



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 318**

51 Int. Cl.:

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| <b>C07K 14/47</b> (2006.01) | <b>C07K 14/705</b> (2006.01) |
| <b>C07K 14/72</b> (2006.01) | <b>C07K 16/18</b> (2006.01)  |
| <b>C07K 16/22</b> (2006.01) | <b>C07K 16/26</b> (2006.01)  |
| <b>G01N 33/53</b> (2006.01) | <b>G01N 33/567</b> (2006.01) |
| <b>C12N 5/10</b> (2006.01)  | <b>C12N 15/12</b> (2006.01)  |
| <b>C12N 15/63</b> (2006.01) | <b>C12N 15/64</b> (2006.01)  |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01908798 .0**

86 Fecha de presentación : **01.02.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1272514**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **ADN codificante para el receptor humano de la vainilloide VR3.**

30 Prioridad: **08.02.2000 US 500123**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2008**

73 Titular/es: **Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.**  
**U.S. Route nº 202**  
**Raritan, New Jersey 08869-0606, US**

72 Inventor/es: **Dubin, Adrienne, Elizabeth;**  
**Huvar, Arne;**  
**Glass, Charles, A. y**  
**Erlander, Mark, G.**

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

ADN codificante para el receptor humano de la vainilloide VR3.

## 5 Antecedentes de la invención

Los estímulos químicos, térmicos y mecánicos nocivos estimulan las terminaciones nerviosas de las neuronas sensoriales de diámetro pequeño (nociceptores) en los ganglios sensoriales (p. ej., raíz dorsal, ganglios nodosos y del trigémino) e inician señales que son percibidas como dolor. Estas neuronas son cruciales para la detección de los estímulos perjudiciales o potencialmente perjudiciales (calor) y la lesión tisular ( $H^+$  (acidosis tisular local), y/o tensión) que surgen de cambios en el espacio extracelular durante las condiciones inflamatorias o isquémicas (Wall y Melzack, 1994). El vainilloide capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida), el principal ingrediente picante en los pimientos capsicum "picantes", es un activador muy selectivo de los aferentes nociceptivos con una capa fina de mielina o sin ella (Szolcsanyi, 1993; Szolcsanyi, 1996). Los estudios electrofísicos han demostrado que los vainilloides excitan las neuronas sensoriales pequeñas activando un canal de membrana plasmática que no es selectivamente permeable a los cationes (Bevan y Szolcsanyi, 1990; Oh *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 1988). El ultrapotente diterpeno tricíclico resiniferatoxina de las plantas de *Euphorbia* (RTX; (Szolcsanyi *et al.*, 1991)) se une con una afinidad nanomolar en el sitio de unión de la capsaicina y se ha revelado una distribución muy localizada de los receptores de capsaicina para las neuronas sensoriales primarias somáticas y viscerales de rata (Szallasi, 1995).

Se piensa que el receptor vainilloide VR1 (Caterina *et al.*, 1997) es un receptor sensible al calor cuyo umbral disminuye en presencia de protones o capsaicina (Tominaga *et al.*, 1998). La capsaicina y los protones interaccionan en sitios de reconocimiento de membrana específicos (receptores vainilloides) expresados casi exclusivamente por las neuronas sensoriales primarias implicadas en la nocicepción y la inflamación neurogénica (Bevan y Szolcsanyi, 1990). El receptor vainilloide ("capsaicina") VR1 es activado por la capsaicina y RTX, y la activación de VR1 es bloqueada por los antagonistas capsazepina (CPZ; (Bevan *et al.*, 1992)) y rojo de rutenio (RR; (Caterina *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1988)).

El análisis del carácter hidropático de la secuencia de aminoácidos de VR1 revela 6 regiones potenciales que abarcan la membrana (S1-S6) y una supuesta región pobre en bucles entre S5 y S6. Un gran dominio intracelular contiene 3 dominios repetidos de anquirina (Caterina *et al.*, 1997). Este canal tiene similitudes estructurales significativas con la supuesta familia del canal del calcio TRP "operados por reservorios". VR1 es un canal de cationes no selectivo dependiente del ligando que muestra una rectificación hacia afuera pronunciada (Caterina *et al.*, 1997). Importante-mente, VR1 es muy permeable a  $Ca^{2+}$ , un ión conocido por ser muy importante en la regulación de la función celular ((Blackstone y Sheng, 1999; Gupta y Pushkala, 1999; van Haasteren *et al.*, 1999)).

La búsqueda de bases de datos genómicas ha revelado VRL-1, una subunidad relacionada estructuralmente con VR1. VLR-1 de rata y humana (AF129113 y AF129112, respectivamente) son idénticas en un -49% y similares en un 66% a VR1 de rata (AF029310)) (Caterina *et al.*, 1999). La proteína VRL humana (AF103906) clonada por Wood y col. (no publicada) es idéntica en un 99% a VRL-1 (AF129112). Recientemente, se publicó una solicitud de patente de Partiseti y Renard que describía hVRCC (canal catiónico de tipo receptor vainilloide humano) que es casi idéntico a AF129112 (la única diferencia es la delección de Q418). Los autores de la presente invención se referirán a estas secuencias como VR2. En conjunto, la estructura pronosticada de VR1 y VR2 es característica de una familia de canales iónicos definida por los canales de potencial receptor transitorio (TRP) clonada originalmente de *Drosophila melanogaster*, un canal permeable al Ca que juega un papel en la fototransducción (Lu y Wong, 1987; Minke y Selinger, 1996). Este receptor también parece estar implicado en la sensación de calor que produce dolor (Caterina *et al.*, 1999). La expresión de VR2 en oocitos y células HEK confería normalmente una sensibilidad de las células a las temperaturas nocivas ( $>53^{\circ}C$ ), que no era sensibles a CPZ pero era bloqueada casi completamente con rojo de rutenio 10  $\mu M$ . La activación de VR2 induce una corriente catiónica no selectiva con una elevada permeabilidad al  $Ca^{2+}$ . Interesantemente, el umbral para la sensibilidad al calor disminuía con la aplicación repetida de estímulos nocivos, pero no de temperaturas por debajo del umbral (Caterina *et al.*, 1999).

Se piensa que el canal SIC de rata (canal inhibido por el estiramiento; Genbank AB015231), codificado por 529 aminoácidos, forma un canal iónico inhibido por el estiramiento (Suzuki *et al.*, 1999). Los primeros 379 aminoácidos son homólogos a VR1 de rata. SIC carece del gran dominio citoplásmico N-terminal de la familia VR pero contiene una secuencia homóloga al exón A antes del supuesto TM1. Los últimos 163 aminoácidos, comenzando en el centro del supuesto TM6 de SIC de rata son similares a la correspondiente secuencia de aminoácidos de VR3 A+B- humano de la presente invención.

La presente invención describe la clonación y la función de un nuevo miembro de la familia de receptores vainilloides, VR3. Este gen parece estar empalmado alternativamente para crear al menos 3 isoformas.

## Compendio de la invención

Las moléculas de ADN que codifican las 3 isoformas del receptor vainilloide humano 3 (hVR3) han sido clonadas y caracterizadas. Las propiedades biológicas y estructurales de estas proteínas están descritas, como lo están la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos. La proteína recombinante es útil para identificar los moduladores del receptor VR3. Los moduladores identificados en el análisis descrito en la presente memoria son útiles como agentes

terapéuticos, que son candidatos para el tratamiento de las condiciones inflamatorias y para su uso como analgésicos para el dolor intratable asociado con la neuralgia postherpética, la neuropatía diabética, el dolor post-mastectomía, los síndromes de dolor regional complejo, la artritis (p. ej., reumatoide y osteoartritis), así como las úlceras, las enfermedades neurodegenerativas, el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el síndrome del intestino irritable, y la psoriasis. Los usos incluyen el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades del tracto intestinal, proliferación anormal y cáncer especialmente en el sistema digestivo, la próstata y las gónadas femeninas, úlceras, enfermedades del hígado, enfermedades del riñón, control de vísceras innervadas por los ganglios de la raíz dorsal, o para diagnosticar o tratar cualquier trastorno relacionado con la expresión anormal de estos polipéptidos hVR3, entre otros. En otro aspecto, la invención hace referencia a los métodos para identificar los agonistas y antagonistas utilizando los materiales proporcionados por la invención, y tratar las afecciones asociadas con el desequilibrio de hVR3. Las moléculas de ADN recombinante, y las porciones de las mismas, son útiles para aislar homólogos de las moléculas de ADN, identificando y aislando los homólogos de las moléculas de ADN, identificando y aislando los equivalentes genómicos de las moléculas de ADN, e identificando, detectando o aislando las formas mutantes de las moléculas de ADN.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - SEQ ID NO:5. Secuencia de nucleótidos VR3A+B- humano de la región codificadora (2616 pb).

Figura 2 - SEQ ID NO:6. Se muestra la secuencia de nucleótidos de VR3A+B- humano incluyendo la región no traducida de 337 pb 5' (UT) y de 547 pb 3'UT (3500 pb).

Figura 3 - SEQ ID NO:7. Secuencia codificadora para VR3A+B- humano (871 aminoácidos)

Figura 4 - SEQ ID NO:8. Secuencia de nucleótidos de VR3A-B- humano de la región codificadora (2436 pb).

Figura 5 - SEQ ID NO:9. Secuencia codificadora para VR3A-B- humano (811 aminoácidos)

Figura 6 - SEQ ID NO: 10. Secuencia de nucleótidos de VR3A+B+ humano de la región codificadora (2229 pb).

Figura 7 - SEQ ID NO: 11. Se muestra la secuencia de nucleótidos de VR3A+B+ humano incluyendo los 836 pb 5' UT y los 994 pb 3'UT (4059 pb).

Figura 8 - SEQ ID NO: 12. Secuencia codificadora para VR3A+B+ humano (742 aminoácidos)

Figura 9 - Se muestra la expresión funcional de las isoformas de VR3 en oocitos de *Xenopus*: la viabilidad de oocitos mantenida en ND-96 con 2  $\text{Ca}^{2+}$  disminuía significativamente 4-6 días después de la inyección con 3,25 ng de ARNc de VR3 A+B- y VR3 A+B+ (5 ng) pero no de VR3 A-B- (1,5 ng). Los datos para los oocitos a los que se inyectó VR3 A+B- y agua se obtuvieron de 5 experimentos diferentes. Los oocitos muertos se determinaron visualmente. Los datos se analizaron utilizando el análisis de la Chi cuadrado.

Figura 10 - Función en oocitos: las isoformas de VR3 están activadas por el calor. A. Se muestra la corriente del pico principal obtenida mediante una transición de calor de 25°C a 46°C y mantenida a 46°C durante al menos 15 segundos. La corriente es el incremento sobre la corriente inicial a +80 mV. Las transiciones de voltaje se aplicaron de -120 a +80 mV a lo largo de 400 mseg cada 2 seg. Los oocitos se inyectaron con 3,25, 1,25 y 5 ng de ARNc de VR3 A+B-, A-B-, y A+B+, respectivamente, y se registraron hasta 6 días más tarde. Barra sólida: controles a los que se inyectó agua (n=8); barra transparente: isoforma VR3 A+B- (n= 11); barra sombreada: isoforma VR3 A-B- (n=8); barra punteada: isoforma VR3 A+B+ (n=5). Todas las isoformas muestran un incremento significativo sobre los controles con agua ( $p = 0,001$ , 0,03 y 0,007, respectivamente: ensayo de la t de Student). La respuesta inducida por el calor es aproximadamente 2 veces más grande en la isoforma A+B- en comparación con las otras dos isoformas pero las diferencias no son significativas ( $p = 0,051$  y  $p = 0,16$ , para A+B- en comparación con A-B- y A+B+, respectivamente). Los datos se obtuvieron de 2 grupos de oocitos inyectados. Los datos mostrados son la media y el error típico de la media. B. Se registraron las corrientes inducidas por la transición de voltaje durante la aplicación de calor creciente a oocitos inyectados con agua (arriba), VR3 A+B- (segundo por arriba), VR3 A-B- (3° por abajo), y VR3A+B+ (abajo). Los oocitos fueron perfundidos constantemente con  $\text{Ca}^{2+}$  ND-96 y la solución se calentó por medio de un dispositivo calentador en línea (TC-324B junto con el calentador en línea SH- 27A: Warner Instrument Corp.). Se presentan las corrientes inducidas por la transición (en  $\mu\text{A}$ , como se indica en el eje de la y) obtenidas a temperaturas de 37°C a 46°C; solamente se marcan con la temperatura correspondiente los vestigios de corriente a las temperaturas más elevadas.

Figura 11 - Función en oocitos: VR3A+B- confiere sensibilidad al rojo de rutenio 10  $\mu\text{M}$  para la corriente activada por perfusión ( $I_{\text{perfusión}}$ ) observada en oocitos que expresan VR1 inducidos por perfusión celular mediante soluciones salinas extracelulares. La activación de  $I_{\text{perfusión}}$  por una perfusión incrementada fue bloqueada por rojo de rutenio solamente en oocitos que expresaban VR1 a los que se había inyectado ARNc de VR3 A+B-, y no en oocitos que expresaban solamente VR1. (a). Se sensibilizó un oocito al que se había inyectado ARNc de VR [4 ng] con transiciones de voltaje entre -120 y +80 mV a lo largo de 400 mseg a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV. Las corrientes inducidas por la transición aumentaron después del comienzo de la perfusión del oocito a una velocidad de 10 ml/min. La preincubación con rojo de rutenio 10  $\mu\text{M}$  durante 0,5 minutos bloqueó la corriente. El bloqueo

era parcialmente reversible (no mostrado). (b). Un oocito al que se había inyectado ARNc de VR1 [4 ng] junto con VR3 A+B- [1,3 ng] se sensibilizó con transiciones de voltaje entre -120 y +80 mV a lo largo de 400 mseg desde un potencial de mantenimiento de -70 mV. Las corrientes inducidas por la transición aumentaron después del comienzo de la perfusión del oocito a una velocidad de 10 ml/min. La preincubación con rojo de rutenio 10  $\mu$ M durante 0,5 min tuvo un efecto pequeño sobre  $I_{\text{perfusión}}$ . La  $I_{\text{perfusión}}$  tenía magnitudes similares en ambos grupos de oocitos. Vrev para la corriente inhibida por RR fue de aproximadamente -13 mV (flecha).

Figura 12 - Función en oocitos: VR3A+B- junto con VR1. La magnitud y la cinética de decaimiento de la respuesta a la capsaicina 1  $\mu$ M disminuyó cuando se expresaba simultáneamente ARNc de VR1 con ARNc de VR3 A+B- a razones iguales [2,9 ng cada uno].

Figura 13 - El análisis de la distribución de la matriz de ADN indica que los ARNm de hVR3 son expresados en una variedad de tejidos, y existe cierto solapamiento en una variedad de tejidos, y existe cierto solapamiento de la expresión con VR1 a nivel del tejido completo. La secuencia de ADN utilizada en la matriz de ADN no está presente en A+B+, solamente en las isoformas A+B- y A-B-. Obsérvese que la especie de ADNc fue clonada de las glándulas pituitaria y prostática.

### Descripción detallada

La presente invención describe 3 isoformas de un receptor vainilloide humano, denominado VR3: VR3A+B-, VR3A-B-, y VR3A+B+. Las secuencias de nucleótidos de los ADNc del receptor VR3 humano revelaron un único marco de lectura abierto grande de aproximadamente 2616 (Figura 1), 2436 (Figura 4) y 2229 (Figura 6) pares de bases que codifican 871 (Figura 3), 811 (Figura 5), y 742 (Figura 8) aminoácidos para VR3 A+B-, A-B- y A+B+ humano, respectivamente. El ADNc para VR3 A+B- tiene prolongaciones 5' y 3'-no traducidas de aproximadamente 337 y aproximadamente 547 nucleótidos, como se muestra en la Figura 2, donde la 5'UTR es 1-337, la región codificadora es 338-2953, y la 3'UTR es 2954-3500. El ADNc para VR3 A+B+ tiene prolongaciones 5' y 3'-no traducidas de aproximadamente 836 y aproximadamente 994 nucleótidos como se muestra en la Figura 7, donde la 5'UTR es 1-836, la región codificadora es 837-3065, y la 3'UTR es 3066-4059. La primera metionina en marco fue diseñada como el codón de iniciación para un marco de lectura abierto que pronostica las proteínas receptoras VR3 humanas con una masa molecular estimada ( $M_r$ ) de aproximadamente 98.242 Da, 91.294 Da y 83.310 Da para las isoformas A+B-, A-B- y A+B+, respectivamente. La isoforma A+B- codifica una proteína de 871 aminoácidos. El VR3 A-B- contiene una delección de 60 aminoácidos desde el aminoácido 382 al 441 de VR3A+B-. VR3 A+B+ es idéntico a A+B- hasta el aminoácido 736 después de lo cual hay 6 aminoácidos divergentes y un codón de parada. La isoforma A+B+ de VR3 se extiende 20 aminoácidos después del supuesto TM6.

Las proteínas receptoras VR3 humanas pronosticadas fueron alineadas con las bases de datos de nucleótidos y proteínas y están relacionadas con la familia de los receptores vainilloides (VR1 y VR2). Existen numerosos motivos conservados encontrados en esta familia de receptores incluyendo un gran supuesto segmento hidrófilo N-terminal (aproximadamente 467 aminoácidos), tres supuestos dominios de repetición de anquirina en la región del extremo N, 6 regiones transmembrana pronosticadas y una región del poro. VR3 A+B- es idéntico en un 43% a VR1 humano, idéntico en un 39% tanto a VRL-1 humano (AF129112) como VRL humano (AF103906). De este modo el receptor VR3 descrito en la presente memoria es claramente un gen novedoso de la familia de receptores vainilloides.

Las formas VR3A+B- y VR3A-B- humanas son similares al canal inhibido por el estiramiento SIC de rata [Acceso Genbank AB015231] desde el aminoácido 694 al extremo. Se piensa que el SIC de rata, codificado por 529 aminoácidos, forma un canal iónico inhibido por el estiramiento. Carece del gran dominio citoplásmico N-terminal de la familia VR pero contiene una secuencia homóloga al exón A antes del supuesto TM1.

La secuencia genómica completa de las regiones codificadoras de VR3 descrita en la presente memoria parece encontrarse en un envío de secuencias "submission" de la secuencia de 380512 pares de bases de Genbank (clon de *homo sapiens* RPC11-7G5 (AC007834), envío de secuencias directo por Worley, K.C.). Esta entrada de Genbank enumera muchos fragmentos de la secuencia de ADN y una secuencia contigua propuesta, pero carece de cualquier análisis de la secuencia de ácido nucleico y no logra caracterizar los rasgos de las secuencias de ácido nucleico de VR3, ni describe la presencia del gen VR3.

### Aislamiento del ácido nucleico del receptor VR3 humano

La presente invención hace referencia al ADN que codifica el receptor VR3 humano que fue aislado de células productoras del receptor VR3 humano. El receptor VR3 humano, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una proteína que puede funcionar específicamente como un receptor vainilloide humano.

La secuencia de aminoácidos completa del receptor VR3 humano no se había mostrado previamente, ni era la secuencia de nucleótidos completa que codificaba el receptor VR3 humano conocido. Se pronostica que una amplia variedad de células y tipos celulares contendrán el receptor VR3 humano descrito.

Otras células y líneas celulares también pueden ser adecuadas para su uso para aislar el ADNc del receptor VR3 humano. La selección de las células adecuadas se puede realizar escrutando la actividad del receptor VR3 humano en extractos celulares o en análisis de células completas, descritos en la presente memoria. Las células que poseen

actividad de VR3 humano en cualquiera de estos análisis pueden ser adecuadas para el aislamiento del ADN o el ARNm del receptor VR3 humano.

Se puede utilizar cualquier variedad de procedimientos conocidos en la técnica para clonar molecularmente el ADN del receptor VR3 humano. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, la expresión funcional directa de los genes del receptor VR3 humano después de la construcción de una genoteca de ADNc que contiene el receptor VR3 humano en un sistema vector de expresión apropiado. Otro método consiste en escrutar la genoteca de ADNc que contiene el receptor VR3 humano construida en un vector lanzadera de bacteriófago o plásmido con una sonda oligonucleotídica marcada diseñada a partir de la secuencia de aminoácidos de las subunidades del receptor VR3 humano. Un método adicional consiste en el escrutinio de una genoteca de ADNc que contiene el receptor VR3 humano construido en un vector lanzadera de bacteriófago o plásmido con un ADNc parcial que codifica la proteína receptora VR3 humana. Este ADNc parcial se obtiene mediante amplificación por PCR específica de fragmentos de ADN del receptor VR3 humano a través del diseño de cebadores oligonucleotídicos degenerados a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína receptora VR3 humana purificada.

Otro método consiste en aislar el ARN a partir de células productoras del receptor VR3 humano y traducir el ARN a proteína por medio de un sistema de traducción *in vitro* o *in vivo*. La traducción del ARN a un péptido o proteína dará como resultado la producción de al menos una porción de la proteína receptora VR3 humana que puede ser identificada, por ejemplo, mediante la reactividad inmunológica con un anticuerpo anti-receptor VR3 humano o mediante la actividad biológica de la proteína receptora VR3 humana. En este método, se pueden analizar reservas de ARN aislado de células productoras del receptor VR3 humano en cuanto a la presencia de un ARN que codifica al menos una porción de la proteína receptora VR3 humana. Adicionalmente el fraccionamiento de la reserva de ARN se puede realizar para purificar el ARN del receptor VR3 humano a partir del ARN del receptor VR3 no humano. La proteína o péptido producido mediante este método se puede analizar para proporcionar secuencias de aminoácidos que a su vez se utilizan para proporcionar cebadores para la producción de ADNc del receptor VR3 humano, o se puede analizar el ARN utilizado para la traducción para proporcionar secuencias de nucleótidos que codifican el receptor VR3 humano y producir sondas para esta producción de ADNc del receptor VR3 humano. Este método es conocido en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que pueden resultar útiles otros tipos de genotecas, así como genotecas construidas a partir de otras células o tipos celulares, para aislar el ADN del receptor VR3 humano. Otros tipos de genotecas incluyen, pero no están limitados a, genotecas de ADNc derivadas de otras células, de organismos distintos del receptor VR3 humano, y genotecas de ADN genómico que incluyen YAC (cromosomas artificiales de levadura) y genotecas de cósmidos.

Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que se pueden preparar genotecas de ADNc adecuadas a partir de células o líneas celulares que tienen actividad de receptor VR3 humano. La selección de células o líneas celulares para su uso en la preparación de una genoteca de ADNc para aislar el ADNc del receptor VR3 humano se puede realizar midiendo primero la actividad del receptor VR3 humano asociada a la célula utilizando la medida de la actividad biológica asociada al receptor VR3 humano o un análisis de unión al ligando.

La preparación de genotecas de ADNc se puede realizar mediante mecanismos normalizados bien conocidos en la técnica. Se pueden encontrar mecanismos de construcción de genotecas de ADNc bien conocidos por ejemplo, en Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Asimismo es fácilmente evidente para los expertos en la técnica que el ADN que codifica el receptor VR3 humano también puede ser aislado a partir de una genoteca adecuada de ADN genómico. La construcción de genotecas de ADN genómico se puede realizar mediante mecanismos normalizados bien conocidos en la técnica. Los mecanismos de construcción de genotecas de ADN genómico bien conocidos se pueden encontrar en Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Con el fin de clonar el gen del receptor VR3 humano por los métodos anteriores, puede ser necesaria la secuencia de aminoácidos del receptor VR3 humano. Para completar esto, se puede purificar la proteína receptora VR3 humana y determinar la secuencia de aminoácidos parcial por medio de secuenciadores automatizados. No es necesario determinar la secuencia de aminoácidos completa, si no que se determina la secuencia lineal de dos regiones de 6 a 8 aminoácidos de la proteína para la producción de cebadores para la amplificación mediante PCR de un fragmento de ADN del receptor VR3 humano parcial.

Una vez que se han identificado las secuencias de aminoácidos adecuadas, se sintetizan las secuencias de ADN capaces de codificarlas. Debido a que el código genético es degenerado, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto, y por lo tanto, la secuencia de aminoácidos puede ser codificada por cualquiera de una serie de oligonucleótidos de ADN similares. Solamente un miembro de la serie será idéntico a la secuencia del receptor VR3 humano pero será capaz de hibridar con el ADN del receptor VR3 humano incluso en presencia de oligonucleótidos de ADN con emparejamientos erróneos. Los oligonucleótidos de ADN emparejados erróneamente todavía hibridarán suficientemente con el ADN del receptor VR3 humano para permitir la identificación y el aislamiento del ADN que

codifica el receptor VR3 humano. El ADN aislado mediante estos métodos se puede utilizar para escrutar genotecas de ADN de una variedad de tipos celulares, de fuentes invertebradas y vertebradas, y para aislar genes homólogos.

El receptor VR3 humano biológicamente activo purificado puede tener varias formas físicas diferentes. El receptor VR3 humano puede existir en forma de un polipéptido naciente o no procesado completo, o en forma de un polipéptido parcialmente procesado o combinaciones de polipéptidos procesados. El polipéptido del receptor VR3 humano naciente completo puede ser modificado post-traduccionally por medio de eventos de escisión proteolítica específica que da como resultado la formación de fragmentos del polipéptido naciente completo. Un fragmento, o asociación física de fragmentos pueden tener toda la actividad biológica asociada con el receptor VR3 humano no obstante, el grado de actividad del receptor VR3 humano puede variar entre los fragmentos de receptor VR3 humano individuales y los fragmentos de polipéptido de VR3 humano asociados físicamente.

Debido a que el código genético es degenerado, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto, y por lo tanto, la secuencia de aminoácidos puede ser codificada por cualquiera de un grupo de oligonucleótidos de ADN similares. Solamente un miembro del grupo será idéntico a la secuencia del receptor VR3 humano pero será capaz de hibridar con el ADN del receptor VR3 humano incluso en presencia de oligonucleótidos de ADN con emparejamientos erróneos en condiciones apropiadas. En condiciones alternativas, los oligonucleótidos de ADN emparejados erróneamente todavía pueden hibridar con el ADN del receptor VR3 humano para permitir la identificación y aislamiento de ADN que codifica el receptor VR3 humano.

El ADN que codifica el receptor VR3 humano a partir de un organismo concreto se puede utilizar para aislar y purificar homólogos del receptor VR3 humano de otros organismos. Para lograr esto, se puede mezclar el primer ADN del receptor VR3 humano con una muestra que contiene ADN que codifica homólogos del receptor VR3 humano en condiciones de hibridación apropiadas. El complejo de ADN hibridado se puede aislar y el ADN que codifica el ADN homólogo se puede purificar de allí.

Se sabe que existe una cantidad sustancial de redundancia en los diversos codones que codifican los aminoácidos específicos. Por lo tanto, esta invención también está dirigida a aquellas secuencias de ADN que contienen codones alternativos que codifican la traducción definitiva del aminoácido idéntico. Para los fines de esta memoria, una secuencia que porta uno o más codones remplazados se definirá como una variación degenerada. También están incluidas en el alcance de esta invención las mutaciones o bien en la secuencia de ADN o bien en la proteína traducida que no alteran sustancialmente las propiedades físicas finales de la proteína expresada. Por ejemplo, la sustitución de valina por leucina, arginina por lisina, o asparragina por glutamina pueden no causar cambios en la funcionalidad del polipéptido. Tales sustituciones son bien conocidas y se describen, por ejemplo en Molecular Biology of the Gene, 4ª Ed. Benjamin Cummings Pub. Co. de Watson *et al.*

Se sabe que las secuencias de ADN que codifican un péptido pueden ser alteradas con el fin de que codifiquen un péptido que tenga propiedades que sean diferentes de las del péptido de origen natural. Los métodos de alteración de las secuencias de ADN incluyen, pero no están limitados a la mutagénesis dirigida al sitio, la sustitución química, y las fusiones génicas. La mutagénesis dirigida al sitio se utiliza para cambiar uno o más restos del ADN que puede dar como resultado una mutación silenciosa, una mutación conservativa, o una mutación no conservativa. Los genes quiméricos se preparan intercambiando dominios de genes similares o diferentes para remplazar dominios similares en el gen del receptor VR3 humano. De un modo similar, se pueden preparar genes de fusión que añaden dominios al gen del receptor VR3 humano, tal como una etiqueta de afinidad para facilitar la identificación y el aislamiento del gen. Se pueden preparar genes de fusión para remplazar regiones del gen del receptor VR3 humano, por ejemplo para crear una versión soluble de la proteína eliminando un dominio transmembrana o añadiendo una secuencia de redireccionamiento para redirigir el transporte normal de la proteína, o añadiendo nuevas secuencias de modificación post-traduccionally al gen del receptor VR3 humano. Los ejemplos de las propiedades alteradas incluyen pero no están limitados a cambios en la afinidad de una enzima por un sustrato o de un receptor por un ligando.

Según se utiliza en la presente memoria, un “derivado funcional” del receptor VR3 humano es un compuesto que posee una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a la actividad biológica del receptor VR3 humano. Se pretende que el término “derivados funcionales” incluya los “fragmentos”, “variantes”, “variantes degeneradas”, “análogos” y “homólogos” o los “derivados químicos” del receptor VR3 humano. Se pretende que el término “fragmento” haga referencia a cualquier subgrupo de polipéptidos del receptor VR3 humano. Se pretende que el término “variante” haga referencia a una molécula sustancialmente similar en estructura y función o bien a la molécula del receptor VR3 humano completa o bien a un fragmento de la misma. Una molécula es “sustancialmente similar” al receptor VR3 humano si ambas moléculas poseen una actividad biológica similar. Por lo tanto, si las dos moléculas poseen una actividad sustancialmente similar, se considera que son variantes incluso si la estructura de una de las moléculas no se encuentra en la otra o incluso si las dos secuencias de aminoácidos no son idénticas. El término “análogo” hace referencia a una molécula sustancialmente similar en función a la molécula del receptor VR3 humano completa o a un fragmento de la misma.

#### Expresión recombinante del receptor VR3 humano

El ADN del receptor VR3 humano clonado obtenido por medio de los métodos descritos en la presente memoria puede ser expresado recombinantemente mediante clonación molecular en un vector de expresión que contiene un promotor adecuado y otros elementos reguladores de la transcripción apropiados, y transferido a células anfitrionas

## ES 2 300 318 T3

procarióticas o eucarióticas para producir la proteína receptora VR3 humana recombinante. Los mecanismos para tales manipulaciones se describen cuidadosamente en Maniatis, T, *et al. supra*, y son bien conocidos en la técnica.

Los vectores de expresión se definen en la presente memoria como secuencias de ADN que son requeridas para la transcripción de copias clonadas de genes y la traducción de sus ARNm en un anfitrión apropiado. Tales vectores se pueden utilizar para expresar genes eucarióticos en una variedad de anfitriones tales como bacterias incluyendo *E. coli*, algas verde-azuladas, células vegetales, células de insectos, células fúngicas incluyendo células de levadura, y células animales.

Los vectores diseñados específicamente permiten lanzar el ADN entre anfitriones tales como bacterias-levaduras o bacterias-células animales o bacterias-células fúngicas o bacterias-células de invertebrados. Un vector de expresión construido apropiadamente debe contener: un origen de replicación para la replicación autónoma en células anfitrionas, marcadores seleccionables, un número limitado de sitios para enzimas de restricción útiles, un potencial de elevado número de copias, y promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige la ARN polimerasa a unirse al ADN e inicia la síntesis de ARN. Un promotor fuerte es aquel que hace que los ARNm se inicien con una frecuencia elevada. Los vectores de expresión pueden incluir, pero no están limitados a, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmidos diseñados específicamente o virus.

Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión de mamíferos para expresar el receptor VR3 Humano recombinante en células de mamífero. Los vectores de expresión en mamíferos disponibles en el mercado que pueden ser adecuados para la expresión del receptor VR3 Humano recombinante incluyen, pero no están limitados a, pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (In Vitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pDBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCtag (ATCC 37460), e IZD35 (ATCC 37565).

Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión bacterianos para expresar el receptor VR3 humano recombinante en células bacterianas. Los vectores de expresión bacterianos disponibles en el mercado que pueden ser adecuados para la expresión del receptor VR3 humano recombinante incluyen, pero no están limitados a vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen).

Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión en células fúngicas para expresar el receptor VR3 humano recombinante en células fúngicas tales como levaduras. Los vectores de expresión en células fúngicas disponibles en el mercado que pueden ser adecuados para la expresión del receptor VR3 humano recombinante incluyen, pero no están limitados a pYES2 (In Vitrogen) y vector de expresión en *Pichia* (In Vitrogen). Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión en células de insecto para expresar el receptor VR3 humano recombinante en células de insecto. Los vectores de expresión en células de insecto disponibles en el mercado que pueden ser adecuados para la expresión recombinante del receptor VR3 humano incluyen, pero no están limitados a pBlueBacII (In Vitrogen).

El ADN que codifica el receptor VR3 humano puede ser clonado en un vector de expresión para la expresión en una célula anfitriona recombinante. Las células anfitrionas recombinantes pueden ser procarióticas o eucarióticas, incluyendo pero no limitadas a bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levadura, células de mamífero incluyendo pero no limitadas líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, de mono y de roedor, y células de insecto incluyendo pero no limitadas a la línea celular derivada de *Drosophila* y de gusano de seda. Las líneas celulares derivadas de especies de mamífero que pueden ser adecuadas y que son asequibles comercialmente, incluyen, pero no están limitadas a CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCC CCL 171), células L, y HEK-293 (ATCC CRL1573).

El vector de expresión puede ser introducido en células anfitrionas por medio de una de las numerosas técnicas incluyendo, pero no limitadas a transformación, transfección, fusión de protoplastos, lipofección, y electroporación. Las células que contienen el vector de expresión se propagan clónicamente y se analizan individualmente para determinar si producen la proteína receptora VR3 humana. La identificación de los clones de las células anfitrionas que expresan el receptor VR3 humano se puede realizar mediante varios métodos, incluyendo, pero no limitados a la reactividad inmunológica con anticuerpos anti-receptor VR3 humano, y la presencia de actividad del receptor VR3 humano asociada con las células anfitrionas.

La expresión del ADN del receptor VR3 humano también se puede realizar utilizando ARNm sintético producido *in vitro*. El ARNm sintético o el ARNm aislado de células productoras del receptor VR3 Humano puede ser traducido eficazmente en diversos sistemas libres de células, incluyendo pero no limitados a extractos de germen de trigo y extractos de reticulocitos, así como eficazmente traducido en sistemas basados en células, incluyendo pero no limitados a microinyección en oocitos de rana, siendo generalmente preferida la microinyección en oocitos de rana.

Para determinar la secuencia o las secuencias del ADN del receptor VR3 humano que produce niveles óptimos de actividad del receptor VR3 humano y/o proteína receptora VR3 humana, se pueden construir moléculas de ADN de receptor VR3 humano incluyendo, pero no limitadas a:

| Nombre del gen | Codón de iniciación | Codón de Terminación | total pares de bases |
|----------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| VR3A+B+        | 837                 | 3065                 | 2229                 |
| VR3A+B-        | 338                 | 2953                 | 2616                 |
| VR3A-B-        | 1                   | 2436                 | 2436                 |

(estos números corresponden al primer nucleótido de la primera metionina y al último nucleótido antes del primer codón de parada) y numerosos constructos que contienen porciones del ADNc que codifica la proteína receptora VR3 humana. Todos los constructos se pueden diseñar para que contengan ninguna, toda o porciones de la región no traducida 5' o 3' del ADNc del receptor VR3 humano. La actividad del receptor VR3 humano y los niveles de expresión de la proteína se pueden determinar después de la introducción, tanto individual como combinada, de estos constructos en células anfitrionas apropiadas. Después de la determinación de la casete de ADN del receptor VR3 humano que produce la expresión óptima en análisis transitorios, este constructo de ADN del receptor VR3 humano se transfiere a una variedad de vectores de expresión, para su expresión en células anfitrionas incluyendo, pero no limitadas a, células de mamífero, células de insecto infectadas por baculovirus, *E. coli*, y la levadura *S. cerevisiae*.

#### *Métodos de análisis para el receptor VR3 humano*

Se pueden utilizar transfectantes de células anfitrionas y oocitos microinyectados para analizar tanto los niveles de actividad del receptor VR3 humano funcional como los niveles de proteína receptora VR3 humana total mediante los siguientes métodos. En el caso de las células anfitrionas recombinantes, esto implica la co-transfección de uno o posiblemente dos o más plásmidos que contienen el ADN del receptor VR3 humano que codifica uno o más fragmentos, subunidades u otro gen funcional. En el caso de los oocitos, esto implica la inyección simultánea de los ARN sintéticos para la proteína receptora VR3 humana. Después de un período de tiempo apropiado para permitir la expresión, la proteína celular es marcada metabólicamente, por ejemplo con metionina- $S^{35}$  durante 24 horas, después de lo cual se recogen los productos lisados celulares y los sobrenadantes de cultivo celular y se someten a inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína receptora VR3 humana.

Los niveles de proteína receptora VR3 humana en las células anfitrionas se cuantifican mediante mecanismos de inmunoafinidad y/o afinidad por el ligando. Se utilizan cuentas de afinidad específica por el receptor VR3 humano o anticuerpos específicos del receptor VR3 humano para aislar por ejemplo la proteína receptora VR3 humana marcada con metionina- $S^{35}$  o no marcada. La proteína receptora VR3 humana marcada se analiza mediante SDS-PAGE. La proteína receptora VR3 humana no marcada se detecta mediante transferencia Western, ELISA o análisis RIA empleando anticuerpos específicos del receptor VR3 humano.

Otros métodos para detectar la actividad del receptor VR3 humano implican la medida directa de la actividad del receptor VR3 humano en células completas transfectadas con ADNc del receptor VR3 humano u oocitos inyectados con ARNm de receptor VR3 humano. La actividad del receptor VR3 humano se mide mediante unión específica al ligando o características biológicas de las células anfitrionas que expresan el ADN del receptor VR3 humano. En el caso de las células anfitrionas recombinantes que expresan el receptor VR3 humano se pueden utilizar técnicas de pinzamiento zonal de voltaje para medir la actividad del canal y cuantificar la proteína receptora VR3 humana. En el caso de los oocitos se pueden utilizar las técnicas de pinzamiento zonal así como pinzamiento zonal de voltaje de dos electrodos para medir la actividad del canal de calcio y cuantificar la proteína receptora VR3 humana.

#### *Análisis basados en células*

La presente invención proporciona un método con células completas para detectar la modulación del receptor VR3 humano. El método comprende las etapas de;

- 1) poner en contacto un compuesto, y una célula que contiene el receptor VR3 humano funcional, y
- 2) medir un cambio en la célula en respuesta a la función del receptor VR3 humano modificada por el compuesto.

La cantidad de tiempo necesario para el contacto celular con el compuesto se determina empíricamente, por ejemplo, haciendo pasar un lapso de tiempo con un modulador del receptor VR3 humano conocido y midiendo los cambios celulares como una función del tiempo.

Los medios de medida del método de la presente invención se pueden definir adicionalmente comparando una célula que ha sido expuesta a un compuesto con una célula idéntica que no ha sido expuesta de un modo similar al compuesto. Alternativamente dos células, una que contiene receptor VR3 humano funcional y una segunda célula

idéntica a la primera, pero que carece de receptor VR3 humano funcional se podrían poner en contacto con el mismo compuesto y comparar las diferencias entre las dos células. Esta técnica también es útil en el establecimiento del ruido de fondo de estos análisis. Un experto medio en la técnica apreciará que estos mecanismos de control también permiten la fácil selección de cambios celulares que son sensibles a la modulación del receptor VR3 humano funcional.

El término “célula” hace referencia al menos a una célula, pero incluye una pluralidad de células apropiadas para la sensibilidad del método de detección. Las células adecuadas para la presente invención pueden ser bacterianas, de levadura, o eucarióticas.

Los métodos de análisis para determinar la modulación por el compuesto del receptor VR3 humano funcional pueden estar en un formato de laboratorio convencional o adaptado para un elevado rendimiento. El término “elevado rendimiento” hace referencia a un diseño de análisis que permite un análisis fácil de múltiples muestras simultáneamente, y con capacidad de manipulación robótica. Otro rasgo deseado de los análisis de elevado rendimiento es un diseño de análisis que está optimizado para reducir el uso de reactivos, o minimizar el número de manipulaciones con el fin de lograr el análisis deseado. Los ejemplos de los formatos de análisis incluyen pero no están limitados a, las placas de 96 pocillos o de 384 pocillos, las gotitas levitantes, y chips de microcanales “laboratorio en un chip” utilizados para experimentos de manipulación de líquidos. Es bien sabido por los expertos en la técnica que a medida que avanzan la miniaturización de los moldes de plástico y los dispositivos de manipulación de líquidos, o a medida que se diseñan dispositivos de análisis mejorados, se pueden realizar un número mayor de muestras utilizando el diseño de la presente invención.

Los cambios celulares adecuados para el método de la presente invención comprenden medir directamente los cambios en la actividad, función o cantidad de receptor VR3 humano, o midiendo los efectos aguas abajo de la función del receptor VR3 humano, por ejemplo midiendo las concentraciones del segundo mensajero o los cambios en la transcripción o mediante los cambios en los niveles de proteína de los genes que están influenciados transcripcionalmente por el receptor VR3 humano, o midiendo los cambios fenotípicos en la célula. Los medios de la realización preferida incluyen cambios en la cantidad de proteína receptora VR3 humana, cambios en la actividad funcional del receptor VR3 humano, cambios en la cantidad de ARNm, cambios en la proteína intracelular, cambios en la proteína de la superficie celular, o en la proteína secretada, o cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$ , AMPc o GTP. Los cambios en la cantidad o actividad funcional del receptor VR3 humano se describen en la presente memoria. Los cambios en los niveles de ARNm se detectan mediante una transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o mediante expresión génica diferencial. La inmunoafinidad, la afinidad por el ligando, o la medida enzimática cuantifica los cambios inducidos por VR3 en los niveles de proteínas específicas en las células anfitrionas. Cuando la proteína es una enzima, la inducción de la proteína se controla mediante la escisión de un sustrato fluorogénico o colorimétrico.

Los medios de detección preferidos para la proteína de la superficie celular incluyen la citometría de flujo o la formación de imágenes celulares estadísticas. En ambas técnicas la proteína de interés se localiza en la superficie celular, se marca con una sonda fluorescente específica, y se detecta por medio del grado de fluorescencia celular. En la citometría de flujo, las células se analizan en una solución, mientras en las técnicas de formación de imágenes celulares, se compara un campo de células en cuanto a la fluorescencia relativa.

La presente invención también está dirigida a métodos de escrutinio para compuestos que modulan la expresión del ADN o el ARN que codifica el receptor VR3 humano así como la función de la proteína receptora VR3 humana *in vivo*.

Los compuestos pueden modular aumentando o atenuando la expresión del ADN o el ARN que codifica el receptor VR3 humano, o la función de la proteína receptora VR3 humana. Los compuestos que modulan la expresión del ADN o el ARN que codifica el receptor VR3 humano o la función de la proteína receptora VR3 humana pueden ser detectados mediante una variedad de análisis. El análisis puede ser un simple análisis “sí/no” para determinar si hay un cambio en la expresión o la función. El análisis puede ser cuantitativo comparando la expresión o función de una muestra de ensayo con los niveles de expresión o función en una muestra normalizada. Los moduladores identificados en este procedimiento son útiles como agentes terapéuticos, y receptor VR3 humano.

#### *Purificación de la proteína receptora VR3 humana*

Después de la expresión del receptor VR3 humano en una célula anfitriona recombinante, la proteína receptora VR3 humana puede ser recuperada para proporcionar el receptor VR3 humano purificado. El receptor VR3 humano recombinante puede ser purificado a partir de productos lisados y extractos celulares, por medio de diversas combinaciones, o de la aplicación individual de fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de adsorción con hidroxilapatita y cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía con lectina, y cromatografía de afinidad anticuerpo/ligando.

