mM, pH 7,4, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 5 mM, BSA al 0,5%) y se añaden 89 μl /pocillo de suspensión celular a una placa de microtitulación de fondo en V de polipropileno de 96 pocillos. Se añaden compuestos de ensayo (1 μl) o MCH sin marcar, diluidos en DMSO al 100%, a los pocillos para una concentración final de 0 a 10 μM , seguido de 10 μl de ^{125}I -MCH (PerkinElmer, Boston, MA). La concentración final de ^{125}I -MCH en cada pocillo es de 50 pM. Después, la placa se coloca en un agitador de placas de titulación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las muestras se transfieren a una placa de filtro de fibra de vidrio tratada con PEI (polietilenimina, Sigma) al 0,1% usando un Packard Filtermate Harvester (PerkinElmer, Boston, MA). La placa de filtro se lava tres veces usando 200 μl de tampón de lavado (tampón de unión sin BSA y con NaCl 0,5 M). Se añade Microscint 20 (Perkin Elmer, Boston, MA) a todos los pocillos y la placa se sella con una película adhesiva (Topseal A, PerkinElmer, Boston, MA). Se mide los CPM de la placa usando un contador de centelleo de microplacas (Topcount, PerkinElmer, Boston, MA). La capacidad de un compuesto de ensayo para competir con la MCH marcada para unirse a MCHR_1 se calcula de la forma siguiente:

ES 2 314 447 T3

$$\% \text{ inhibición} = [1 - ((\text{CPM}_T - \text{CPM}_0)/(\text{CPM}_B - \text{CPM}_0))] \times 100$$

CPM_T = CPM en presencia de compuesto de ensayo

CPM_B = CPM en ausencia de competidor

CPM_0 = unión inespecífica, es decir, CPM en presencia de un exceso de compuesto MCH sin marcar, típicamente >1.000 veces la concentración de MCH marcada.

Pueden usarse modificaciones de este ensayo, bien conocidas por los especialistas en la técnica, para determinar las constantes de disociación para el ligando nativo o los compuestos inhibidores.

Debe señalarse que, en el ensayo anterior, la MCH marcada podría reemplazarse por una molécula pequeña o compuesto peptidomimético o péptido relacionado con MCH de secuencia modificada, convenientemente marcados. Dichos ensayos son bien conocidos y se usan ampliamente para la evaluación de la unión de ligandos a GPCR. Por ejemplo, la medición de la unión de ligandos al receptor α_1 -adrenérgico puede efectuarse usando prazosina marcada (Greengrass y Bremmer, Eur. J. Pharmacol. 55: 1323-326 (1979)), de la unión de ligandos al receptor de endotelina A puede efectuarse usando BQ-123 marcado (Ihara *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 274: 1-6(1995)) y de la unión de ligandos al receptor de neurotensina puede efectuarse usando SR-48692 marcado (Betancur *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 343: 67-77 (1998)).

Ejemplo V

Ensayo de agonista inverso

Los agonistas inversos (por ejemplo, agonistas inversos y agonistas negativos) son compuestos que reducen el nivel de actividad de un receptor por debajo del estado de actividad basal (es decir, el nivel de actividad en ausencia de agonista) para ese receptor (Strange, Trends in Pharmacol. Sci. 23: 89-95 (2002)). Como se ha mencionado en el Ejemplo III anterior, los agonistas inversos y antagonistas presentarán actividades similares en el ensayo de movilización de Ca^{++} . La discriminación entre estas clases de compuestos puede suponer un desafío, particularmente cuando la actividad basal del receptor diana es baja. Sin embargo, la diferenciación de agonistas inversos de antagonistas puede ser útil para comprender las propiedades *in vivo* de compuestos identificados como inhibidores de la señalización de MCHR_1 . Los agonistas inversos presentan una unión preferencial al estado inactivo del receptor y, por lo tanto, suprimen la unión independiente de agonista de GTP al receptor. La unión de GTP al complejo receptor-proteína G puede medirse usando un análogo de GTP no hidrolizable, tal como [^{35}S]GTP- γS o GTP marcado con Eu. En resumen, dicho ensayo puede efectuarse de la forma siguiente. Se aíslan membranas que contienen MCHR_1 de células I3.4.2 usando un método de preparación de membranas convencional (Bouaboula *et al.*, J. Biol. Chem., 272: 22330-22339(1997)). Se incuban membranas de células I3.4.2 (1-20 μg) con GDP 10 μM , GTP marcado (0,01-0,1 μM) y compuesto de ensayo o MCH en un tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl_2 3 mM, ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 0,2 mM, NaCl 100 mM y albúmina de suero bovino al 0,1 %) para un intervalo apropiado. La mezcla de reacción se filtra después a través de una membrana de fibra de vidrio, se lava para eliminar el GTP marcado no unido y se detecta la unión de GTP marcado usando un instrumento apropiado, es decir, un contador de centelleo para [^{35}S]GTP- γS o un fluorómetro de resolución temporal para Eu-GTP. Los datos resultantes se describen generalmente con respecto a la actividad basal:

$$\% \text{ de activación} = [((S_{ic} - \text{NSB}) \times 100)] \div (S_b - \text{NSB}) - 100$$

S_{ic} = señal en presencia de compuesto de ensayo

S_b = señal basal en ausencia de MCH

NSB = unión inespecífica; señal en presencia de un exceso de GTP- γS sin marcar.

Usando este método, un agonista inverso produce una señal menor que la señal basal que da como resultado una "activación negativa", es decir, % de activación menor de cero. Se esperaría que un antagonista clásico tuviera un escaso o ningún efecto sobre la actividad basal medida en este ensayo. También pueden usarse otros ensayos usando diversos métodos (de Lig *et al.* Br. J. Pharmacol., 130: 1-12 (2000)) descritos en la bibliografía con las células I3.4.2 (o fracciones de las mismas) para caracterizar agonistas inversos potenciales.

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular aislada que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201.

2. Una composición que comprende células de dicha línea celular de la reivindicación 1.

3. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, que mantiene la sensibilidad a MCH durante más de diez pases de cultivo.

4. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha línea celular presenta una CE_{50} de aproximadamente 90 nM para la movilización de calcio⁺⁺ mediada por MCH.

5. Una composición que comprende células de dicha línea celular de la reivindicación 4.

6. Un método de producción de receptor de MCH que comprende las etapas de cultivar células de dicha línea celular de la reivindicación 1 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la producción de dicho receptor de MCH.

7. Un método de identificación de un antagonista o un agonista inverso para el receptor de MCH (MCHR), que comprende las etapas de:

a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, con un compuesto de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicho compuesto de ensayo se una al MCHR producido por dichas células de dicha línea celular;

b) añadir MCH a dichas células puestas en contacto de la etapa (a);

c) medir el flujo de entrada de calcio intracelular en dichas células de la etapa (a) en comparación con células de dicha línea celular que no se han expuesto a dicho compuesto de ensayo, indicando una disminución en dicho flujo de entrada de calcio intracelular en dichas células de la etapa (a) en comparación con dichas células que no se han expuesto a dicho compuesto de ensayo que dicho compuesto de ensayo es un antagonista para dicho receptor de MCH.

8. Un método de identificación de un agonista para el receptor de MCH, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, con un compuesto de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicho compuesto de ensayo se una al MCHR producido por dichas células de dicha línea celular;

b) medir el flujo de entrada de calcio intracelular en dichas células de la etapa (a) en comparación con células de dicha línea celular que no se han expuesto a dicho compuesto de ensayo, indicando un aumento en dicho flujo de entrada de calcio intracelular en dichas células de la etapa (a) en comparación con dichas células que no se han expuesto a dicho compuesto de ensayo que dicho compuesto de ensayo es un agonista para dicho receptor de MCH.

9. Un método de determinación de la afinidad de unión de MCH a MCHR, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, o membranas de la misma con un conjugado, en el que dicho conjugado comprende MCH unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el MCHR producido por dichas células de dicha línea celular se una a dicha MCH de dicho conjugado;

b) añadir MCH sin marcar a dicho MCHR unido durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicha MCH sin marcar desplace a dicho conjugado; y

c) detectar la intensidad de una señal generada por dicho compuesto generador de señal, en la que la intensidad de dicha señal es proporcional al desplazamiento de dicho conjugado por dicha MCH sin marcar e indica la afinidad de unión de dicha MCH a dicho MCHR.

10. Un método de identificación de una composición que inhibe la unión de MCH a MCHR, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, o membranas de la misma con un compuesto de ensayo sospechoso de inhibir la unión de MCH a MCHR durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicho compuesto de ensayo se una al MCHR producido por células de dicha línea celular;

b) añadir un conjugado para dichas células puestas en contacto de la etapa (a), en el que dicho conjugado comprende MCH unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal medible; y

5 c) medir la inhibición de la unión de MCH a MCHR por dicho compuesto de ensayo mediante la cuantificación de dicha señal medible generada y comparación de dicha señal medible generada con una señal de control producida en ausencia de dicho compuesto de ensayo, indicando dicha señal de control el porcentaje de inhibición cero de la unión de MCH a MCHR, indicando una señal menor obtenida con el uso de dicho compuesto de ensayo en comparación con dicha señal de control que dicho compuesto inhibe parcialmente o completamente la unión de MCH a MCHR.

11. Un método de diferenciación entre un antagonista y un agonista inverso de MCHR, que comprende las etapas de:

10 a) poner en contacto células de la línea celular T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201, o membranas de la misma con un compuesto de ensayo sospechoso de inhibir la activación de MCHR durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicho compuesto de ensayo se una al MCHR producido por células de dicha línea celular;

15 b) añadir un conjugado a dichas células puestas en contacto de la etapa (a), en el que dicho conjugado comprende MCH unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal medible; y

20 c) medir la inhibición de un nivel de actividad basal de MCHR por dicho compuesto de ensayo mediante la cuantificación de dicha señal medible generada y comparación de dicha señal medible generada con una señal de control producida en ausencia de dicho compuesto de ensayo, indicando dicha señal de control la actividad basal MCHR, indicando una señal menor obtenida con el uso de dicho compuesto de ensayo en comparación con dicha señal de control que dicho compuesto es un agonista inverso de MCHR e indicando una señal equivalente obtenida con el uso de dicho compuesto de ensayo en comparación con dicha señal de control que dicho compuesto es un antagonista MCHR.

25 12. Un método para producir una línea celular que produzca MCHR que comprende las etapas de:

a) poner en contacto células IMR32 con ADN que codifica $G\alpha_{16}$ y un marcador de resistencia a antibióticos;

30 b) añadir un antibiótico para dicho marcador de resistencia a antibióticos para dichas células puestas en contacto;

c) aislar células resistentes al antibiótico de la etapa (b) y propagar dichas células;

35 d) añadir a dichas células propagadas dicho antibiótico a una concentración superior a la usada en la etapa (b); y

e) aislar las células resultantes de la etapa (d) y propagar dichas células para producir una línea celular que produzca MCHR.

40 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha línea celular es T42402I3.4.2, que tiene la denominación de depósito de la A.T.C.C. PTA-5201.

45

50

55

60

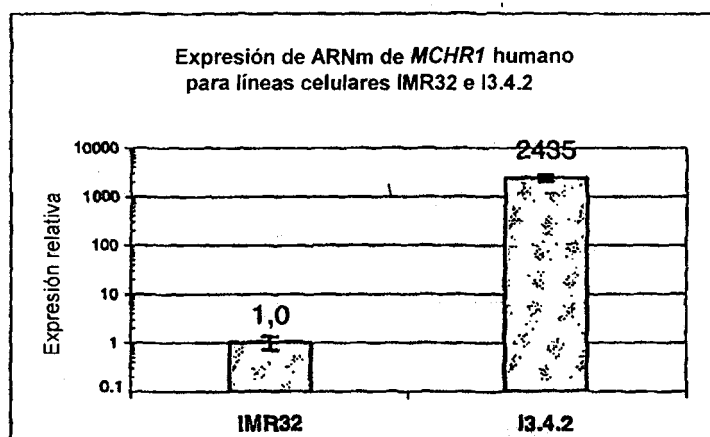
65

FIGURA 1

a. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE MCHR₁ DEDUCIDA A PARTIR DEL ADN GENÓMICO DE T42402I3.4.2