El receptor VR3 humano recombinante se puede separar de otras proteínas celulares mediante el uso de una columna de inmunoafinidad elaborada con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para el receptor VR3 humano naciente completo, fragmentos polipeptídicos del receptor VR3 humano o subunidades del receptor VR3 humano. La resina de afinidad se equilibra después en un tampón adecuado, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3), y los sobrenadantes del cultivo celular o los extractos celulares que contienen el receptor VR3

humano o las subunidades del receptor VR3 humano se hacen pasar lentamente a través de la columna. La columna se lava después con el tampón hasta que la densidad óptica ( $A_{280}$ ) cae hasta el fondo, después la proteína se hace eluir cambiando las condiciones del tampón, por ejemplo disminuyendo el pH utilizando un tampón tal como glicina-HCl 0,23 M (pH 2,6). La proteína receptora VR3 humana purificada se somete a diálisis después frente a un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato.

#### *Producción y uso de anticuerpos que se unen al receptor VR3 humano*

Los anticuerpos mono-específicos para el receptor VR3 humano se purifican a partir de antisuero de mamífero que contiene anticuerpos reactivos contra el receptor VR3 humano o se preparan como anticuerpos monoclonales reactivos con el receptor VR3 humano utilizando la técnica descrita originalmente por Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975). Los mecanismos inmunológicos son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Antibodies: A laboratory manual publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ISBN 0879693142. El anticuerpo mono-específico utilizado en la presente memoria se define como una única especie de anticuerpos o múltiples especies de anticuerpos con características de unión homogéneas para el receptor VR3 humano. La unión homogénea utilizada en la presente memoria hace referencia a la capacidad de la especie de anticuerpo para unirse a un antígeno o epítipo específico, tal como aquellos asociados con el receptor VR3 humano, como se ha descrito antes. Los anticuerpos específicos para el receptor VR3 humano se originan por medio de animales inmunizados tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, cabras, caballos y similares, siendo preferidos los conejos, con una concentración apropiada de receptor VR3 humano con o sin coadyuvante inmunitario.

El suero preinmunitario se recoge antes de la primera inmunización. Cada animal recibe entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 100 mg de receptor VR3 humano asociado con un coadyuvante inmunitario aceptable. Tales coadyuvantes aceptables incluyen, pero no están limitados a, completo de Freund, incompleto de Freund, producto precipitado de alúmina, emulsión de agua en aceite que contiene *Corynebacterium parvum* y ARNt. La inmunización inicial consiste en el receptor VR3 humano, preferiblemente en coadyuvante completo de Freund en múltiples sitios, subcutáneamente (SC), intraperitonealmente (IP) o ambos. Se toman muestras de sangre de cada animal a intervalos regulares, preferiblemente semanalmente, para determinar el título de los anticuerpos. Los animales pueden recibir o no inyecciones de refuerzo después de la inmunización inicial. A aquellos animales que reciben inyecciones de refuerzo se les administra generalmente una cantidad igual del antígeno en coadyuvante incompleto de Freund por la misma ruta. Las inyecciones de refuerzo se administran a intervalos de aproximadamente tres semanas hasta que se obtienen los títulos máximos. Aproximadamente a los 7 días de cada inmunización de refuerzo o aproximadamente semanalmente después de una única inmunización, se toman muestras de sangre de los animales, se recoge el suero, y se almacenan alícuotas a aproximadamente -20°C.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) reactivos con el receptor VR3 humano se preparan inmunizando ratones endogámicos, preferiblemente Balb/c, en el receptor VR3 humano. Los ratones son inmunizados mediante ruta IP o SC con aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1,0 mg, preferiblemente aproximadamente 0,1 mg, de receptor VR3 humano en aproximadamente 0,1 ml de tampón o solución salina incorporados en un volumen igual de coadyuvante aceptable, como se ha comentado antes. Se prefiere el coadyuvante de Freund, utilizándose el coadyuvante completo de Freund para la inmunización inicial y utilizándose el coadyuvante incompleto de Freund después. Los ratones reciben una inmunización inicial el día 0 y se dejan descansar durante aproximadamente 2 a aproximadamente 30 semanas. Se administran a los ratones inmunizados una o más inmunizaciones de refuerzo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg de receptor VR3 humano en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato por ruta intravenosa (IV). Se obtienen linfocitos, de ratones positivos para el anticuerpo, preferiblemente linfocitos esplénicos separando los bazo de los ratones inmunizados mediante procedimientos normalizados conocidos en la técnica. Se producen células de hibridoma mezclando los linfocitos esplénicos con un compañero de fusión apropiado, preferiblemente células de mieloma, en condiciones que permitirán la formación de hibridomas estables. Los compañeros de fusión pueden incluir, pero no están limitados a: mielomas de ratón P3/NS1/Ag4-1; MPC-11; S-194 y Sp2/0, prefiriéndose generalmente Sp2/0. Las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma se fusionan en polietilenglicol, aproximadamente 1000 mol. en peso, a concentraciones de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%. Las células de hibridoma fusionadas se seleccionan mediante crecimiento en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con un suplemento de hipoxantina, timidina, y aminopterina mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los fluidos sobrenadantes se recogen de los pocillos con crecimiento positivo aproximadamente los días 14, 18, y 21 y se escrutan en cuanto a la producción de anticuerpo mediante un inmunoanálisis tal como un inmunoradioanálisis en fase sólida (SPIRA) utilizando receptor VR3 humano como antígeno. Los fluidos de cultivo también se someten a ensayo en el análisis de precipitación de Ouchterlony para determinar el isotipo del mAb. Las células de hibridoma de los pocillos positivos para el anticuerpo se clonan mediante un mecanismo tal como la técnica de agar blando de MacPherson, Soft Agar Techniques, en Tissue Culture Methods and Applications, Kruse y Paterson, Eds., Academic Press, 1973 o mediante la técnica de la dilución limitada.

Los anticuerpos monoclonales son producidos *in vivo* por medio de ratones Balb/c cebados con inyección de pristano, aproximadamente 0,5 ml por ratón, con aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $6 \times 10^6$  células de hibridoma al menos aproximadamente 4 días después del cebado. Se recoge fluido de ascitis aproximadamente 8-12 días después de la transferencia celular y los anticuerpos monoclonales se purifican mediante mecanismos conocidos en la técnica.

Se lleva a cabo la producción *in vitro* de mAAb anti-receptor VR3 humano haciendo crecer el hibridoma en medio para el cultivo de tejidos bien conocido en la técnica. Se puede realizar el cultivo celular *in vitro* de alta densidad para producir grandes cantidades de mAAb anti-receptor VR3 humano utilizando mecanismos de cultivo en fibra hueca, reactores de arrastre, cultivos en botella Roller, o matraces de agitación conocidos en la técnica. Los mAAb se purifican mediante mecanismos conocidos en la técnica.

Se determinan los títulos de anticuerpo de los fluidos de ascitis o cultivo de hibridoma mediante diversos análisis serológicos o inmunológicos que incluyen, pero no están limitados a, técnicas de precipitación, aglutinación pasiva, anticuerpo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA) y técnicas de radioinmunoanálisis (RIA). Se utilizan análisis similares para detectar la presencia de receptor VR3 humano en fluidos corporales o tejidos y extractos celulares.

Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que los métodos descritos antes para producir anticuerpos monoespecíficos se pueden utilizar para producir anticuerpos específicos para fragmentos polipeptídicos del receptor VR3 humano, o polipéptidos del receptor VR3 humano naciente completo, o las subunidades del receptor VR3 humano individuales. Específicamente, resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que se pueden generar anticuerpos monoespecíficos que son específicos solamente para una subunidad del receptor VR3 humano o para la proteína receptora VR3 humana completamente funcional. También es evidente para los expertos en la técnica que se pueden generar anticuerpos monoespecíficos que inhiben la función normal de la proteína receptora VR3 humana.

Las columnas de afinidad del anticuerpo para el receptor VR3 humano se elaboran añadiendo los anticuerpos a un soporte de gel de manera que los anticuerpos forman enlaces covalentes con el soporte de cuentas de gel. Los enlaces covalentes preferidos se realizan a través de los restos amino, aldehído, o sulfhidrilo contenidos en el anticuerpo. Los métodos para generar grupos aldehído o sulfhidrilo libres en los anticuerpos son bien conocidos en la técnica: los grupos amino son reactivos, por ejemplo, con los ésteres de N-hidroxisuccinimida.

#### *Composiciones para kits que contienen reactivos específicos para el receptor VR3 humano*

Se pueden preparar kits que contienen ADN o ARN del receptor VR3 humano, anticuerpos para el receptor VR3 humano, o la proteína receptora VR3 humana. Tales kits se utilizan para detectar el ADN que hibrida con el ADN del receptor VR3 humano o para detectar la presencia de la proteína receptora VR3 humana o de fragmentos peptídicos en una muestra. Semejante caracterización es útil para una variedad de fines incluyendo pero no limitados a análisis forenses, aplicaciones de diagnóstico, y estudios epidemiológicos.

Esta invención hace referencia al uso de polinucleótidos VR3 humanos para su utilización como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada del gen VR3 humano asociada con una disfunción proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede ayudar a definir el diagnóstico de una enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad que resulta de la baja expresión o de la expresión excesiva del VR3 humano. Los individuos que portan mutaciones en el gen VR3 humano pueden ser detectados a nivel de ADN por medio de una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica, y descritos en la presente memoria.

Se pueden utilizar las moléculas de ADN, las moléculas de ARN, las proteínas recombinantes y los anticuerpos de la presente invención para escrutar y medir los niveles de ADN del receptor VR3 humano, de ARN del receptor VR3 humano o proteína receptora VR3 humana. Las propias proteínas recombinantes, moléculas de ADN, moléculas de ARN y anticuerpos conducen a la formulación de kits adecuados para la detección y la tipificación del receptor VR3 humano. Semejante kit comprendería un portador compartimentado adecuado para contener en un confinamiento cerrado al menos un recipiente. El portador comprendería adicionalmente reactivos tales como proteína receptora VR3 humana recombinante o anticuerpos anti-receptor VR3 humano adecuados para detectar el receptor VR3 humano. El portador también podría contener un medio para la detección tal como un antígeno marcado o sustratos enzimáticos o similares.

#### *Terapia génica*

Se pueden sintetizar secuencias de nucleótidos que son complementarias a la secuencia de ADN que codifica el receptor VR3 humano para la terapia antisentido. Estas moléculas antisentido pueden ser ADN, derivados estables de ADN tales como fosforotioatos o metilfosfonatos, ARN, derivados estables de ARN tales como 2'-O-alquilARN, u otros miméticos oligonucleotídicos antisentido del receptor VR3 humano. Las moléculas antisentido del receptor VR3 humano se pueden introducir en las células mediante microinyección, encapsulación en liposomas o mediante expresión a partir de vectores que albergan la secuencia antisentido. La terapia antisentido del receptor VR3 humano puede ser particularmente útil para el tratamiento de enfermedades en las que resulta beneficioso reducir la actividad del receptor VR3 humano.

Se puede utilizar la terapia génica con el receptor VR3 humano para introducir el receptor VR3 humano en las células de los organismos diana. El gen del receptor VR3 humano se puede ligar en vectores virales que median la transferencia del ADN del receptor VR3 humano mediante infección de las células anfitrionas receptoras. Los vectores virales adecuados incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus, virus vacunal, poliovirus y similares. Alternativamente, el ADN del receptor VR3 humano puede ser transferido a células para la terapia génica mediante técnicas no virales incluyendo la transferencia de ADN dirigida mediada por el receptor utilizando los productos conjugados ligando-ADN o los productos conjugados adenovirus-ligando-ADN, la fusión de membranas

por lipofección o la microinyección directa. Estos procedimientos y las variaciones de los mismos son adecuados para la terapia génica con el gen del receptor VR3 humano *ex vivo* así como *in vivo*. La terapia con el gen del receptor VR3 humano puede ser particularmente útil para el tratamiento de enfermedades en las que resulta beneficioso elevar la actividad del receptor VR3 humano. Los protocolos para la metodología molecular de la terapia génica adecuados para su uso con el gen del receptor VR3 humano se describen en Gene Therapy Protocols, editado por Paul D. Robbins, Human press, Totawa NJ, 1996.

#### *Composiciones Farmacéuticas*

Las composiciones farmacéuticamente útiles que comprenden el ADN del receptor VR3 humano, el ARN del receptor VR3 humano, o la proteína receptora VR3 humana, o moduladores de la actividad del receptor VR3 humano, pueden ser formuladas de acuerdo con los métodos conocidos tales como la mezcla de un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales portadores y métodos de formulación se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz de la proteína, el ADN, el ARN, o el modulador.

Las composiciones terapéuticas o de diagnóstico de la invención se administran a los individuos en cantidades suficientes para tratar o diagnosticar trastornos en los que está indicada la modulación de la actividad relacionada con el receptor VR3 humano. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una variedad de factores tales como el estado del individuo, el peso, el sexo y la edad. Otros factores incluyen el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar al individuo mediante una variedad de rutas tales como subcutánea, tópica, oral e intramuscular.

El término "derivado químico" describe una molécula que contiene radicales químicos adicionales que no son normalmente parte de la molécula base. Tales radicales pueden mejorar la solubilidad, la vida media, la absorción, etc. de la molécula base. Alternativamente los radicales pueden atenuar los efectos secundarios no deseables de la molécula base o disminuir la toxicidad de la molécula base. Los ejemplos de tales radicales se describen en una variedad de textos, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences.

Los compuestos identificados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar solos a dosis apropiadas definidas por el ensayo rutinario con el fin de obtener la inhibición óptima del receptor VR3 humano o su actividad a la vez que minimizan cualquier toxicidad potencial. Además, puede ser deseable la administración simultánea o sucesiva de otros agentes.

La presente invención también tiene el objetivo de proporcionar formulaciones farmacéuticas tópicas, orales, sistémicas y parenterales adecuadas para su uso en los métodos de tratamiento novedosos de la presente invención. Las composiciones que contienen compuestos o moduladores identificados de acuerdo con esta invención como ingrediente activo para su uso en la modulación del receptor VR3 humano se pueden administrar en una amplia variedad de formas de dosificación terapéutica en vehículos convencionales para la administración. Por ejemplo, los compuestos o moduladores se pueden administrar en formas de dosificación oral tales como comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación controlada y de liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o mediante inyección. Del mismo modo, también pueden ser administrados en forma intravenosa (tanto bolo como infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión, o intramuscular, utilizando todas formas bien conocidas por los expertos normales en las técnicas farmacéuticas. Se puede emplear una cantidad eficaz pero no tóxica del compuesto deseado como agente modulador del receptor VR3 humano.

La dosis diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por paciente, por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos ranurados o no ranurados que contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, y 50,0 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. La cantidad eficaz del fármaco es suministrada normalmente a un nivel de dosificación de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. El intervalo es más concretamente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día. Las dosificaciones de los moduladores del receptor VR3 humano se ajustan cuando se combinan para lograr los efectos deseados. Por otra parte, las dosificaciones de estos diversos agentes se pueden optimizar y combinar independientemente para lograr un resultado sinérgico en el que la patología se reduce más de lo que lo haría si se utilizara cualquiera de los agentes solo.

Ventajosamente, los compuestos o moduladores de la presente invención se pueden administrar en una única dosis diaria, o se puede administrar la dosis diaria total en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Además, los compuestos o moduladores para la presente invención se pueden administrar en forma intranasal por medio del uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o por medio de rutas transdérmicas, utilizando aquellas formas de parches transdérmicos para la piel bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Para ser administrada en forma de sistema de liberación transdérmica, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en vez de intermitente durante todo el régimen de dosificación.

Para el tratamiento combinado con más de un agente activo, cuando los agentes activos están en formulaciones de dosificación separadas, se pueden administrar a la vez los agentes activos, o se puede administrar cada uno en momentos separadamente escalonados.

El régimen de dosificación que utiliza los compuestos o moduladores de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad de la condición que se va a tratar; la ruta de administración; la función renal y hepática del paciente; y del compuesto concreto del mismo empleado. Un médico o veterinario experto normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerida para evitar, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima al lograr las concentraciones de fármaco en el intervalo que proporciona eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la biodisponibilidad de los fármacos en los sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, el equilibrio, y la eliminación de un fármaco.

En los métodos de la presente invención, los compuestos o moduladores de la presente memoria descritos con detalle pueden formar el ingrediente activo, y se administran típicamente mezclados con diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticos adecuados (referidos colectivamente en la presente memoria como materiales "portadores") adecuadamente seleccionados con respecto a la forma de administración pretendida, esto es, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y coherentes con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un portador inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico, oral tal como etanol, glicerol, agua y similares. Por otra parte, cuando se desea o es necesario, también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes utilizados en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Para las formas líquidas se puede combinar el componente activo en agentes suspensores o dispersantes adecuadamente aromatizados tales como gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, tragacanto, acacia, metilcelulosa y similares. Otros agentes dispersantes que se pueden emplear incluyen glicerina y similares. Para la administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Las preparaciones isotónicas, que contienen generalmente conservantes adecuados, se emplean cuando se desea la administración intravenosa.

Las preparaciones tópicas que contienen el componente fármaco activo se pueden mezclar con una variedad de materiales portadores bien conocidos en la técnica, tales como, p. ej., alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites con vitamina A y E, aceite mineral, miristilpropionato de PPG2, y similares, para formar, p. ej., soluciones alcohólicas, limpiadores tópicos, cremas limpiadoras, geles para la piel, lociones para la piel, y champús en crema o formulaciones en gel.

Los compuestos o moduladores de la presente invención también se pueden administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de la presente invención también se pueden liberar mediante el uso de anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los cuales se acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos o moduladores de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles tales como portadores de fármacos dirigibles. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidofenol, polihidroxietilaspártamidofenol, o polietilenoxydopolilisina sustituida con restos palmitoilo. Además, los compuestos o moduladores de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles al lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsiloncaprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloques entrecruzados o anfipáticos de hidrogeles.

Para la administración oral, los compuestos o moduladores se pueden administrar en forma de cápsulas, comprimidos, o bolo o alternatively se pueden mezclar en el alimento de los animales. Las cápsulas, comprimidos, y bolos están formados por el ingrediente activo combinado con un vehículo portador apropiado tal como almidón, talco, estearato de magnesio, o fosfato dicálcico. Estas formas de dosificación unitaria se preparan mezclando íntimamente el ingrediente activo con ingredientes inertes adecuadamente triturados finamente incluyendo diluyentes, cargas, agentes disgregantes, y/o aglutinantes de manera que se obtenga una mezcla uniforme. Un ingrediente inerte es aquél que no reacciona con los compuestos o moduladores y que no es tóxico para el animal que está siendo tratado. Los ingredientes inertes adecuados incluyen almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, gomas vegetales y aceites, y similares. Estas formulaciones pueden contener una cantidad ampliamente variable de los ingredientes activos e inactivos dependiendo de numerosos factores tales como el tamaño y el tipo de la especie de animal que se va a tratar y del tipo y la gravedad de la infección. El ingrediente activo también se puede administrar como un aditivo del alimento simplemente mezclando el compuesto con el pienso o aplicando el compuesto a la superficie del alimento. Alternativamente el ingrediente activo se puede mezclar con un portador inerte y la composición resultante se puede mezclar después con el alimento o se puede alimentar directamente al animal. Los portadores inertes adecuados incluyen harina de maíz, harina de cítrico, restos de fermentación, fibra de soja, granos secos y similares. Los ingredientes activos se mezclan

## ES 2 300 318 T3

íntimamente con estos portadores inertes triturando, agitando, moliendo, o volteando de manera que la composición final contenga del 0,001 al 5% en peso del ingrediente activo.

Alternativamente los compuestos o moduladores pueden ser administrados parenteralmente por medio de inyección de una formulación que consiste en el ingrediente activo disuelto en un portador líquido inerte. La inyección puede ser intramuscular, intraluminal, intratraqueal, o subcutánea. La formulación inyectable consiste en el ingrediente activo mezclado con un portador líquido inerte apropiado. Los portadores líquidos aceptables incluyen los aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo y similares así como disolventes orgánicos tales como solketal, glicerol formal y similares. Como alternativa, también se pueden utilizar formulaciones parenterales acuosas. Los aceites vegetales son los portadores líquidos preferidos. Las formulaciones se preparan disolviendo o suspendiendo el ingrediente activo en el portador líquido de manera que la formulación final contenga del 0,005 al 10% en peso del ingrediente activo.

La aplicación tópica de los compuestos o moduladores es posible por el uso de una poción líquida o un champú que contiene los presentes compuestos o moduladores en forma de una solución o suspensión acuosa. Estas formulaciones contienen generalmente un agente suspensor tal como bentonita y normalmente también contendrán un agente antiespumante. Son aceptables formulaciones que contienen del 0,005 al 10% en peso del ingrediente activo. Las formulaciones preferidas son aquellas que contienen del 0,01 al 5% en peso de los presentes compuestos o moduladores.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención sin limitar, sin embargo, la misma a estos.

### Ejemplo 1

#### *Generación de genotecas de ADNc de próstata y pituitaria humanas. Síntesis de ADNc*

*Síntesis de la primera hebra:* Se utilizaron aproximadamente 5  $\mu$ g de ARNm de próstata o pituitaria humanas (Clontech) para sintetizar ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc (Life Technologies). Se añadieron 2  $\mu$ l de adaptador cebador Not1 a 5  $\mu$ l de ARNm y la mezcla se calentó a 70°C durante 10 minutos y se colocó sobre hielo. Se añadieron los siguientes reactivos sobre hielo: 4  $\mu$ l de 5x tampón de la primera hebra (TRIS-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M, mezcla de dNTP 10 mM (nucleótido trifosfatos) y 1  $\mu$ l de agua tratada con DEPC. La reacción se incubó a 42°C durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 5  $\mu$ l de Superscript RT II y se incubaron a 42°C durante 2 horas más. La reacción se finalizó sobre hielo.

*Síntesis de la segunda hebra:* Se ajustó la primera hebra producto a 93  $\mu$ l con agua y se añadieron los siguientes reactivos sobre hielo: 30  $\mu$ l de 5x tampón de la segunda hebra (TRIS-HCl 100 mM (pH 6,9), KCl 450 mM, MgCl<sub>2</sub> 23 mM,  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 0,75 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, 3  $\mu$ l de dNTP 10 mM (nucleótidos trifosfato), 1  $\mu$ l de ADN ligasa de *E. coli* (10 unidades) 1  $\mu$ l de ARNasa H (2 unidades), 4  $\mu$ l de ADN pol I (10 unidades). La reacción se incubó a 16°C durante 2 horas. El ADN de la síntesis de la segunda hebra se trató con ADN polimerasa de T4 y se colocó a 16°C para hacer romos los extremos del ADN. El ADNc de doble hebra se extrajo con 150  $\mu$ l de una mezcla de fenol y cloroformo (1:1, v:v) y se hizo precipitar con 0,5 volúmenes de NH<sub>4</sub>OAc 7,5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento se lavó con etanol del 70% y se secó a 37°C para eliminar el etanol residual. El sedimento de ADN de doble hebra se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua y se añadieron los siguientes reactivos: 10  $\mu$ l de 5x tampón de ADN ligasa de T4, 10  $\mu$ l de adaptadores SalI y 5  $\mu$ l de ADN ligasa de T4. Los ingredientes se mezclaron suavemente y se ligaron durante la noche a 16°C. La mezcla de ligación se extrajo con fenol:cloroformo: alcohol isoamílico, se sometió a vórtice cuidadosamente y se centrifugó a la temperatura ambiente durante 5 minutos a 14.000 x g para separar las fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el volumen se ajustó a 100 ml con agua. El ADN purificado se seleccionó por tamaños sobre una columna Chromaspin 1000 (Clontech) para eliminar las moléculas de ADNc más pequeñas. El ADN de doble hebra se sometió a digestión con la enzima de restricción Not1 durante 3-4 horas a 37°C. El producto de la digestión con enzimas de restricción se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8%. El ADNc en el intervalo de 1-5 kb se cortó y se purificó utilizando Gelzyme (In Vitrogen). El producto se extrajo con fenol:cloroformo y se hizo precipitar con NH<sub>4</sub>OAc y etanol absoluto. El sedimento se lavó con etanol del 70% y se resuspendió en 10 ml de agua.

*Ligación de ADNc al Vector:* El ADNc se dividió en 5 tubos (2  $\mu$ l cada uno) y las reacciones de ligación se ajustaron añadiendo 4,5  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l de 5x tampón de ligación, 1  $\mu$ l de ADN del vector p-Sport (cortado con Sal-I/Not1 y tratado con fosfatasa) y 0,5  $\mu$ l de ADN ligasa de T4. La ligación se incubó a 40°C durante la noche.

#### *Introducción de ADNc Ligado en *E. coli* mediante Electroporación*

Se ajustó el volumen de la reacción de ligación a un volumen total de 20  $\mu$ l con agua. Se añadieron 5  $\mu$ l de ARNt de levadura, 12,5 ml de NH<sub>4</sub>OAc 7,5 M y 70 ml etanol absoluto (-20°C). La mezcla se sometió a vórtice cuidadosamente, e inmediatamente se centrifugó a la temperatura ambiente durante 20 minutos a 14.000 x g. Los sedimentos se lavaron en etanol del 70% y cada sedimento se resuspendió en 5 ml de agua. Las 5 ligaciones (25 ml) se reunieron y se sometieron a electroporación 100  $\mu$ l de células DH10B electrocompetentes (Life Technologies) con 1 ml de ADN (total de 20 electroporaciones), después se cultivaron en placas con ampicilina para determinar el número de recombinantes (cfu) por microlitro. Toda la genoteca se sembró en 2 litros de Super Broth y se realizaron Maxipreps utilizando el kit Promega Maxi Prep y se purificaron en gradientes de cloruro de cesio.

## Ejemplo 2

*Escrutinio de la Genoteca/Generación de VR3 A+B+ Humano*5 *Escrutinio de genotecas de glándula pituitaria*

Se sometieron a electroporación alícuotas de 1  $\mu$ l de la genoteca de glándula pituitaria humana en células Electromax DH10B (Life Technologies). El volumen se ajustó a 1 ml con medio SOC y se incubó durante 45 minutos a 37°C con sacudimiento. La genoteca se cultivó en placa después sobre placas de 150 cm<sup>2</sup> que contenían LB a una densidad de 20.000 colonias por placa. Estos cultivos se hicieron crecer durante la noche a 37°C.

Se generó una sonda de receptor VR3 humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el siguiente par de cebadores:

15 5' oligo (SEQ ID NO: 1): 5' ACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTG

3' oligo (SEQ ID NO: 2): 5' TGTCCGCCTTCTTGTTGGGGTTCTC

20 La sonda se generó mediante PCR utilizando condiciones de PCR regulares empleando sondas oligonucleotídicas 5' y 3' (100 ng cada una) y 10 ng ADN de miniprep diluido. El fragmento de 493 pb resultante se hizo correr sobre un gel de agarosa al 1% y se purificó utilizando el kit de extracción QUIAquick Gel (Quiagen). Aproximadamente 100 ng de la sonda purificada se marcaron con P32 alfa utilizando un kit de oligomarcage de Pharmacia y el ADN marcado se purificó con columnas S-200 (Pharmacia).

25 Las colonias de la genoteca se levantaron sobre filtros de nitrocelulosa Protran (Schleicher & Schuell) y el ADN se desnaturizó en NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M. Los discos de filtro se neutralizaron con NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1,0 M, pH 7,5 y después se entrecruzaron mediante UV con la membrana utilizando un UV-Stratalinker (Stratagene). Los filtros se lavaron varias veces en solución de lavado (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; NaCl 5 M; EDTA 0,5 M; SDS al 20%) a 42°C. Luego se incubaron los discos en 1 x tampón de pre-hibridación southern (5'-3' Inc) que contenía formamida al 50% y 30 100  $\mu$ g/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla (5'-3' Inc) durante 6 horas a 42°C. Finalmente, se realizó la hibridación durante la noche a 42°C en 1 x tampón de hibridación (5'-3') que contenía formamida al 50%, 100 ng de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla en presencia de sonda marcada (5x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>6</sup> cmp/ml de tampón de hibridación).

35 Los discos se lavaron dos veces en 2xSSC, SDS al 0,2% a la temperatura ambiente (20 minutos cada uno) y una vez en 0,2xSSC, SDS al 0,1% a 50°C durante 30 minutos. Las membranas se colocaron después sobre hojas de papel de filtro, se envolvieron en envoltura de plástico y se expusieron a la película a -20°C durante la noche.

40 Se identificaron los clones positivos y se recogieron concentrando las colonias de la placa original. Las colonias se incubaron en LB durante 1 hora a 37°C. Las diluciones de los cultivos se cultivaron en placa sobre placas de agar LB y se repitió el procedimiento de levantamiento del filtro, hibridación, lavado, selección de colonias. Se escogieron clones individuales del segundo escrutinio y se sometieron a digestión con Sall/NotI para determinar el tamaño de los insertos, y se secuenciaron los insertos.

45 Se generó el clon completo mediante PCR con polimerasa Pfu utilizando 10 ng del clon de la genoteca secuenciada como molde y oligos completos con sitios KpnI (FL 5' oligo SEQ ID NO: 3) y NotI (FL 3' oligo SEQ ID NO: 4).

FL 5' oligo (SEQ ID NO:3):

50 AACGTTGGTACCGCCACCATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCCCGCGCG

FL3' oligo: (SEQ ID NO:4):

TAAAGCGGCCGCTTCAGGAGGGACATCGGTGAGCCTCAC

55 El producto de la PCR se digirió con las enzimas KpnI y NotI y se clonó en un vector de expresión pSP64T.GC. La preparación de ADN a gran escala se realizó utilizando un estuche MEGA prep (Quiagen).

## Ejemplo 3

60 *Escrutinio de la Genoteca/Generación de VR3 A+B- humano y VR3 A-B- humano**Escrutinio de la genoteca de próstata humana*

65 Se sometieron a electroporación alícuotas de 1  $\mu$ l de la genoteca de próstata humana en células Electromax DH10B (Life Technologies). Se ajustó el volumen a 1 ml con medio SOC y se incubó durante 45 minutos a 37°C con sacudimiento. Después la genoteca se cultivó en placa sobre placas de 150 cm<sup>2</sup> que contenían LB hasta una densidad de 2.000 colonias por placa. Estos cultivos se hicieron crecer durante la noche a 37°C.

## ES 2 300 318 T3

Se generó una sonda de receptor VR3 humano por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el siguiente par de cebadores:

5' oligo (SEQ ID NO: 13): 5' CTACCTGACGGAGAACCCCCACAAG

3' oligo (SEQ ID NO: 14): 5' GTAGTAGGCGGTGAGACTGAAGATGA

La sonda se generó mediante PCR utilizando las condiciones de PCR regulares empleando sondas oligonucleóticas 5' y 3' (100 ng cada una) y 10 ng de ADN miniprep diluido. El fragmento de 387 pb resultante se hizo correr sobre gel de agarosa al 1% y se purificó utilizando un kit de extracción QUIAquick Gel (Quiagen). Aproximadamente 100 ng de la sonda purificada se marcaron con P32 alfa utilizando el kit de oligomarcado de Pharmacia y el ADN se purificó con columnas S-200 (Pharmacia).

Las colonias de la genoteca se levantaron sobre filtros de nitrocelulosa Protran (Schleicher & Schuel) y el ADN se desnaturalizó en NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M. Los discos del filtro se neutralizaron con NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1,0 M, pH 7,5 y después se entrecruzaron por medio de UV con la membrana utilizando un UV-Stratalinker (Stratagene). Los filtros se lavaron varias veces en solución de lavado (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; NaCl 5 M; EDTA 0,5 M; SDS al 20%) a 42°C. Después se incubaron los discos en 1x tampón de prehibridación southern (5'-3' Inc) que contenía formamida al 50% y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla (5'-3' Inc) durante 6 horas a 42°C. Finalmente, se realizó la hibridación durante la noche a 42°C en 1x tampón de hibridación (5'-3') que contenía formamida al 50%, 100 ng de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla en presencia de sonda marcada ( $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  cmp/ml de tampón de hibridación).

Los discos se lavaron dos veces en 2xSSC, SDS al 0,2% a la temperatura ambiente (20 minutos cada uno) y una vez en 0,2xSSC, SDS al 0,1% a 50°C durante 30 minutos. Después se colocaron las membranas sobre hojas de papel de filtro, se envolvieron en envoltura Saran y se expusieron a la película a -20°C durante la noche.

Los clones positivos se identificaron y se recogieron concentrando las colonias de la placa original. Las colonias se incubaron en LB durante 1 hora a 37°C. Las diluciones de los cultivos se cultivaron en placa sobre placas de agar LB y se repitió el procedimiento de levantamiento del filtro, hibridación, lavado, selección de colonias. Los clones individuales del segundo escrutinio se escogieron y se sometieron a digestión con EcoRI/NotI para determinar el tamaño de los insertos, y los insertos se secuenciaron.

El clon completo se generó mediante PCR con polimerasa Pfu utilizando 10 ng del clon de la genoteca secuenciada como molde y oligos completos con sitios NotI (FL 5' oligo SEQ ID NO:15) y XbaI (FL 3' oligo SEQ ID NO:16).

FL 5' oligo (SEQ ID NO: 15):

5' AACGTTGGCGGCCGCGCCACCATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGC G

FL3' oligo: (SEQ ID NO:16):

5' AACGTTTCTAGACTGGGCTGCAGTCCCTAG

El producto de la PCR fue digerido con las enzimas NotI y XbaI y clonado en un vector de expresión pGem HE. La preparación de ADN a gran escala se realizó utilizando un kit MEGA prep (Quiagen).

### Ejemplo 4

#### *Clonación del ADNc del receptor VR3 humano en un Vector de Expresión en Mamíferos*

Se clonaron los ADNc del receptor VR3 humano (referidos colectivamente como hVR3) en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1/Zeo(+). El producto de la PCR clonado se purificó sobre una columna (kit de purificación de ADN "Wizard PCR DNA purification kit" de Promega) y se sometió a digestión con Not I y EcoRI (NEB) para crear extremos cohesivos. El producto se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. El vector pcDNA3.1/Zeo(+) se sometió a digestión con las enzimas NotI y XbaI (excepto para hVR3 A+B+, que se clonó en los sitios BamHI/NotI) y se purificó con posterioridad en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se utilizó el vector lineal para ligarlo a los insertos de ADNc de VR3 humano. Se aislaron los recombinantes, se diseñó el receptor VR3 humano, y se utilizó para transfectar células de mamífero (células HEK293, COS-7 o CHO-K1) utilizando el kit de transfección basado en lípidos no liposomales Effectene (Quiagen). Los clones celulares estables se seleccionaron mediante crecimiento en presencia de zeocina. Los clones resistentes a zeocina individuales se aislaron y se demostró que contenían el gen del receptor VR3 humano intacto. Los clones que contenían los ADNc del receptor VR3 humano se analizaron en cuanto a la expresión de la proteína hVR3. Se utilizaron los plásmidos recombinantes que contenían ADN que codificaba VR3 humano para transformar las células COS o CHO o HEK293 de mamífero.

Las células que expresan el receptor VR3 humano, establemente o transitoriamente, se utilizan para someter a ensayo la expresión del receptor VR3 humano y la actividad de unión a H<sup>3</sup>-RTX. Estas células se utilizan para identificar

y examinar otros compuestos en cuanto a su capacidad para modular, inhibir o activar el receptor VR3 humano y para competir por la unión a  $H^3$ -RTX radiactivo.

Los casetes que contienen el ADNc del receptor VR3 humano en orientación positiva con respecto al promotor se ligan en sitios de restricción apropiados 30 del promotor y se identifican mediante mapeo de sitios de restricción y/o secuenciación. Estos vectores de expresión de ADNc se introducen en células anfitrionas fibroblásticas por ejemplo COS-7 (ATCC núm. CRL1651), y CV-1 tat [Sackevitz *et al.*, Science 238: 1575 (1987)], 293. L (ATCC núm. CRL6362)] mediante métodos normalizados incluyendo, pero no limitados a electroporación, o procedimientos químicos (liposomas catiónicos, DEAE dextrano, fosfato de calcio). Las células transfectadas y los sobrenadantes de los cultivos celulares se cosechan y se analizan en cuanto a la expresión del receptor VR3 humano como se describe en la presente memoria.

Todos los vectores utilizados para la expresión transitoria en mamíferos se pueden utilizar para establecer líneas celulares estables que expresan el receptor VR3 humano. Se espera que los constructos de ADNc del receptor VR3 humano no alterados clonados en vectores de expresión programen las células anfitrionas para elaborar la proteína receptora VR3 humana. Las células anfitrionas para la transfección incluyen, pero no están limitadas a, CV-1-P [Sackevitz *et al.*, Science 238: 1575 (1987)], tk-L [Wigler, *et al.* Cell 11: 223 (1977)], NS/0, y dHFr- CHO [Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159: 601, (1982)].

La co-transfección de cualquier vector que contiene el ADNc del receptor VR3 humano con un fármaco de selección, incluyendo, pero no limitado a G418, aminoglicósido fosfotransferasa; higromicina, higromicina-B fosfotransferasa; APRT, xantina-guanina fosforribosil-transferasa, permitirá la selección de clones transfectados establemente. Los niveles de receptor VR3 humano se cuantifican por medio de los análisis descritos en la presente memoria.

Los constructos de ADNc de receptor VR3 humano también se ligan en vectores que contienen marcadores de resistencia a fármacos amplificables para la producción de clones de células de mamíferos que sintetizan los niveles más elevados posibles de receptor VR3 humano. Tras la introducción de estos constructos en las células, se seleccionan los clones que contienen el plásmido con el agente apropiado, y el aislamiento de un clon expresado en exceso con un elevado número de copias de plásmidos se completa mediante selección en dosis crecientes del agente.

La expresión del receptor VR3 humano recombinante se logra mediante transfección del ADNc del receptor VR3 humano completo en una célula anfitriona de mamífero.

#### Ejemplo 5

##### *Caracterización de la proteína funcional codificada por pVR3R en oocitos de Xenopus*

Se prepararon oocitos de *Xenopus laevis* y se inyectaron utilizando métodos normalizados descritos previamente y conocidos en la técnica (Fraser *et al.*, 1993). Se apartaron lóbulos de ovario de *Xenopus laevis* hembra adulto (Nasco, Fort Atkinson, WI), se enjuagaron varias veces en solución salina sin calcio nominal que contenía: NaCl 82,5 mM, KCl 2,5 mM,  $MgCl_2$  1 mM, HEPES 5 mM, ajustado a pH 7,0 con NaOH (OR-2), y se sacudieron suavemente en OR-2 que contenía colagenasa de Tipo 1 al 0,2% (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio) durante 2-5 horas. Cuando se separaron aproximadamente el 50% de las capas foliculares, se seleccionaron los oocitos en Fase V y VI y se enjuagaron en medio que consistía en 75% de OR-2 y 25% de ND-96. El ND-96 contenía: NaCl 100 mM, KCl 2 mM,  $MgCl_2$  1 mM.

$CaCl_2$  1,8 mM, HEPES 5 mM, piruvato de Na 2,5 mM, gentamicina (50  $\mu g/ml$ ), ajustado a pH 7,0 con NaOH. El  $Ca^{+2}$  extracelular aumentó gradualmente y

$CaCl_2$  1,8 mM, HEPES 5 mM, piruvato de Na 2,5 mM, gentamicina (50  $\mu g/ml$ ), ajustado a pH 7,0 con NaOH. El  $Ca^{+2}$  extracelular aumentó gradualmente y las células se mantuvieron en ND-96 durante 2-24 horas antes de la inyección. Para la transcripción *in vitro*, se linealizó pGEM HE (Liman *et al.*, 1992) que contenía VR3 humano con NheI y se transcribió con ARN polimerasa de T7 (Promega) en presencia del análogo protegido terminalmente m7G (5')ppp(5')G. El ARNc sintetizado se precipitó con acetato de amonio e isopropanol, y se resuspendió en 50  $\mu l$  de agua sin nucleasa, se cuantificó el ARNc utilizando geles de formaldehído (agarosa al 1%, 1xMOPS, formaldehído al 3%) frente a 1,2 y 1,5  $\mu l$  de marcadores de ARN (Gibco BRL, 0,24-9,5 Kb).

Se inyectaron 50 nl del ARN del receptor VR3 humano (0,3-5 ng) en los oocitos con o sin inyección simultánea de VR1 (2-3 ng). A los oocitos de control se les inyectaron 50 nl de agua. Los oocitos se incubaron durante 1-13 días en ND-96 antes del análisis de la expresión del VR3 humano.

Se llevaron a cabo incubaciones y digestión con colagenasa a la temperatura ambiente. Los oocitos que habían sido inyectados se mantuvieron en agrupaciones de cultivo de tejidos de 48 pocillos (Costar; Cambridge, MA) a 18°C. Se midieron las corrientes inducidas por el agonista en células completas medidas 1-14 días después de la inyección con una pinza de voltaje de dos electrodos convencional (GeneClamp500, Axon Instruments, Foster City, CA) utilizando métodos normalizados descritos previamente y conocidos en la técnica (Dascal, 1987). Los microelectrodos se llenaron con KCl 3 mM, que tenía resistencias de 1 y 2 M $\Omega$ . Las células fueron perfundidas continuamente con ND96 a -10 ml/min a la temperatura ambiente a menos que se indique de otro modo. El voltaje de la membrana se fijó a -70 mV a no ser que se especifique.

Los oocitos se sensibilizaron con una variedad de ligandos, pH bajo, y etapas de voltaje de despolarización así como de hiperpolarización pero no hubo diferencias detectables en la conductancia de la membrana entre los oocitos que expresaban VR3 humano y los oocitos de control [véase la Tabla 1]. No obstante, los oocitos a los que se había inyectado VR3 humano tenían propiedades que eran diferentes de los controles en 4 aspectos. Primero, la inyección de ARNC de VR3 A+B- hizo que los oocitos murieran. La viabilidad de los oocitos a los que se habían inyectado isoformas de VR3 que tenían un inserto A era significativamente reducida en comparación con los controles de las hermanas 3-4 días después de la inyección (Figura 9). Segundo, las tres isoformas de VR3 aumentaban la respuesta inducida por calor (Figura 10). tercero, la inyección simultánea de A+B- con VR1 humano producía una corriente inducida por perfusión sensible al rojo de rutenio ( $I_{\text{perfusión}}$ ) (Figura 11). Cuarto, la inyección simultánea de ARNC de VR3 A+B- humano con ARNC de VR1 humano alteró la sensibilidad de los oocitos a capsaicina 1  $\mu\text{M}$ , un agonista del receptor VR1 (Figura 12).