MDLEASLLPTGPNASNTSDGPDNLTSAAGSPPRGTSGISYINIMPSVFGTICLLGII
GNSTVIFA VVKKSKLHWCNNVPDIFINLSVVDLLFLLGMPFMIHQLMGNGV
WHFGETMCTLITAMDANSQFTSTYILTAMADRILATVHPISSTKFRKPSVAT
LVICLLWALSFISITPVWLYARLIPFGGAVGCGIRLPNPDTDLYWFTLYQFFL
AFALPFVVITAAYVRILQRMTSSVAPASQRSIRLRTKRVRTAJAICLVFFVCW
APYYVLQLTQLSISRPTLTFFVYLYNAAISLGYANSCLNPFVYTVLCETPRKRLV
LSVKPAAQGQLRAVSNAQTADEERTESKGT*

b. EXPRESIÓN DE ARNm DE MCHR₁ EN CÉLULAS IMR32 PARENTALES Y CÉLULAS T42402I3.4.2



Muestra	Ct*	Desviación típica
IMR32-Ga16	16,12	0,11
IMR32-p57	27,88	0,08

*Ct: Ciclo umbral; normalizado para ARN 28s

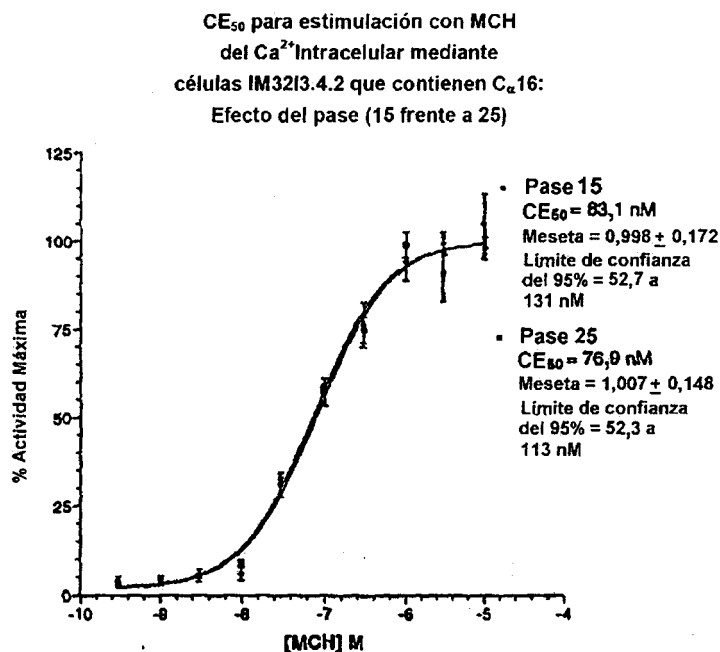
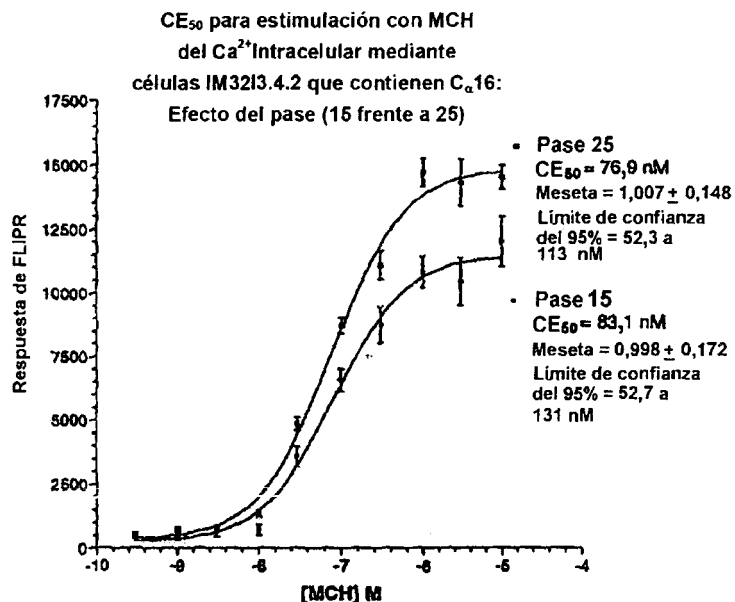
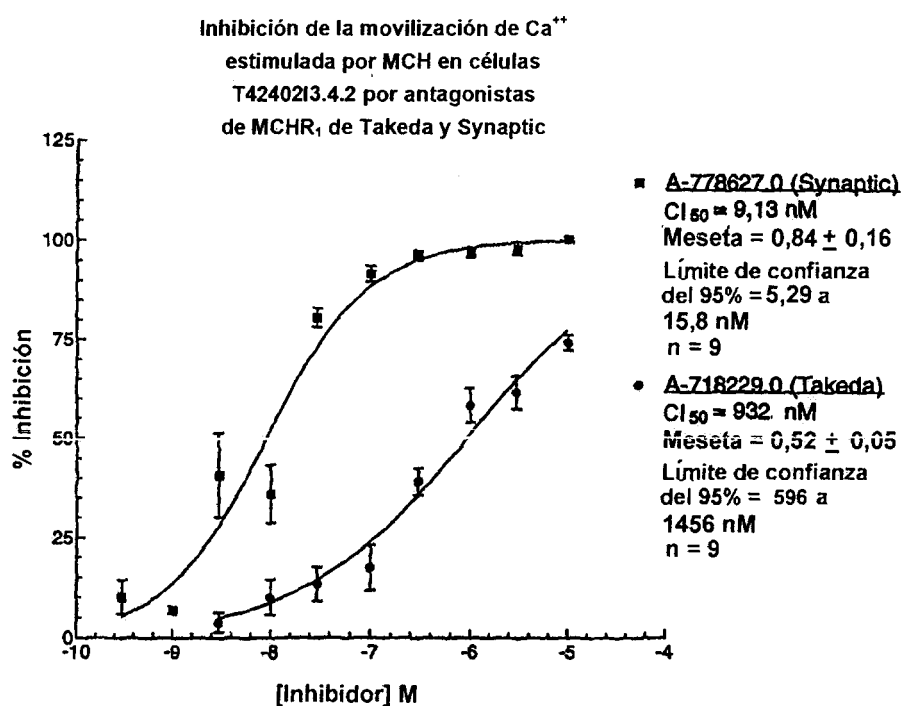
FIGURA 2**RESPUESTA DE FLUJO DE Ca^{++} DE CÉLULAS I3.4.2 A MCH**