TABLA 1

| Estímulo                                       | VR3 A+B- (3,25-4 ng inyectados por oocito a menos que se especifique) | VR3 A-B- (1,5 ng inyectados por oocito) | VR3 A+B+ (5 ng inyectados por oocito) |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Capsaicina (1 $\mu\text{M}$ )                  | NE: n=3 (n=3 0,4 ng)                                                  | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| Eugenol (10 $\mu\text{M}$ )                    | NE: n=3 (n=3 0,4 ng)                                                  | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| Olvanil (10 $\mu\text{M}$ )                    | NE: n=3 (n=10,4 ng)                                                   | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| Resiniferatoxina (1 $\mu\text{M}$ )            | NE: n=3 (n=1 0,4 ng)                                                  | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| Piperina (10 $\mu\text{M}$ )                   | NE: n=3 (n=1 0,4 ng)                                                  | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| Gingerol (10 $\mu\text{M}$ )                   | NE: n=3 (n=1 0,4 ng)                                                  | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| Guiaicol (10 $\mu\text{M}$ )                   | NE: n=3 (n=1 0,4 ng)                                                  | NE: n=3                                 | NE: n=3                               |
| $\beta$ -feniletilamina (100 $\mu\text{M}$ )   | NE: n=2                                                               | NT                                      | NT                                    |
| $\gamma$ -hidroxibutirato (100 $\mu\text{M}$ ) | NE: n=2                                                               | NT                                      | NT                                    |
| Anandamida (1,15 $\mu\text{M}$ ; RBI)          | NE: n=3 (0,4 ng inyectados)                                           | NE: n=1                                 | NT                                    |
| Acido araquidónico (10 $\mu\text{M}$ )         | NT                                                                    | NE: n=3                                 | NT                                    |
| pH 4,5- 5,5                                    | NE: n=2 (4 ng ARNC); n=1 (0,4 ng ARNC)                                | NE: n=1                                 | NE: n=1                               |
| Despolarización                                | Sin diferencia con el control (n=4)                                   | Sin diferencia con el control (n=6)     | Sin diferencia con el control (n=3)   |
| Hiperpolarización                              | Sin diferencia con el control (n=4)                                   | Sin diferencia con el control (n=6)     | Sin diferencia con el control (n=3)   |
| NE: sin efecto; NT: no sometido a ensayo       |                                                                       |                                         |                                       |

*Viabilidad*

Se muestra la expresión funcional de las isoformas VR3 humanas en oocitos de *Xenopus*: la viabilidad de los oocitos mantenidos en ND-96 que contenía  $2 \text{ Ca}^{2+}$  disminuía significativamente 4-6 días después de la inyección con ARNc de VR3 A+B- (3,25 ng) y de VR3 A+B+ (5 ng) pero no de VR3 A-B- (1,5 ng). Los datos para los oocitos a los que se había inyectado VR3 A+B- y de control inyectados con agua fueron similares en 5 experimentos separados y combinados. Los oocitos muertos se determinaron visualmente utilizando un microscopio de disección Bauch and Lomb. Los datos se analizaron utilizando el análisis de la Chi cuadrado. Los oocitos a los que se había inyectado VR3 A+B- fueron los menos viables: solamente aproximadamente un 9% de los oocitos sobrevivieron a los 4-6 días de la inyección. Aproximadamente un 33% de los oocitos a los que se había inyectado VR3 A+B+ humano sobrevivieron a los 4-6 días de la inyección. Aproximadamente un 67% de los oocitos de control a los que se había inyectado agua sobrevivieron el mismo período de tiempo en condiciones esencialmente idénticas. Los oocitos a los que se había inyectado VR3 A-B- revelaron una viabilidad similar a la de los controles a los que se había inyectado agua. Se obtuvieron datos similares de 2 lotes separados de ARNc.

*Sensibilidad al calor*

Se muestra la expresión funcional de las isoformas de VR3 humano en oocitos de *Xenopus*: activación por calor. a). Se muestra la corriente pico principal lograda por una transición de calor desde  $25^{\circ}\text{C}$  a  $46^{\circ}\text{C}$  y mantenida a  $46^{\circ}\text{C}$  durante al menos 15 seg. Las transiciones de voltaje se aplicaron desde -120 a +80 mV a lo largo de 400 mseg a una tasa de muestreo de 2 seg. La corriente mostrada fue el incremento en la corriente a lo largo y por encima de la corriente inicial lograda a +80 mV (el punto más a la derecha de la curva de voltaje de corriente mostrada en (b)). Se inyectaron a los oocitos 3,25, 1,5 y 5 ng de ARNc de VR3 A+B-, A-B-, y A+B+, respectivamente, y se registró hasta 6 días más tarde. Barra sólida: controles a los que se había inyectado agua (n=8); barra transparente: isoforma VR3 A+B- (n = 11); barra rayada: isoforma VR3 A-B- (n = 8); barra punteada: isoforma VR3 A+B+ (n=5). Todas las isoformas mostraron un incremento significativo sobre los controles con agua ( $p = 0,001, 0,03$  y  $0,007$ , respectivamente). La respuesta inducida por calor fue aproximadamente 2-veces mayor en la isoforma A+B- en comparación con las otras dos isoformas, pero las diferencias no fueron significativas ( $p = 0,051$  y  $p = 0,16$ , para A+B- en comparación con A-B- y A+B+, respectivamente). Los datos se obtuvieron a partir de 2 grupos de oocitos inyectados. Los datos mostrados son la media y el error estándar de la media. (b). Las corrientes inducidas por la transición de voltaje fueron registradas durante la aplicación de calor creciente a oocitos a los que se había inyectado agua (arriba), VR3 A+B- (segundo por arriba), VR3 A-B- ( $3^{\circ}$  por arriba), y VR3A+B+ (abajo). Los oocitos fueron perfundidos constantemente con  $\text{Ca}^{2+}$  ND-96 y la solución fue calentada por medio de un dispositivo calentador interno en línea (TC-324B junto con el calentador en línea SH-27A; Warner Instrument Corp.). Se presentan corrientes inducidas por la transición (en microAmperios, como se indica en el eje de la y) obtenidas a temperaturas de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $46^{\circ}\text{C}$ ; solamente las trazas de corriente a las temperaturas más altas están marcadas con la correspondiente temperatura.

*Corrientes inducidas por perfusión ( $I_{\text{perfusión}}$ : Figura 11)*

El comienzo de la perfusión en baño logró un aumento de la conductancia de la membrana en oocitos que a los que se había inyectado ARN transcrito de VR1 humano clonado con y sin ARN transcrito de ADNc de receptor VR3A+B- como se muestra en la Figura 11. Un oocito al que se había inyectado ARNc de VR1 (a) fue sensibilizado con transiciones de voltaje entre -120 y +80 mV a lo largo de 400 mseg. Las corrientes inducidas por transición se aumentaron después del comienzo de la perfusión del oocito a una tasa de 10 ml/min. Las corrientes inducidas por la transición de control de oocitos en solución salina extracelular (C) se registraron antes del comienzo de la perfusión en baño de  $\text{Ca}^{2+}$  ND-96. Durante la perfusión, las corrientes inducidas por la transición aumentaron, indicando un incremento en la conductancia (P). La posterior perfusión de rojo de rutenio (RR)  $10 \mu\text{M}$  no bloqueó la corriente inducida por perfusión (P) en los oocitos que expresaban VR1. De este modo, la corriente inducida por perfusión observada en oocitos que expresan VR1 solo era insensible al rojo de rutenio (RR)  $10 \mu\text{M}$  (A, "RR"). No obstante, la corriente inducida por perfusión lograda en oocitos que expresaban VR3A+B- y VR1 resultó espectacularmente inhibida por el rojo de rutenio  $10 \mu\text{M}$  (B, "RR"). Esta diferencia se observó en 6 oocitos. El bloque era parcialmente reversible (no mostrado). (b). Un oocito al que se había inyectado ARNc de VR1 junto con VR3 A+B- fue sensibilizado con transiciones de voltaje entre -120 y +80 mV a lo largo de 400 mseg. Las corrientes inducidas por la transición aumentaron después del comienzo de la perfusión del oocito a una tasa de 10 ml/min. Las corrientes activadas por perfusión tenían magnitudes similares en ambos grupos de oocitos. Vrev para la corriente inhibida por RR fue de aproximadamente -13 mV (flecha). Las corrientes inducidas por ambos agonistas fueron fuertemente rectificadoras aparentemente, como se ha informado previamente para VR1 de rata (Caterina *et al.*, 1997).

*Corrientes inducidas por capsaicina en oocitos que expresan VR1 humano en presencia o ausencia de VR3 A+B- humano (Figura 12)*

Se midieron las corrientes logradas por capsaicina  $1 \mu\text{M}$  (Figura 12) a un voltaje de mantenimiento de +50 mV puesto que las respuestas fueron las más grandes a este voltaje debido a una profunda rectificación aparente de las corrientes inducidas por capsaicina (Caterina *et al.*, 1997). Se muestran 3 ejemplos de oocitos a los que se ha inyectado VR1 y agua (un control para la inyección con VR3) (a) y oocitos a los que se ha inyectado ARNc de VR1 y ARNc de VR3 A+B- (b). La capsaicina se aplicó como baño durante el tiempo indicado por la barra sólida horizontal. La magnitud de la respuesta primaria a capsaicina  $1 \mu\text{M}$  se disminuyó cuando se expresaba simultáneamente con ARNc

## ES 2 300 318 T3

de VR3 A+B- a razones iguales (2,9 ng cada uno). La diferencia mas notable fue la magnitud y la tasa de decaimiento de la respuesta secundaria, el segundo máximo que se obtenía normalmente al principio del lavado de capsaicina.

### Ejemplo 6

#### Caracterización de VR3 humano en líneas celulares de mamífero

Se transfectan células HEK293, CHO-K1 y COS-7 humanas con las isoformas de VR3 humano pVR3A+B-R, pVR3A-B-R, o pVR3A+B+R. Se realizan transfecciones transitorias de 1  $\mu$ g de pVR3R por 10<sup>6</sup> células por placa de 100 mm utilizando el kit de transfección Effectene (Quiagen; 301425). Tres días después de la transfección, las células se cultivan en placa sobre placas de 96 pocillos (Biocoat, placa negra/transparente cubierta con poli-D-lisina; Becton Dickinson parte núm. 354640). Al cabo de 1 día, los pocillos se enjuagan con F12/DMEM, después se incuban en Fluo-4 (2  $\mu$ M) con Pluronic F-127 (20%, 40  $\mu$ l utilizados en un volumen total de 20 ml) durante 1 hora a la temperatura ambiente. Las placas se analizan utilizando FLIPR (Molecular Devices, FL-101). Las células se sensibilizan con soluciones de diferente osmolaridad (40  $\mu$ l añadidos a 80  $\mu$ l a una velocidad de 50  $\mu$ l/seg). Algunos pocillos se mezclan vigorosamente para simular el incremento de perfusión de las células con solución extracelular. Las transfecciones con vector solo se utilizan como controles.

Al cabo de 3 días las células se seleccionan en presencia de neomicina (200  $\mu$ g/ml) y se hacen crecer a través de tres pases de dilución 1:10 durante aproximadamente dos semanas. Las colonias individuales se seleccionan y se hacen crecer en placas de 6 pocillos. Después las células se cultivan en placa sobre placas de 96 pocillos (Biocoat, placa negra/transparente recubierta con poli-D-lisina; Becton Dickinson parte núm. 354640) y se hacen crecer hasta la confluencia durante tres días. Los pocillos se enjuagan con F12/DMEM, después se incuban en Fluo-4 (2  $\mu$ M) con ácido Pluronic (20%, 40  $\mu$ l utilizados en un volumen total de 20 ml) durante 1 hora a la temperatura ambiente. Las placas se analizan utilizando FLIPR (Molecular Devices, FL-101). Las células se sensibilizan con agonistas (a una concentración de 3 veces en 40  $\mu$ l añadidos a 80  $\mu$ l a una velocidad de 50  $\mu$ l/seg).

Se utiliza la técnica del pinzamiento zonal de células completas (Hamill *et al.*, 1981) para registrar las corrientes inducidas por el ligando de HEK293 que expresa establemente el receptor VR1 humano mantenido durante >2 días en cubres de 12 mm. Las células se visualizan utilizando Nikon Diaphot 300 con óptica DIC Nomarski. Las células se perfunden continuamente en solución salina fisiológica (~0,5 ml/min) a menos que se indique de otro modo. La solución salina fisiológica normalizada ("Tyrodes") contiene: NaCl 130 mM, KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, y hemi-Na-HEPES 10 mM (pH 7,3, 295-300 mOsm medido utilizando una presión de vapor Wescor 5500 (Wescor, Inc., Logan, UT). Los electrodos de registro están hechos de tubos capilares de borosilicato (R6; Garner Glass, Claremont, CA), las puntas están recubiertas con cera dental periférica (Miles Laboratories, South Bend, IN), y tienen resistencias de 1-2 M $\Omega$  cuando contienen solución salina intracelular: K-gluconato 100 mM, KCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,483 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, hemi-Na-HEPES 10 mM y K<sub>4</sub>-BAPTA 1 mM (100 nM libre de Ca<sup>2+</sup>); pH 7,4, con dextrosa añadida para lograr 290 mOsm). Los potenciales de contacto entre los dos electrolitos son de -18 mV utilizando una pipeta normalizada y soluciones de baño determinadas empíricamente y utilizando el programa de ordenador JPCalc ((Barry, 1994)). Todos los voltajes mostrados están corregidos para el potencial de contacto entre los electrolitos. Las señales de corriente y voltaje se detectan y se filtran a 2 kHz con un amplificador de pinzamiento zonal Axopatch 1D (Axon Instruments, Foster City, CA), registrado digitalmente con un interfaz de laboratorio DigiData 1200B (Axon Instruments), y un sistema de ordenador compatible con PC y se almacenan en un disco magnético para el análisis autónomo. Los datos de adquisición y el análisis se realizan con el soporte lógico PClamp. Los cambios lentos en la corriente de mantenimiento se detectan y se filtran a 2 kHz, y se registran con un amplificador LPF202A DC (Warner, Hamden, CT) y un aparato de registro digital VR10B (Instrutech, Great Neck, NY) en una cinta de vídeo. La señal se analiza más tarde a 10 Hz utilizando el soporte lógico Axotape.

Se determina la capacitancia de membrana total (C<sub>m</sub>) como la diferencia entre la corriente máxima después de una transición de voltaje hiperpolarizante de 30 mM de -68 mV generada a una velocidad de 10 mV/ms y la corriente en estado estacionario al potencial final (-98 mV) (Dubin *et al.*, 1999).

Los potenciales inversos aparentes (V<sub>rev</sub>) de los cambios de conductancia inducidos por el ligando se determinan utilizando un protocolo de transición de voltaje (Dubin *et al.*, 1999). Las transiciones de voltaje se aplican cada segundo y se registran las corrientes inducidas por la transición en la célula completa resultante. Normalmente el voltaje se hizo pasar de valores negativos a positivos a negativos. La corriente requerida para el pinzamiento de las células a -68 mV se controla continuamente. Las conductancias inducidas por ligando se determinan a partir de corrientes en células completas logradas mediante un protocolo de transición de voltaje en presencia y ausencia de ligando. Las corrientes inducidas por transiciones de voltaje medidas antes (control) y en presencia de ligando se comparan para revelar el efecto del ligando sobre el canal para modular la salida de corriente del canal. Se determina el voltaje al cual no hay corriente inducida por el ligando neta (V<sub>rev</sub>).

### Ejemplo 7

#### Estructura primaria de la Proteína receptora VR3 humana

La presente invención describe 3 isoformas de hVR3: A+B-, A-B-, y A+B+. La secuencia de nucleótidos de los ADNc del receptor VR3 humano reveló un único marco de lectura abierto grande de aproximadamente 2616, 2436 y

2229 pares de bases que codifican 871, 811, y 742 aminoácidos para VR3 A+B-, A-B- y A+B+ humano, respectivamente. El ADNc para VR3 A+B- tiene extensiones no traducidas 5' y 3' de aproximadamente 337 y aproximadamente 547 nucleótidos. El ADNc para VR3 A+B+ tiene extensiones 5' y 3'-no traducidas de aproximadamente 836 y aproximadamente 994 nucleótidos. La primera metionina en marco se designó codón de iniciación para un marco de lectura  
abierto que pronostica las proteínas receptoras VR3 humanas con una masa molecular ( $M_r$ ) de aproximadamente  
98.242 Da, 91.294 Da y 83.310 Da para las isoformas A+B-, A-B- y A+B+, respectivamente. La isoforma A+B- codi-  
fica una proteína de 871 aminoácidos. El VR3 A-B- contiene una delección de 60 aminoácidos desde el aminoácido 382  
al 441 de VR3A+B-. VR3 A+B+ es idéntico a A+B- hasta el aminoácido 736 después de lo cual hay 6 aminoácidos  
divergentes y un codón de parada. La isoforma A+B+ de VR3 se extiende 20 aminoácidos después del supuesto TM6.

Las proteínas receptoras VR3 humanas pronosticadas se alinaron con las bases de datos de nucleótidos y proteí-  
nas y se encontró que estaban relacionadas con la familia de receptores vainilloides (VR1 y VR2). Existen numerosos  
motivos conservados en esta familia de receptores incluyendo un supuesto gran segmento hidrófilo N-terminal (aproxi-  
madamente 467 aminoácidos), tres supuestos dominios de repetición de anquirina en la región N-terminal. 6 regiones  
transmembrana pronosticadas y una región del poro. VR3 A+B- es idéntico en un 43% al VR1 humano, idéntico en  
un 39% a VRL-1 humano (AF129112) y a VRL humano VRL (AF103906). De este modo el receptor VR3 descrito  
en la presente memoria es claramente un gen novedoso de la familia del receptor vainilloide.

Las formas VR3A+B- y VR3A-B- son muy similares al canal inhibido por el estiramiento SIC de rata [acceso  
genbank AB015231] desde el aminoácido 694 hasta el final. Se piensa que el SIC, codificado por 529 aminoácidos,  
forma un canal iónico inhibido por el estiramiento. Carece de dominio citoplásmico N-terminal grande de la familia  
VR pero contiene una secuencia homóloga al exón A antes del supuesto TM1.

La secuencia genómica completa de las regiones que codifican VR3 descrita en la presente memoria parece en-  
contrarse en un envío de secuencias a bases de datos de secuencia de 380512 pares de bases a genbank (*homo sapiens*  
clon RPC11-7G5 (AC007834), envío de secuencias directo por Worley, K.C.). Esta entrada de genbank enumera mu-  
chos fragmentos de la secuencia de ADN y una secuencia contigua propuesta, pero carece de cualquier análisis de  
la secuencia de ácido nucleico y no consigue caracterizar los rasgos de las secuencias de ácido nucleico de VR3, o  
describir la presencia del gen VR3.

1 La comparación de las secuencias de la presente invención y la secuencia genómica revela que el gen VR3  
está compuesto por al menos 15 exones. "A" es un inserto de 60 aminoácidos en el supuesto dominio  
citoplásmico N-terminal que se encuentra en los ADNc obtenidos de genotecas de ADNc de pituitaria y  
próstata. Existen secuencias limítrofes intrón/exón en los insertos A y B.

Las isoformas A+B- y A+B+ contienen un dominio en la supuesta región citoplásmica N-terminal con homología  
con las secuencias consenso del dominio de repetición de la anquirina. De este modo, las isoformas A+ de VR3  
parecen tener una arquitectura similar a la pronosticada para VR1. El primer dominio era significativamente similar a  
la secuencia consenso ( $E=2,6 \times 10^{-5}$ ). Los 2 dominios siguientes no tienen trascendencia tomados por sí mismos ( $E=37$   
y  $E=2,7$ ) no obstante tomados en conjunto, es probable que esta región contenga 3 dominios de unión a anquirina. La  
isoforma A- pierde 20 aminoácidos del supuesto 3<sup>er</sup> dominio de repetición de anquirina y la secuencia yuxtapuesta no  
se ajusta a un dominio de repetición de anquirina.

La isoforma A+B- de VR3 tiene dos sitios de miristoilación potenciales: [GPGGE] en el extremo N y entre TM4 y  
TM5. Los supuestos sitios de fosforilación incluyen: 7 sitios de fosforilación PKC potencial: T112, S134, T175, T190,  
T380, S403, S688 [sin embargo, S688 está en una supuesta región extracelular]; 1 sitio de fosforilación PKA y PKG  
potencial: T181; 12 sitios de fosforilación caseína quinasa II potencial: T89, S162, T181, T395, S416, S422, S432,  
T426, S432, S441, T740, S836; 3 sitios de fosforilación caseína quinasa de la glándula mamaria potencial (SxE):  
S4, S726, S758; 1 sitio de fosforilación tirosina quinasa potencial: Y411 [presente en el inserto "A"]; y 1 sitio de  
glicosilación unido a N potencial: N651, [N201, N207 están en el supuesto dominio N-terminal intracelular y es poco  
probable que sea glicosilado]. No hay supuestos dominios de unión CaM en ninguna de las isoformas descritas en la  
presente invención.

En la isoforma A- que carece del inserto "A", faltan 2 sitios de fosforilación PKC, 6 sitios de fosforilación caseína  
quinasa II, y el único supuesto sitio de fosforilación tirosina quinasa.

La isoforma A+B+ codifica una supuesta proteína que carece de 2 sitios de fosforilación caseína quinasa II en la  
supuesta región intracelular C-terminal.

## Ejemplo 8

### *Expresión de VR3 en tejidos humanos*

Expresión utilizando una matriz de ADN (Luo *et al.*, 1999). El análisis de distribución de la matriz de ADN indica  
que los ARNm de VR3 humano eran expresados en una variedad de tejidos, y había cierto solapamiento de expresión  
con VR1 a nivel del tejido completo [Figura 13]. El ARNc del tipo de tejido indicado en la columna de la izquierda  
contenía secuencias que codificaban el VR3 humano (columna del centro). La expresión de VR1 humano se muestra  
en la columna de la derecha y en la mayoría de los casos se solapaba con la expresión de VR3. OBSERVESE: NS era

## ES 2 300 318 T3

la expresión no significativa de VR1 humano. La secuencia del ADN de VR3 humano inmovilizado en la matriz de ADN era (SEQ ID NO:17)

```
5      CCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTCCTGAGGAAGGCCTTC
      CGCTCTGGGGAGATGGTCAACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCACTCCTGACC
      GCAGTGGTGCTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAAC
10     TTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATG
      G CTTCTCGCATACCGTGGGCGGCC
```

15 Esta secuencia de ADN no está presente en la isoforma A+B+, solamente en las isoformas A+B- y A-B-. Obsérvese que la especie de ADNc fue clonada a partir de glándula de próstata (\*; Figura 13).

El análisis de transferencia Northern reveló la expresión de VR3 en cerebro completo, placenta, pulmón, riñón, páncreas y próstata.

### 20 Ejemplo 9

#### *Clonación del ADNc del receptor VR3 humano en vectores de expresión de E. coli*

25 El receptor VR3 humano recombinante es producido en *E. coli* después de la transferencia de la casete de expresión del receptor VR3 humano a vectores de expresión de *E. coli*, incluyendo pero no limitados a, la serie pET (Novagen). Los vectores pET colocan la expresión del receptor VR3 humano bajo el control del promotor del bacteriófago T7 estrechamente regulado. Después de la transferencia de este constructo a un anfitrión de *E. coli* que contiene una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa de T7 conducida por el promotor inducible lac, se induce la expresión del receptor VR3 humano cuando se añade un sustrato de lac apropiado (IPTG) al cultivo. Los niveles del receptor VR3 humano se determinan por medio e los análisis descritos en la presente memoria.

30 El ADNc que codifica el marco de lectura abierto completo para el receptor VR3 humano se inserta en el sitio NdeI de pET [16]11a. Los constructos en la orientación positiva se identifican mediante análisis de la secuencia y se utilizan para transformar la cepa del anfitrión de expresión BL21. Después se utilizan los transformantes para inocular los cultivos para la producción de la proteína receptora VR3 humana. Los cultivos se pueden hacer crecer en medio M9 o ZB, cuya formulación es conocida por los expertos en la técnica. Después de crecer a una DO<sub>600</sub> = 1,5, se induce la expresión del receptor VR3 humano con IPTG 1 mM durante 3 horas a 37°C.

### 40 Ejemplo 10

#### *Clonación del ADNc del receptor VR3 humano en un Vector de Expresión de Baculovirus para la Expresión en Células de Insecto*

45 Se diseñan vectores de Baculovirus, que derivan del genoma del virus AcNPV, para proporcionar un elevado nivel de expresión de ADNc en la línea Sf9 de células de insecto (ATCC CRL núm. 1711). Los baculovirus recombinantes que expresan el ADNc del receptor VR3 humano se producen mediante los siguientes métodos normalizados (In Vitrogen Maxbac Manual):

50 se ligan los constructos de ADNc del receptor VR3 humano en el gen de la polihedrina en una variedad de vectores de transferencia de baculovirus, incluyendo el vector pAC360 y BlueBac (In Vitrogen). Se generan baculovirus recombinantes mediante recombinación homóloga después de la co-transfección del vector de transferencia de baculovirus y

55 se linealiza el ADN genómico de AcNPV [Kitts, P.A., Nuc. Acid. Res. 18: 5667 (1990)] en células Sf9. Los virus pAC360 recombinantes se identifican mediante la ausencia de cuerpos de inclusión en las células infectadas y se identifican los virus pBlueBac recombinantes basándose en la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa (Summers, M. D. y Smith, G. E., Texas Agriculture Exp. Station Bulletin No. 1555). Tras la purificación en placa, se mide la expresión del receptor VR3 humano mediante análisis descritos en la presente memoria.

60 El ADNc que codifica el marco de lectura abierto completo para el receptor VR3 humano se inserta en el sitio BamHI de pBlueBacII. Se identifican los constructos en orientación positiva mediante análisis de la secuencia y se utilizan para transfectar células Sf9 en presencia de ADN de tipo salvaje de AcNPV lineal.

65 El receptor VR3 humano activo, auténtico se encuentra en el citoplasma de las células infectadas. El receptor VR3 humano activo se extrae de las células infectadas mediante lisis con hipotónica o con detergente.

## Ejemplo 11

*Clonación del ADNc del receptor VR3 humano en un vector de expresión de levadura*

5 El receptor VR3 humano recombinante es producido en la levadura *S. cerevisiae* después de la inserción del cistron de ADNc del receptor VR3 humano óptimo en vectores de expresión diseñados para dirigir la expresión intracelular o extracelular de proteínas heterólogas. En el caso de la expresión intracelular, los vectores tales como EmBLyex4 o similar se ligan al cistron del receptor VR3 humano [Rinas. U. *et al.*, Biotechnology 8: 543-545 (1990); Horowitz B. *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 4189-4192 (1989)]. Para la expresión extracelular, el cistron del receptor VR3 humano se  
 10 liga en los vectores de expresión de levadura que fusionan una señal de secreción (un péptido de levadura o mamífero) al extremo NH<sub>2</sub> de la proteína receptora VR3 humana [Jacobson, M. A., Gene 85: 511-516 (1989); Riett L. y Bellon N. Biochem. 28: 2941-2949 (1989)].

Estos vectores incluyen, pero no están limitados a pAVE1>6, que fusiona la señal de la seralbúmina humana al  
 15 ADNc expresado [Steep O. Biotechnology 8: 42-46 (1990)], y el vector pL8PL que fusiona la señal de la lisozima humana al ADNc expresado [Yamamoto. Y., Biochem. 28: 2728-2732)]. Además, el receptor VR3 humano es expresado en levadura como una proteína de fusión conjugada con ubiquitina utilizando el vector pVEP [Ecker, D. J., J. Biol. Chem. 264: 7715-7719 (1989), Sabin, E. A., Biotechnology 7: 705-709 (1989). McDonnell D. P., Mol. Cell Biol. 9: 5517-5523 (1989)]. Los niveles de receptor VR3 humano expresado se determinan mediante los análisis descritos en  
 20 la presente memoria.

## Ejemplo 12

*Purificación del Receptor VR3 humano recombinante*

El receptor VR3 humano producido recombinantemente se puede purificar mediante cromatografía de afinidad.

Se elaboran columnas de afinidad con anticuerpo para el receptor VR3 humano añadiendo los anticuerpos anti-  
 30 receptor VR3 humano a Affigel-10 (Bio-Rad), un soporte en gel que es pre-activado con ésteres de N-hidroxisuccinimida de manera que los anticuerpos forman enlaces covalentes con el soporte de cuentas de gel de agarosa. Los anticuerpos se acoplan después al gel por medio de enlaces amida con el brazo espaciador. Los ésteres activados restantes se sofocan después con etanolamina-HCl 1M (pH 8). La columna se lava con agua seguido de glicina-HCl 0,23 M (pH 2,6) para separar cualquier anticuerpo o proteína extraña no conjugados. La columna se equilibra después en  
 35 solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3) junto con agentes de solubilización de membrana apropiados tales como detergentes y el sobrenadante del cultivo celular o el extracto celular que contiene el receptor VR3 humano solubilizado se hace pasar a través de la columna. La columna se lava después con solución salina tamponada con fosfato junto con detergentes hasta que la densidad óptica (A280) cae hasta el fondo, después la proteína se hace eluir con glicina-HCl 0,23 M (pH 2,6) junto con los detergentes. La proteína receptora VR3 humana purificada se somete a  
 40 diálisis después frente a solución salina tamponada con fosfato.

## Referencias

45 **Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S. J., y Yeats, J. C. (1992).** Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neuron excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107, 544-52.

**Bevan, S., y Szolcsanyi, J. (1990).** Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 330-3.

50 **Blackstone, C., y Sheng, M. (1999).** Protein targeting and calcium signaling microdomains in neuronal cells. *Cell Calcium* 26, 181-192.

**Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., y Julius, D. (1999).** A capsaicin-receptor homolog with a high threshold for noxious heat. *Nature* (London) 398, 436-441.

**Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., y Julius, D. (1997).** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* (London) 389, 816-824.

60 **Fraser, S. P., Moon, C., y Djamgoz, M. B. A. (1993).** Electrophysiology of *Xenopus* oocytes: An expression system in molecular neurobiology., D. Wallis, ed. (Oxford, UK: IRL).

**Gupta, P. D., y Pushkala, K. (1999).** Importance of the role of calcium in programmed cell death: a review. *Cytobios* 99, 83-95.

65 **Lu, M., y Wong, F. (1987).** A DNA deletion associated with multiple impaired transcripts in the visual mutant *trp*. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 28, 2092-5.

**Luo, L., Salunga, R. C., Guo, H., Bitner, A., Joy, K. C., Galindo, J. E., Xiao, H., Rogers, K. E., Wan, J. S., Jackson, M. R., y Erlyer, M. G. (1999).** Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat. Med.* (N. Y.) 5, 117-121.

**Minke, B., y Selinger, Z. (1996).** The roles of trp y calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *In Curr. Opin. Neurobiol.*, pp. 459-466.

**Oh, U., Hwang, S. W., y Kim, D. (1996).** Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 16, 1659-67.

**Suzuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Ooki, G., y Imai, M. (1999).** Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J. Biol. Chem.* 274, 6330-6335.

**Szallasi, A. (1995).** Autoradiographic visualization y pharmacological characterization of vainilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. *Acta Physiol. Scy.*, Suppl. 155, 1-68.

**Szolcsanyi, J. (1993).** Actions of capsaicin on sensory receptors. In *Capsaicin Study Pain*, J. N. Wood, ed.: Academic, London, UK), pp. 1-26.

**Szolcsanyi, J. (1996).** Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog. Brain Res.* 113, 343-359.

**Szolcsanyi, J., Szallasi, A., Szallasi, Z., Joo, F., y Blumberg, P. M. (1991).** Resiniferatoxin. An ultrapotent neurotoxin of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 632, 473-5.

**Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B., Basbaum, A. I., y Julius, D. (1998).** The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.

**van Haasteren, G., Li, S., Muda, M., Susini, S., y Schlegel, W. (1999).** Calcium signalling and gene expression. In *J. Recept. Signal Transduction Res.*, pp. 481-492.

**Wall, P. D., y Melzack, R. (1994).** Textbook of Pain (New York: Churchill Livingstone).

**Wood, J. N., Winter, J., James, I. F., Rang, H. P., Yeats, J., y Bevan, S. (1988).** Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 8, 3208-20.

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO:7 o 9.

5 2. Una proteína aislada como se define en la reivindicación 1, donde la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO:7.

10 3. Una proteína aislada como se define en la reivindicación 1, donde la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO:9.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

SEQ ID NO:5 Secuencia de nucleótidos de VR3A+B- Humano de la secuencia codificadora (2616 pb)

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGCGGGGCGGGGAGGTGGCTGAG  
CTCCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCTCTCTCTC  
CCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTCGCCCTCACCGGCTG  
ATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAA  
GTTCCAGGGCGCCTTCGCGAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAG  
TCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGG  
ACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAG  
GTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAGCCGAGAGCCCCAAAGCCCCTGC  
CCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACA  
TCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATTCTTGCTG  
ACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGA  
AGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACAC  
CATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGGGAGTTC  
ATTAACCTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACAT  
CGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCCAGGGA  
GCTGATGTCCACGCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGG  
GGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGGCTGCCTGCACCAAC  
CAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACA  
TGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCAT  
TGCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTTACCAAGATGTACGACCTG  
CTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCT  
CAACAACGACGGCCTCTCGCCCCCTCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATT  
GGGATCTTTACGACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGC  
ACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGATTCTCTCGCTT  
TATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGA  
TCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGA  
GCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCC  
TTCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACC  
GCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCCACGG  
TGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCTG  
TTCTTCATACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGA  
ATTCTCTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCC  
TGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGC  
CGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCC  
GTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTT

## ES 2 300 318 T3

CAAGGACCTTTTCCGATTCCCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGC  
TTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATG  
AGGACCAGACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGA  
GACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCG  
ACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCT  
GGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCC  
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGA  
AGCTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTATTC  
CTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGG  
ACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTC  
TCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGA  
GACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCCTCCGCAGGGATC  
GCTGGTCCTCGGTGGTACCCCGCGTGGTGGAAGTGAACAAGAACTCGAACCC  
GGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCGCTGCGATGGC  
CACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGACTGATGACGCCCCGCTCTAG

FIGURA 2

SEQ ID NO: 6. Se muestra la secuencia de nucleótidos de VR3A+B- incluyendo 337 pb 5' UT y 547 pb 3' UT

CAATTGGGATTAAACCCAGGGACTATCCAGCCCCAAAGCCCTTCCCACCAC  
 ACCAGGTGGCCTGTCCTGGGGCCAGCTCTGCACACAGGGCCTGGTGCCCCCG  
 GGGTGCTTGGGAAGTGGCAGGGCAGAGGTGGGCCCTGTGGCTGTTCTGGCTC  
 AGCTTCTAAAACAAGAGCCTCTGCTGGGGGCAGAGGGGCCGTGAACCCCTGA  
 AATGTTAGGCAGATACCCTGTGGGAGCTTTGTTCTGGGATGCTAAGAACC GC  
 TTGAGGATTTAAGCTTTGCCACTTTGGCTCCGGAGCAAGGGCAGAGGCTGAG  
 CAGTGCAGACGGGCCTGGGGCAGGCATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCCCCG  
 CGCGGGGGCCCCGGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCC  
 AGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGG  
 ATGGCTCCCTTTCGCCCTCACCGGCTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGC  
 GATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTCCAGGGCGCCTTCCGCAAGGGGG  
 TGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGGTG  
 CCTGGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATC  
 GTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAAGC  
 AGCCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCCCATCCTCAAAGT  
 CTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGGCTCCACTGCTGACC  
 TGGACGGGCTGCTCCCATCTTTGCTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGA  
 GGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGAAGACCTGCCTGCCAAGGCCTTGCTG  
 AACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGG  
 AGCGCACCGGCAACATGCGGGAGTTCAATTAACCTCGCCCTTCCGTGACATCTA  
 CTATCGAGGTGAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACAC  
 TACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCAGGGAGCTGATGTCCACGCCACGGCCCGTG  
 GGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCT  
 GCCCCTGTGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTGA  
 CGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACATGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCA  
 ACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATTGCTGACAACACCCGTGAGAACAC  
 CAAGTTTGTTACCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCT  
 TCCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCCT  
 CATGATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTTCAGCACATCATCCGG  
 CGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGAC  
 TGGGCCTATGGGCCAGTGTATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACAC  
 GTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATT  
 GAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCAATGAAGTGTGCGGG  
 ACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCCTAC  
 CTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACCGCCTACTACCAGCCGCTGGAGGG  
 CACACCGCCGTACCCTTACCGCACACGGTGGACTACCTGCGGCTGGCTGGC

GAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCTGTCTTTCATCACCAACATCAAAGA  
 CTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATTCTCTCTTCATTGATGGCTCCT  
 TCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCCTGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCT  
 ACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTG  
 GGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCT  
 ATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTC  
 GTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAA  
 CCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACCAACTGCACAGTG  
 CCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGA  
 CCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACC  
 AAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCCTCACCTT  
 TGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAG  
 GTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCAACCACCATCC  
 TGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCGTAATCCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGG  
 GAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGT  
 GCTTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCAT  
 CATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCG  
 CATAACCGTGGGCGCCCTCCGCAGGGATCGCTGGTCTCGGTGGTACCCCGCG  
 TGGTGGAACCTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCCTCTGGA  
 CAGCATGGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAG  
 TGGAGGACTGATGACGCCCCGCTCTAGGGACTGCAGCCCAGCCCCAGCTTCT  
 CTGCCCCACTCATTTCTAGTCCAGCCGCATTTAGCAGTGCCTTCTGGGGTGTG  
 CCCCCACACCCTGCTTTGGCCCCAGAGGCGAGGGACCAGTGGAGGTGCCAGG  
 GAGGCCCCAGGACCCTGTGGTCCCCTGGCTCTGCCTCCCCACCCTGGGGTGG  
 GGGTCCCCGGCCACCTGTCTTGCTCCTATGGAGTCACATAAGCCAACGCCAG  
 AGCCCCCTCCACCTCAGGCCCCAGCCCCTGCCTCTCCATTATTTATTTGCTCTGC  
 TCTCAGGAAGCGACGTGACCCCTGCCCCAGCTGGAACCTGGCAGAGGCCTTA  
 GGACCCCGTTCCAAGTGCACTGCCCGGCCAAGCCCCAGCCTCAGCCTGCGCC  
 TGAGCTGCATGCGCCACCATTTTTGGCAGCGTGGCAGCTTTGCAAGGGGCTG  
 GGGCCCTCGGCGTGGGGCCATGCCTTCTGTGTGTTCTGTAGTGTCTGGGATTT  
 GCCGGTGTCTAATAAATGTTTATTCATTGACGGTGGAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 3

SEQ ID NO: 7. Secuencia codificadora para VR3A+B- humano  
(871 aminoácidos)

MADSSEGPRAGPGEVAELPGDESGTPGGEAFPLSSLANLFEGEDGSLSPSPADAS  
RPAGPGDGRPNLRMKFQGAFRKGVNPIDLLESTLYESSVVPGPKKAPMDSLFD  
YGTYRHHSSDNKRWRKKIIEKQPQSPKAPAPQPPILKVFNRPIFDIVSRGSTAD  
LDGLLPFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCLPKALLNLSNGRNDTIPVLLDIAERTG  
NMREFINSPFRDIYYRGQTALHIAIERRCKHYVELLVAQGADVHAQARGRFFQPK  
DEGGYFYFGEPLSLAACTNQPHIVNYLTENPHKKADMRRQDSRGNTVLHALV  
AIADNTRENTKFKVTKMYDLLLLKCARLFPDSNLEAVLNNDGLSPLMMAAKTGKI  
GIFQHIIRREVTDEDTRHLSRKFKDWAYGPPVYSSLYDLSSLDTCGEEASVLEILVY  
NSKIENRHEMLAVEPINELLRDKWRKFGAVSFYINVVSYLCAMVIFTLTAYYQPL  
EGTPPYPYRTTVDYLRRLAGEVITLFTGVLFITNIKDLFMKKCPGVNSLFIDGSFQL  
LYFIYSVLVIVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMI  
QKILFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQTNCTVPTYPSR  
DSETFSTFLDLFKLTIGMGDLEMLSSTKYPVVFILLVYIILTFVLLNMLIALMGE  
TVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSSDGTDRRWCF  
RYDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRRDRWSSVVPVVELNKN  
SNPDEVVPLDSMGNPRCDGHQQGYPRKWRTDDAPL

## FIGURA 4

SEQ ID NO: 8. Secuencia de nucleótidos de VR3A-B- humano de la secuencia codificadora (2436 pb)

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCCGCGGGGCCCCGGGAGGTGGCTGAGCTCCCCGGGGATGAGAGTGG  
CACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCTCTCTCTCTCCCTGGCCAATCTGTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTT  
CGCCCTCACC GGCTGATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTTC  
CAGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCCACCCTATATGAGTCTTCGGT  
GGTGCTGGGCCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTG  
ACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAGCCGAGAGCCCCAAGCCCCCTGCCCTCAGCCG  
CCCCCATCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCT  
GGACGGGCTGCTCCCATCTTGTGACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTA  
CGGGGAAGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCATCCTGTGTCTG  
CTGGACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGCGGGAGTTTATTAACTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCG  
AGGTGAGACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTCTGCTGCAAACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCAGG  
GAGCTGATGTCCACGCCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCTACTTT  
GGGGAGCTGCCCCGTGCTGCTGGCTGCCTGCACCAACAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCC  
CCACAAGAAGGCGGACATGCGGGGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGATGCGCTGGTGGCCATTG  
CTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTATCAAGATGTACGACCTGCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGC  
CTCTTCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTCAACAACGACGGCCTCTCGCCCTCATGATGGCTGCCAA  
GACGGGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCAATGAAGTGTGCGGGACAAGT  
GGCGCAAGTTTCGGGGCGGTCTCTTCTACATCAACGTGGTCTCTACCTGTGTGCCATGGTCACTTCACT  
CTCACCGCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCAACGCTGGACTACCTGCG  
GCTGGCTGGCGAGGTCAATTACGCTCTTCACTGGGGTCTGTTCTTTCATCACCAACATCAAAGACTTGTTC  
TGAAGAAATGCCCTGGAGTGAATCTCTCTTCACTTATGAGTGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCTACTCT  
GTCCTGGTGATCGTCTCAGCAGCCCTTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGC  
CCTGGTCTTGGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCAACCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCA  
TGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGTCTTTCATGATCGGCTAC  
GCTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACCAACTG  
CACAGTGCCCACTTACCCTCTGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCTCTCTGGACCTGTTTAAAGC  
TGACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTTCATCATCTGCTG  
GTGACCTACATCATCTCACCTTTGTGCTGCTCTCAACATGCTCATTGCCCTCATGGGCGAGACAGTGGG  
CCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATCTGGACATTGAGCGCT  
CCTTCCCCGTATTCTTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGC  
ACTCTGACCGCAGGTGGTGTCTCAGGGTGGATGAGGTGAACTGGTCTCACTGGAACCAAGAACTTGGGCAT  
CATCAACGAGGACCCGGGCAAGAATGAGACCTACCACTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCTCC  
GCAGGGATCGCTGGTCTCGGTGGTACCCCGCTGGTGGAACTGAACAAGAACTCGAACCCGGACGAGGTG  
GTGGTGCCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAG  
GACTGATGACGCCCCGCTCTAG

FIGURA 5

SEQ ID NO: 9. Secuencia codificadora de VR3A-B- humano  
(811 aminoácidos)

MADSSEGPRAGPGEVAELPGDESGTPGGEAFPLSSLANLFEGEDGSLSPSPADASRPAG  
PGDGRPNLRMKFQGAFRKGVPNPIDLLESTLYESSVVPKPKAPMDSLFDYGTyrRHSS  
DNKRWRKKIIEKQPQSPKAPAPQPPILKVFNRPILFDIVSRGSTADLDGLLPFLTHK  
KRLTDEEFREPSTGKTCLPKALLNLSNGRNDTIPVLLDIAERTGNMREFINSPFRDIYY  
RGOTALHIAIERRCKHYVELLVAQGADVHAQARGRFFQPKDEGGYFYFGELPLSLAACT  
NQPHIVNYLTENPHKKADMRRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFVTKMYDLLLLKCA  
RLFPSNLEAVLNNDGLSPLMMAAKTGKIENRHEMLAVEPINELLRDKWRKFGAVSFYI  
NVVSYLCAMVIFTLTAYYQPLEGTPPYPYRTTVDYLRRLAGEVITLFTGVLFITNIKDL  
FMKKCPGVNSLFIDGSFQLLYFIYSVLVIVSAALYLAGIEAYLAVMVFALVLGWMNALY  
FTRGLKLTGTYSIMIQILFKDLFRFLLVYLLFMIGYASALVSLNPCANMKVCNEDQT  
NCTVPTYPSCRDSETFSTFLDLFKLTIGMGDLEMLSSTKYPVVFILLVTYIILTFVL  
LLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLRKAFRSGEMVTVGKSS  
DGTTPDRRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYYGFSHTVGRLRRDRWSSVVP  
RVVELNKN SNPDEVVVPLDSMGNPRCDGHQQGYPRKWRTDDAPL

FIGURA 6

SEQ ID NO: 10. Secuencia de nucleótidos de VR3A+B+ humano de la secuencia codificadora (2229 pb).