FIGURA 3

INHIBICIÓN DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR MCHR₁ EN CÉLULAS I3.4.2 POR ANTAGONISTAS DE MCHR₁ CONOCIDOS



ES 2 314 447 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Abbott Laboratories Fry, Dennis G. Collins, Christine A. Dayton, Brian D.
10	<120> Línea celular y usos de la misma <130> 7083WOO1
15	<140> No recibida todavía <141> 15-06-2004
20	<150> 10/463.123 <151> 17-06-2003 <160> 17
25	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0 <210> 1 <211> 353 <212> PRT
30	<213> <i>Homo sapiens</i>
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	

ES 2 314 447 T3

<400> 1

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

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebadores de PCR

<400> 2

ctcagctcgg ttgtgggagc 20

ES 2 314 447 T3

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR
 10
 <400> 3
 aggcgaccgg cactggctgg 20

 15 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador de PCR

 25 <400> 4
 atggacctgg aagcctcgct gctgccc 27

 30 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador de PCR

 40 <400> 5
 ggtggcggtgt tgggtgccc 20

 <210> 6
 45 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 6
 55 **gacttggagg tgtgcag** 17

 <210> 7
 <211> 27
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Cebador de PCR

ES 2 314 447 T3

<400> 7

tcaggcgct ttgctttctg toctctc 27

5 <210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Cebador de PCR

15 <400> 8

tttctgtcct ctctctgtca 20

<210> 9

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 9

30

ctgttagcaca tagtaggggtg 20

<210> 10

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 10

45

tatgcgcag cccactgcac 20

<210> 11

<211> 20

50 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Cebador de PCR

<400> 11

60

aagatgaccg tggagttccc 20

<210> 12

<211> 20

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 314 447 T3

<220>
 <223> Cebador de PCR
 5 <400> 12
 gctgccgcag cctgcgtggg 20
 <210> 13
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 13
 20 <210> 14
 accagctcat gggcaatggg 20
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 14
 35 <210> 15
 gcatgacgtc ctacgtggcc 20
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Cebador de PCR
 <400> 15
 gcagtgggct gcggcata 18
 50 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Cebador de PCR
 <400> 16
 aaactgggtac aggggtgaacc agta 24
 65 <210> 17
 <211> 25

ES 2 314 447 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 17

10 **cctgccaac ccagacactg acctc** 25

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65