ATGGCGGATTCCAGCGAAGGCCCGCGCGGGGCCGGGGAGGTGGCTGAG  
CTCCCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTCTCTCTCCTC  
CCTGGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTTGCCCCACCGGCTG  
ATGCCAGTCGCCCTGCTGGCCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAA  
GTTCCAGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAG  
TCCACCCTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCCAAGAAAGCACCCATGG  
ACTCACTGTTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAG  
GTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAGCCGCAGAGCCCCAAAGCCCTGC  
CCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACA  
TCGTGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATTCTTGCTG  
ACCCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGA  
AGACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACAC  
CATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGAGGGAGTTC  
ATTAACTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACAT  
CGCCATTGAGCGTCGCTGCAAACACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCCAGGGA  
GCTGATGTCCACGCCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGG  
GGGGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGGCTGCCTGCACCAAC  
CAGCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACA  
TGCGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCAT  
TGCTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTTACCAAGATGTACGACCTG  
CTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCT  
CAACAACGACGGCCTCTCGCCCTCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATT  
GGGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGC  
ACCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGTATTCCTCGCTT  
TATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGA  
TCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGA  
GCCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCC  
TTCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACC  
GCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCAACGG  
TGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCAATTACGCTCTTCACTGGGGTCCTG  
TTCTTCTTACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAA  
TTCTCTCTTCAATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCT  
GGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCC  
GTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTGGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCCG  
TGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAAGATTCTCTTC  
AAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCT  
TCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATG

## ES 2 300 318 T3

AGGACCAGACCAACTGCACAGTGCCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGA  
GACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCG  
ACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCT  
GGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCCC  
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGA  
AGCTGCAGAGCGGCAGGCGCAGGCTGTGA

FIGURA 7

SEQ ID NO: 11. Se muestra la secuencia de nucleótidos de VR3A+B+ humano incluyendo 836 pb 5' UT y 994 pb 3' UT

TGTGCAGGCCAGGGAGGGCTTTCCAGAGGAGCCCAGTTGAGCTGGAACACCA  
GTGGGGAGGAGTTGACCAGCAAAGGTGCAGGGAGGGATCAGCACTTTGCAC  
TGGGGAGCAGAGTTTGTGCACTGGGGAAGTCAACTCAAGTATTGGAGCCTCA  
GTTTTCCTGTTCTGTAAAAATGGGTTTCATCATGACAGTGTTTGATGAGGAAAAGG  
ACTGCCGGCCTACACAGCAAAGTCCACATGGATTTTCTGAGCCCCCTCCTGTGCC  
TGAAGCCACGGTTAATGGTTCTGCCTTAGCAGGTGCTTACCACGTGCCAGGC  
ACTGCACTGCACTGGCCACTGGACTGCATGTTCTGTCCATGAGGCTTGGATAT  
CCCCATCTTACAGATCAGGAAGCTGAGGCTATGAAATGTCGACTTGCTCAAT  
GTCATGGAATGACTAAGTGTGGAGCCTGGATTTGAACTTGGCTCTCTGGGGCT  
CCAAAGCTGGCTTTCTTGGTCAGCAGTAGGGTCTGGGATCCAAGTATGGGGT  
CCCAGCTTGACCCTGAAGTCCACCCTCTTTCAGCTAATGCCCAAGGTAGTTGG  
ACCTGGGGCCAAATTTGTGTTTCCAGGTTCTGTAAAGAGCTCCTGTTGCAGTTC  
CCGCCTGAGGCTTGGCGGCCAACCACATCTGGGAGTGGCCTCCCTGTGCCCC  
TGTCATTACAACGGTGGCTTTGAAGCAGCTGGCAGCACTGCTGCTTGTCCACG  
TGGAAGGGGGCTTCTGGAGCCCCCGCCCCCTGGCCGGGTTCTGCCTGACTCC  
CCTTTCATTCCCTTGCAGGCTGAGCAGTGACAGCGGGCCTGGGGCAGGCATG  
GCGGATTCCAGCGAAGGCCCCCCGCGCGGGGCCCGGGGAGGTGGCTGAGCTC  
CCCGGGGATGAGAGTGGCACCCAGGTGGGGAGGCTTTTCCTCTCTCCTCCCT  
GGCCAATCTGTTTGAGGGGGAGGATGGCTCCCTTTTCGCCCTCACCGGCTGATG  
CCAGTCGCCCTGCTGGCCCAGGCGATGGGCGACCAAATCTGCGCATGAAGTT  
CCAGGGCGCCTTCCGCAAGGGGGTGCCCAACCCCATCGATCTGCTGGAGTCC  
ACCTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACT  
CACTGTTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACTCCAGTGACAACAAGAGGTG  
GAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAGCCGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCC  
TCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATCG  
TGTCCCGGGGCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATCTTGCTGACC  
CACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGGAAG  
ACCTGCCTGCCCAAGGCCTTGCTGAACCTGAGCAATGGCCGCAACGACACCA  
TCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAGCGCACCGGCAACATGAGGGAGTTCAT  
TAACTCGCCCTTCCGTGACATCTACTATCGAGGTCAGACAGCCCTGCACATCG  
CCATTGAGCGTCGCTGCAAACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCCAGGGAGC  
TGATGTCCACGCCCAGGCCCGTGGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGG  
GGCTACTTCTACTTTGGGGAGCTGCCCTGTGCTGGCTGCCTGCACCAACCA  
GCCCCACATTGTCAACTACCTGACGGAGAACCCCCACAAGAAGGCGGACATG  
CGGCGCCAGGACTCGCGAGGCAACACAGTGCTGCATGCGCTGGTGGCCATTG  
CTGACAACACCCGTGAGAACACCAAGTTTGTACCAAGATGTACGACCTGCT  
GCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCCGTGCTC

AACAACGACGGCCTCTCGCCCCCATGATGGCTGCCAAGACGGGCAAGATTG  
GGATCTTTCAGCACATCATCCGGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCA  
CCTGTCCCGCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCAGTGTATTCCTCGCTTT  
ATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCTCCGTGCTGGAGAT  
CCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACCGCCACGAGATGCTGGCTGTGGAG  
CCCATCAATGAACTGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTCGGGGCCGTCTCCT  
TCTACATCAACGTGGTCTCCTACCTGTGTGCCATGGTCATCTTCACTCTCACC  
GCCTACTACCAGCCGCTGGAGGGCACACCGCCGTACCCTTACCGCACCACGG  
TGGACTACCTGCGGCTGGCTGGCGAGGTCATTACGCTCTTCACTGGGGTCCTG  
TTCTTCTTACCAACATCAAAGACTTGTTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAA  
TTCTCTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTCATCTACTCTGTCT  
GGTGATCGTCTCAGCAGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGCCTACCTGGCC  
GTGATGGTCTTTGCCCTGGTCCTGGGCTGGATGAATGCCCTTTACTTCACCCG  
TGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATTCTCTTC  
AAGGACCTTTTCCGATTCTGTCTCGTCTACTTGCTCTTCATGATCGGCTACGCT  
TCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATG  
AGGACCAGACCAACTGCACAGTGGCCACTTACCCCTCGTGCCGTGACAGCGA  
GACCTTCAGCACCTTCTCCTGGACCTGTTTAAGCTGACCATCGGCATGGGCG  
ACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGGTCTTCATCATCCTGCT  
GGTGACCTACATCATCCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATTGCC  
TCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGA  
AGCTGCAGAGCGGCAGGCGCAGGCTGTGAGGCTCACCGATGTCCCTCCTGAC  
CCTCCCTCCCCCGAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCC  
CGTATTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCTGGGGAGATGGTCACCGTGGGCAAG  
AGCTCGGACGGCACTCCTGACCGCAGGTGGTGCTTCAGGGTGGATGAGGTGA  
ACTGGTCTCACTGGAACCAGAACTTGGGCATCATCAACGAGGACCCGGGCAA  
GAATGAGACCTACCAGTATTATGGCTTCTCGCATACCGTGGGCCGCTCCGC  
AGGGATCGCTGGTCCTCGGTGGTACCCCGCTGGTGGAAGTGAACAAGAACT  
CGAACCCGGACGAGGTGGTGGTGCTCTGGACAGCATGGGGAACCCCGCTG  
CGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGACTGATGACGCCCCG  
CTCTAGGGACTGCAGCCCAGCCCCAGCTTCTCTGCCCACTCATTTCTAGTCCA  
GCCGCATTTACGAGTGCCTTCTGGGGTGTCCCCCACACCCTGCTTTGGCCC  
CAGAGGCGAGGGACCAGTGGAGGTGCCAGGGAGGCCCCAGGACCTGTGGT  
CCCCTGGCTCTGCCTCCCCACCCTGGGGTGGGGGCTCCCGGCCACCTGTCTTG  
CTCCTATGGAGTCACATAAGCCAACGCCAGAGCCCCTCCACCTCAGGCCCA  
GCCCCTGCCTCTCCATTATTTATTTGCTCTGCTCTCAGGAAGCGACGTGACCC  
CTGCCCCAGCTGGAACCTGGCAGAGGCCTTAGGACCCCGTTCCAAGTGCACT  
GCCCCGCCAAGCCCCAGCCTCAGCCTGCGCCTGAGCTGCATGCGCCACCATT  
TTTGGCAGCGTGGCAGCTTTGCAAGGGGCTGGGGCCCTCGGCGTGGGGCCAT  
GCCTTCTGTGTGTTCTGTAGTGTCTGGGATTTGCCGGTGCTCAATAAATGTTT  
ATTCATTGACGGTGGAATAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 8

SEQ ID NO: 12. Secuencia codificadora de VR3A+B+ humano  
(742 aminoácidos)

MADSSEGPRAGPGEVAELPGDESGTPGGEAFPLSSLANLFEGEDGSLSPSPADASRPAGPGDGRPNLRMKF  
QGAFRKGVNPIDLLESTLYESSVVPGPKKAPMDSLFDYGTyrHHSSDNKRWRKKIIEKQPQSPKAPAPQP  
PPILKVFNRPIlFDIVSRGSTADLDGLLPFLlTHKKRLTDEEFREPSTGKTCLPKALLNLSNGRNDTIPVL  
LDIAERTGNMREFINSPFRDIYYRGQTALHIAIERRCKHYVELLVAQGADVHAQARGRFFQPKDEGGYFYF  
GELPLSLAACTNQPHIVNYLTENPHKKADMRRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFVTKMYDLLLLKCAR  
LFPDSNLEAVLNNDGLSPLMMAAKTGKIGIFQHIIRREVTDEDTRHLSRKFKDWAYGPVYSSLYDLSSLDL  
CGEEASVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDKWRKFGAVSFYINVVSYLCAmVIFTLTAYYQPLEGT  
PPYPYRTTVDYLRlAGEVITLFTGVlFFFTNIKDLFMKKCPGVNSLFIDGSFQLLYFIYSVLVIVSAALYL  
AGIEAYLAVMVfALVLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQILFKDLFRFLlVYLLFMIGYASALVSLNPC  
ANMKVCNEDQTNCTVPTYPSCRdSETFSTFLDLFKLTIGMGDLEMLSSTKYPVVFIILLVTYIILTFVLL  
LNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQSGRRRL

**FIGURA 9**

|                                 | Controles<br>a los que<br>se ha<br>inyectado<br>agua | VR3 A+B-        | VR3 A-B-        | VR3 A+B+            |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| Número de<br>oocitos<br>vivos   | 88                                                   | 9               | 47              | 29                  |
| Número de<br>oocitos<br>muertos | 44                                                   | 90              | 40              | 54                  |
| Porcentaje<br>de vivos          | 67%                                                  | 9%<br>(*p<e-17) | 54%<br>(p=0,99) | 35%<br>(*p=5,4 e-6) |

FIGURA 10

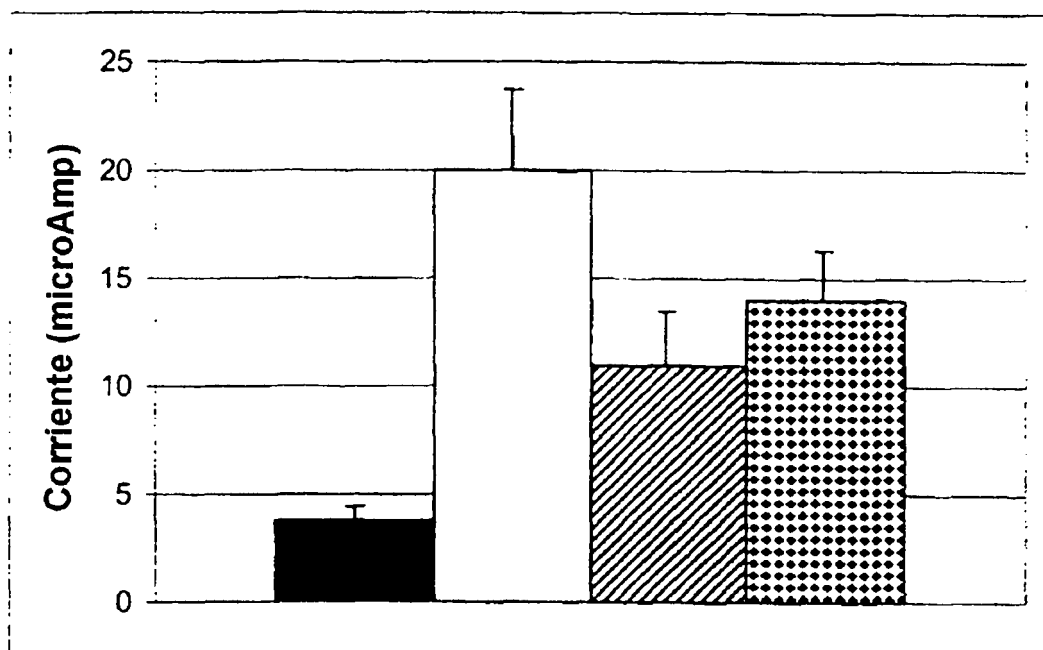


FIGURA 10B

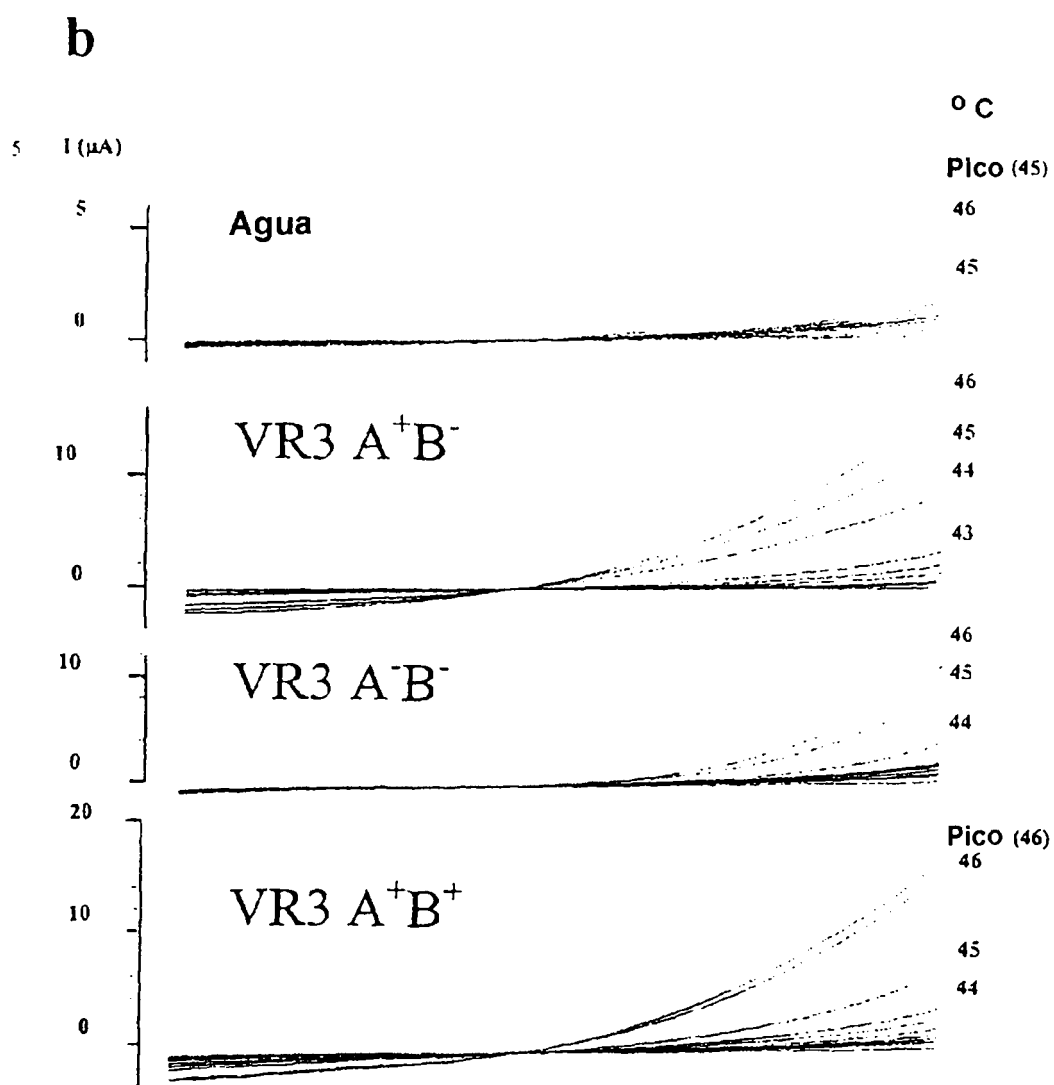
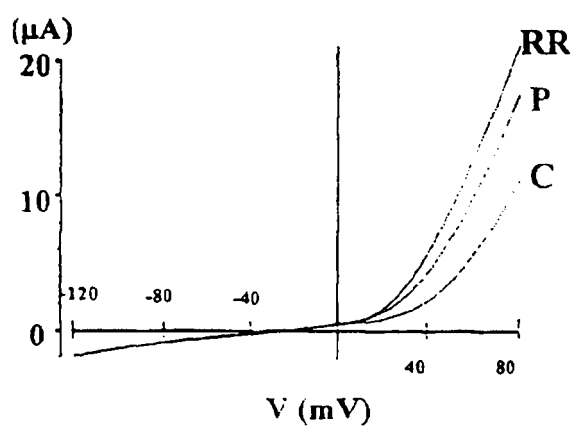


FIGURA 11

**a** VR1 y agua



**b**

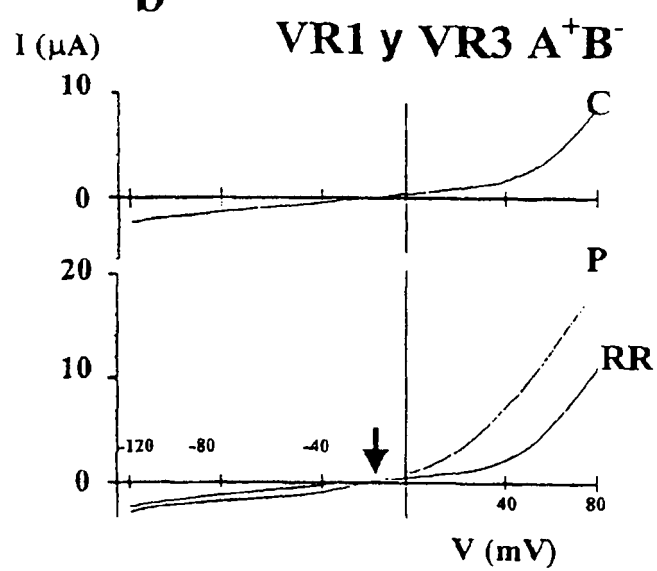


FIGURA 12

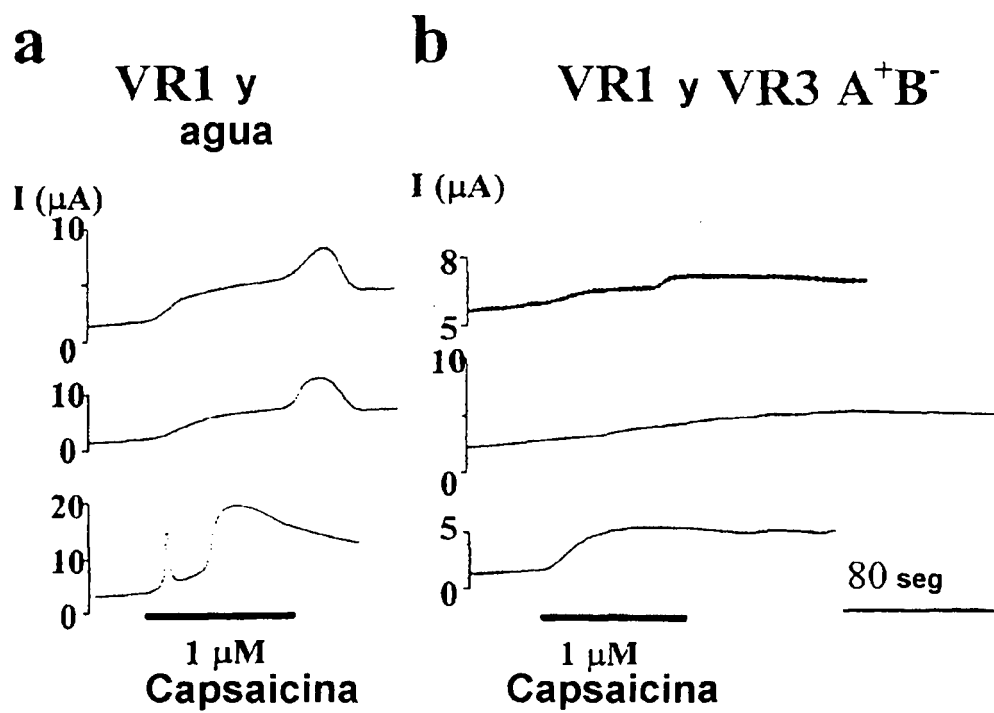


FIGURA 13

| Tejido o tipo de célula       | hVR3<br>(intensidad media) | hVR1<br>(intensidad media) |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Hígado                        | 900 +/- 50<br>(p<0,005)    | 55 +/- 3 (p<0,05)          |
| línea celular de linfoma Raji | 255 +/- 20<br>(p<0,005)    | NS                         |
| Bazo                          | 196 +/- 19<br>(p<0,01)     | NS                         |
| Pulmón                        | 150 +/- 22<br>(p<0,01)     | NS                         |
| DRG                           | 129 +/- 21<br>(p<0,025)    | 90 +/- 3 (p<0,05)          |
| Ovario                        | 128 +/- 9<br>(p<0,0025)    | 69 +/- 2<br>(p<0,0005)     |
| Placenta                      | 120 +/- 7<br>(p<0,001)     | NS                         |
| Tráquea                       | 106 +/- 7<br>(p<0,001)     | 54 +/- 4 (p<0,01)          |
| Intestino delgado             | 105 +/- 3<br>(p<0,001)     | 62 +/- 5 (p<0,01)          |
| Próstata*                     | 72 +/- 5<br>(p<0,0025)     | 38 +/- 1<br>(p<0,0005)     |
| Riñón                         | 62 +/- 4 (p<0,05)          | 57 +/- 4<br>(p<0,005)      |
| Médula espinal                | 57 +/- 2<br>(p<0,00025)    | 47 +/- 3<br>(p<0,005)      |

Los valores son la intensidad media del ARNc marcado hibridante con la micromatriz de ADNc +/- ETM. La intensidad media para los ARNc de todos los tejidos mostrados fueron significativamente diferentes (valor p entre paréntesis) del 75% del valor del ADNc de la planta de control. Los datos son los promedios de 3-6 experimentos. NS: no significativamente diferente del control génico de la planta (véase Luo et al., 1999 para métodos más detallados). \* Tejido a partir del cual se clonó VR3.

# ES 2 300 318 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

|    |                                                                             |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5  | <110> Dubin, Adrienne E<br>Huvar, Ame<br>Erlyer, Mark G<br>Glass, Charles A |    |
| 10 | <120> ADN que codifica Isoformas del Receptor Vanilloide VR3 Humano         |    |
| 15 | <130> Receptores VR3 humanos                                                |    |
|    | <140>                                                                       |    |
|    | <141>                                                                       |    |
|    | <160> 17                                                                    |    |
| 20 | <170> PatentIn Ver. 2.1                                                     |    |
|    | <210> 1                                                                     |    |
|    | <211> 26                                                                    |    |
| 25 | <212> ADN                                                                   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                                  |    |
|    | <220>                                                                       |    |
| 30 | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido               |    |
|    | <400> 1                                                                     |    |
| 35 | accggcctat cctctttgac atcgtg                                                | 26 |
|    | <210> 2                                                                     |    |
|    | <211> 25                                                                    |    |
| 40 | <212> ADN                                                                   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                                  |    |
|    | <220>                                                                       |    |
| 45 | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido               |    |
|    | <400> 2                                                                     |    |
| 50 | tgtccgcctt cttgtggggg ttctc                                                 | 25 |
|    | <210> 3                                                                     |    |
|    | <211> 48                                                                    |    |
| 55 | <212> ADN                                                                   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                                  |    |
|    | <220>                                                                       |    |
| 60 | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido               |    |
|    | <400> 3                                                                     |    |
| 65 | aacgttggtgta ccgccaccat ggccgattcc agcgaaggcc cccgcgcg                      | 48 |
|    | <210> 4                                                                     |    |

## ES 2 300 318 T3

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

10 <400> 4

taaagcggcc gcttcaggag ggacatcggt gagcctcac

39

15 <210> 5

<211> 2616

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 5

25

atggcggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggcccgggg aggtggctga gctccccggg 60  
gatgagagtg gcacccagg tggggaggct ttctctctct cctccctggc caatctgtt 120  
gagggggagg atggctccct ttgccctca ccggctgatg ccagtcgccc tgcctggcca 180  
ggc gatgggc gaccaaactc gcgcatgaag ttccaggggc ccttccgcaa gggggctgcc 240  
aaccctatcg atctgctgga gtccacccta tatgagtcct cggctggcgcc tgggcccagg 300  
aaagcaccca tggactcact gtttgactac ggcacctatc gtcaccactc cagtgacaac 360

30

aagaggtgga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gcccacaaag ccttgcctt 420  
cagccgcccc ccatcctcaa agtcttcaac cggcctatcc tcttgacat cgtgtcccgg 480  
ggctccactg ctgacctgga cgggtgctc ccattcttgc tgaccacaa gaaacgccta 540  
actgatgagg agtttcgaga gccatctacg ggggaagacct gcctgccaa ggccttctg 600  
aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tggacatcgc ggagcgcacc 660  
ggcaacatgc gggagttcat taactcggcc ttccgtgaca tctactatc aggtcagaca 720  
gccttgaca tcgccattga gcgtcgtgc aaacactacg tggaaactct cgtggccag 780  
ggagctgatg tccacgcca gggccgtggg cgcttcttcc agccaagga tgaggggggc 840

40

45

tacttctact ttggggagct gcccctgtc ctggctgcct gcaccaacca gcccacatt 900  
gtcaactacc tgacggagaa cccccacaag aaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcga 960  
ggcaacacag tgctgcatgc gctggtggcc attgctgaca acacccgtga gaacaccaag 1020  
tttgttacca agatgtacga cctgctgctg ctcaagtgtg cccgcctctt ccccgacagc 1080  
aacctggagg ccgtgctcaa caacgacggc ctctcgcccc tcatgatgac tccaagacg 1140  
ggcaagattg ggatcttca gcacatcatc cggcgggagg tgacggatga ggacacacgg 1200  
cacctgtccc gcaagttaa ggaactggcc tatgggccag tgtattctc gctttatgac 1260  
ctctcctccc tggacacgtg tggggaagag gcctccgtgc tggagatcct ggtgtacaac 1320  
agcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgctgcgg 1380  
gacaagtgga gcaagttcgg ggccgtctcc ttctacatca acgtggctc ctacctgtgt 1440  
gcatggta tcttactct caccgctac taccagccgc tggagggcac accgccgtac 1500  
ccttaccgca ccacggtgga ctacctgcgg ctggctggcg aggtcattac gctcttact 1560  
ggggctcctgt tcttcatc caacatcaaa gacttgtca tgaagaaatg ccttggagt 1620  
aatctctct tcatgatgg ctcttccag ctgcttact tcatctactc tctctgggt 1680  
atcgtctcag cagccctcta cctggcagg atcgaggcct acctggccgt gatggtctt 1740  
gcccgtgtc tgggtggat gaatgccct tacttcaccc gtgggctgaa gctgacgggg 1800  
acctatagca tcatgatcca gaagattctc tcaaggacc ttctcgatt cctgctcgtc 1860  
tactgtctt tcatgatcgg ctacgttca gccttggct cctctctgaa cccgtgtgcc 1920

65

## ES 2 300 318 T3

aacatgaagg tgtgcaatga ggaccagacc aactgcacag tgcccactta cccctcgtgc 1980  
 cgtgacagcg agaccttcag caccctcctc ctggacctgt ttaagctgac catcggcag 2040  
 ggcgacctgg agatgctgag cagcaccaag taccctgtgg tctcatcat cctgctggg 2100  
 5 acctacatca tcttcacctt tgtgctgctc ctcaacatgc tcattgccct catgggcgag 2160  
 acagtgggcc aggtctccaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagtg ggccaccacc 2220  
 atcctggaca ttgagcgctc ctccccgta ttctgagga aggcctccg ctctggggag 2280  
 atggtcaccg tgggcaagag ctgggacggc acctctgacc gcagggtggtg cticagggtg 2340  
 gatgagggtga actggtctca ctggaaccag aacttgggca tcalcaacga ggaccgggc 2400  
 10 aagaatgaga cctaccagta ttatggcttc tcgcataccg tgggcccgcct ccgagggat 2460  
 cgtgtgtctt cgggtgtacc ccgcgtggg gaactgaaca agaactgaa cccggacgag 2520  
 gtgtgtgtgc ctctggacag catggggaac ccccgctgcg atggccacca gcagggttac 2580  
 ccccgcaagt ggaggactga tgacgccccg ctctag 2616

<210> 6  
 <211> 3500  
 <212> ADN  
 20 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

caattgggat ttaaaccag ggactatcca gcccacaaagc ccttcccacc acaccagggtg 60  
 gcctgtcctg ggccagctc tgcacacagg gcctgtgtcc cccgggggtg tgggaagtg 120  
 gcagggcaga ggtgggccc tgggtgttc tggctcagct tctaaaacaa gagcctctg 180  
 tgggggcaga ggggccgtga accctgaaa tgttaggcag ataccctgtg ggagctttgt 240  
 30 tctgggatgc taagaaccgc ttgaggattt aagctttgcc actttggctc cggagcaagg 300  
 gcagaggctg agcagtgcag acgggcctgg gcagggcag gcggattcca gcgaaggccc 360  
 ccgcgcgggg cccggggagg tggctgagct ccccggggat gagagtggca cccaggtgg 420  
 ggagggcttt cctctctct ccttgccaa tctgtttgag ggggaggatg gctccctt 480  
 gcctcaccg gctgatgcca gtcgccctg tggcccaggc gatgggcgac caaatctgcg 540  
 35 catgaagtic caggcgccct tcgcgaagg ggtgcccaac cccatcgatc tgcaggatc 600  
 caccctatat gagtctcgg tgggtcctgg gcccagaaga gcacccatgg actactgtt 660  
 tgactacggc acctatcgt accactccag tgacaacaag aggtggagga agaagatcat 720  
 agagaagcag ccgacagacc ccaaagcccc tgcccctcag ccgccccca tctcaaaagt 780  
 40 cttaaccgg cctatcctt ttgacatgt gtcgggggc tccactgctg acctggacgg 840  
 gctgtccca ttctgtctga ccacaagaa acgcctaact gatgaggagt ttcgagagcc 900  
 atctacgggg aagacctgcc tgcccaggc ctgtgtgac ctgagcaat gccgaacga 960  
 caccatccct gtgtgtgtgg acatcgcgga gcgcaccggc aacatcggg agttcattaa 1020  
 45 ctgcccctc cgtgacatct actatcgagg tcagacagcc ctgcacatg ccattgagcg 1080  
 tcgtgcataa cactacgtgg aacttctgt ggcccaggga gctgatgtcc acgccaggc 1140  
 ccgtgggcgc ttctccagc ccaaggatga gggggggtac ttactttg ggagctgcc 1200  
 cctgtcgtg gctgcctgca ccaaccagcc ccacattgt aactacctga cggagaaccc 1260  
 ccacaagaag gcggacatgc ggcgccagga ctgcgaggc aacacagtgc tgcatgcgt 1320  
 50 ggtggccatt gctgacaaca cccgtgagaa caccaagttt gttaccaaga tctacacct 1380  
 gctgtgtctc aagtgtgcc gcctcttccc cgacagcaac ctggaggccg tgcatacaa 1440  
 cgacggcctc tcgcccctca tgatggctgc caagacgggc aagattggga tcttcagca 1500  
 catcatccgg cgggaggtga cggatgagga cacacggcac ctgtcccgca agttcaagga 1560  
 55 ctgggcctat gggccagtgt attctcgtt ttatgacct tcctccctgg acaggtgtg 1620  
 ggaagaggcc tccgtgtgtg agatcctgt gtacaacagc aagattgaga accgccacga 1680  
 gatgtgtgt gtggagccca tcaatgaact gctgcgggac aagtggcgca agttcggggc 1740  
 cgtctcttc tacatcaacg tggctccta cctgtgtgcc atggctatct tcaactcac 1800  
 cgcctactac cagccgttg agggcacacc gccgtacct taccgacca cgttgacta 1860  
 60 cctgcggctg gctggcgagg tcattacgt ctactggg gtcctgtct tcatcacc 1920  
 catcaagac ttgtcatga agaaatgcc tggagtgaat tctcttca ttgatggctc 1980  
 ctccagctg ctctactca tctactctgt cctgtgtatc gctcagcag cctctacct 2040  
 65 ggcagggatc gaggcctacc tggccgtgat ggtcttggc ctgtcctgg gctggatgaa 2100

# ES 2 300 318 T3

5 tgcctttac ttacccgtg ggctgaagci gacggggacc tatagcatca tgaaccagaa 2160  
 gattctctc aaggacctt tccgaticct gctcgtctac ttgctcttca tgaatggcta 2220  
 cgcttcagcc ctggctcccc tctgaaccc gtgtgccaac atgaagggtg gcaatgagga 2280  
 ccagaccaac tgcacagtgc ccacttacc ctcgtgccgt gacagcgaga ccttcagcac 2340  
 ctctctctg gacctgttta agctgacctt cggcatgggc gacctggaga tctgagcag 2400  
 caccaagtac cccgtggctc tcatcatct gctggtgacc tacatcatcc tcaccttgt 2460  
 10 gctgctctc aacatgctca ttgccctcat gggcgagaca gtggggcagg tctccaagga 2520  
 gagcaagcac atctggaagc tgcagtgggc caccaccatc ctggacattg agcgtctct 2580  
 ccccgattc ctgaggaagg ccttccgctc tggggagatg gtcaccgtgg gcaagagctc 2640  
 ggacggcact cctgaccgca ggtgggtcct cagggtggat gagggtgaact ggtctcactg 2700  
 gaaccagaac ttgggcatca tcaacgagga cccgggcaag aatgagacct accagtttta 2760  
 15 tggctctcg cataccgtgg gccgcctccg cagggatcgc tggctctcgg tggtaacccg 2820  
 cgtgggtgaa ctgaacaaga actcgaaccc ggacgaggtg gtgggtgctc tggacagcat 2880  
 ggggaacccc cgtcgcgatg gccaccagca ggggtacccc cgaagtggga ggactgatga 2940  
 cgtcccgctc tagggactgc agcccagccc cagcttctct gccactcat ttctagtcca 3000  
 20 gccgatttc agcagtgcct tctgggggtg cccccacac cctgcttgg ccccagaggc 3060  
 gagggaccag tggaggtgcc agggaggccc caggacctg tggccccctg gctctgctc 3120  
 cccacctgg ggtgggggct cccggcccac tcttctctc ctatggagtc acataagcca 3180  
 acggcagagc cctccacct caggcccag cccctgctc tcattattt atttgcctg 3240  
 25 ctctcaggaa gcgacgtgac ccttccccca gctggaacct ggcagaggcc ttaggacccc 3300  
 gtccaagtg cactgcccgg ccaagcccca gcctcagcct gcgcctgagc tgcattgcc 3360  
 accattttg gcagcgtggc agctttgcaa ggggctgggg cctcggcgt ggggccatgc 3420  
 ctctgtgtg tctgtagtg tctgggattt gccggtgctc aataaatgtt taticattga 3480  
 30 cggtggaata aaaaaaaaaa 3500

<210> 7

<211> 871

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro  
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser  
 35 40 45

Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg  
 50 55 60

# ES 2 300 318 T3

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

# ES 2 300 318 T3

5 Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu  
 290 295 300  
 Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg  
 305 310 315 320  
 10 Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg  
 325 330 335  
 Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Lys  
 340 345 350  
 15 Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn  
 355 360 365  
 20 Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly  
 370 375 380  
 Ile Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg  
 385 390 395 400  
 25 His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser  
 405 410 415  
 30 Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Ala Ser  
 420 425 430  
 35 Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu  
 435 440 445  
 40 Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg  
 450 455 460  
 Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys  
 465 470 475 480  
 45 Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly  
 485 490 495  
 50 Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala

55

60

65

# ES 2 300 318 T3

|    | 500                                                                                | 505 | 510 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Ile Thr Asn<br>515 520 525     |     |     |
| 10 | Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe<br>530 535 540     |     |     |
| 15 | Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val<br>545 550 555 560 |     |     |
| 20 | Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala<br>565 570 575     |     |     |
| 25 | Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe<br>580 585 590     |     |     |
| 30 | Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys<br>595 600 605     |     |     |
| 35 | Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe<br>610 615 620     |     |     |
| 40 | Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asn Pro Cys Ala<br>625 630 635 640 |     |     |
| 45 | Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys Thr Val Pro Thr<br>645 650 655     |     |     |
| 50 | Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr Phe Leu Leu Asp<br>660 665 670     |     |     |
| 55 | Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser<br>675 680 685     |     |     |
| 60 | Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val Thr Tyr Ile Ile<br>690 695 700     |     |     |
| 65 | Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu<br>705 710 715 720 |     |     |
|    | Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile Trp Lys Leu Gln                    |     |     |

# ES 2 300 318 T3

725 730 735

5 Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe Pro Val Phe Leu  
740 745 750

Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val Gly Lys Ser Ser  
755 760 765

10 Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn  
770 775 780

15 Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly  
785 790 795 800

Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His Thr Val Gly Arg  
805 810 815

20 Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg Val Val Glu Leu  
820 825 830

25 Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val Pro Leu Asp Ser Met  
835 840 845

30 Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr Pro Arg Lys Trp  
850 855 860

Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu  
865 870

<210> 8

<211> 2436

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

atggcggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggcccgggg aggtggctga gctccccggg 60  
gatgagagtg gcaccccagg tggggaggct ttctctct cctccctggc caatctgttt 120  
gagggggagg atggctccct ttgcctca ccggctgatg ccagtcgcc tgcggccca 180  
ggcgtgggc gaccaaactt gcgcatgaag ttccaggcg ccttcgcaa gggggtgccc 240  
aaccctatc atctgtgga gtccacccta tatgagtcct cgggtgtgcc tgggcccag 300  
aaagcaccca tggactcact gttgactac ggcacctatc gtcaccactc cagtacaac 360  
aagaggtgga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gcccacaagc cctgcccc 420

## ES 2 300 318 T3

cagccgcccc ccaccccaa agtctcaac cggcctatcc tcttgacat cgtgtcccgg 480  
 ggctccactg ctgacctgga cgggctgctc ccattctgc tgaccacaa gaaacgcta 540  
 actgatgagg agtttcgaga gccatctacg gggaagacct gcctgcccaa ggccttgctg 600  
 aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tggacatgc ggagcgcacc 660  
 ggcaacatgc gggagttcat taactcgccc tccgtgaca tctactatc aggtcagaca 720  
 gccctgcaca tcgccattga gcgtcgtgc aaacactacg tggaaattct cgtggcccag 780  
 ggagctgatg tccacgcca gggccgtggg cgtctctcc agcccaagga tgaggggggc 840  
 tacttctact ttggggagct gcccctgtcg ctggctgcct gcaccaacca gcccacatt 900  
 gtcaactacc tgacggagaa cccccacaag aaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcga 960  
 ggcaacacag tcttgcacg gctgggtggc attgtgaca acaccgtga gaacaccaag 1020  
 ttgtitacca agatgtacga cctgtgctg ctcaagtgtg cccgcctct ccccgacagc 1080

aacctggagg ccgtgctcaa caacgacggc ctctgcccc tcatgatggc tgccaagacg 1140  
 ggcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgctgcgg 1200  
 gacaagtggc gcaagttcgg ggcctgtcc ttctacatca acgtggctc ctacctgtgt 1260  
 gccatggtca tcttactct caccgcctac taccagccgc tggaggcac accgccgtac 1320  
 ccttaccgca ccacggtgga ctacctgagg ctggctggcg aggtcattac gctcttact 1380  
 ggggtcctgt tcttactac caacatcaa gacttggtca tgaagaaatg ccttgagtg 1440  
 aattctctct tcatgatgg ctcttcag ctgcttact tcatctact tctcttggtg 1500  
 atgctctcag cagccctcta cctggcaggg atcgaggcct acctggccgt gatggtctt 1560  
 gccctggctc tgggctggat gaatgccctt tacttaccg gtgggctgaa gctgacgggg 1620  
 acctatagca tcatgatcca gaagattct tcaaggacc ttcccgatt cctgctgctc 1680  
 tacttgcctt tcatgatcgg ctacgttca gccctggct cctctctgaa cccgtgtgcc 1740  
 aacatgaagg tgtgcaatga ggaccagacc aactgcacag tggccactta cccctcgtgc 1800  
 cgtgacagcg agaccttcag cacttctc ctggacctgt ttaagctgac catcggcag 1860  
 ggcgacctgg agatgctgag cagaccaag taccctgtgg tcttcatcat cctgtgtgtg 1920  
 acctacatca tcttaccct tgtgtgctc ctcaacatgc tcatgccct catgggcgag 1980  
 acagtgggccc aggtctccaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagtg ggcaccacc 2040  
 atcctggaca ttgagcgctc ctccccgta ttcttgagga aggccttccg ctctggggag 2100  
 atggctaccg tgggcaagag ctggacggc actcctgacc gcagggtggg ctccagggtg 2160  
 gatgaggtga actggttca ctggaaccag aactgggca tcatcaacga ggaccgggc 2220  
 aagaatgaga cctaccagta ttatggctc tcgcataccg tgggccgcct ccgcagggat 2280  
 cgctggctct cgggtgtacc ccgctgtgtg gaactgaaca agaactgaa cccggacgag 2340  
 gtggtgtgtc ctctggacag catggggaac ccccgctgcg atggccacca gcagggttac 2400  
 ccccgcaagt ggaggactga tgacgcccc ctctag 2436

<210> 9

<211> 811

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 300 318 T3

<400> 9

|    |                                                                 |
|----|-----------------------------------------------------------------|
| 5  | Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala |
|    | 1 5 10 15                                                       |
|    | Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro |
|    | 20 25 30                                                        |
| 10 | Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser |
|    | 35 40 45                                                        |
|    | Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg |
| 15 | 50 55 60                                                        |
|    | Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro |
|    | 65 70 75 80                                                     |
| 20 | Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val |
|    | 85 90 95                                                        |
|    | Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr |
| 25 | 100 105 110                                                     |
|    | Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile |
|    | 115 120 125                                                     |
| 30 |                                                                 |
|    | Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro |
| 35 | 130 135 140                                                     |
|    | Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg |
|    | 145 150 155 160                                                 |
| 40 | Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His |
|    | 165 170 175                                                     |
|    | Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys |
| 45 | 180 185 190                                                     |
|    | Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp |
|    | 195 200 205                                                     |
| 50 | Thr Ile Pro Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg |

55

60

65

# ES 2 300 318 T3

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 210                                                             | 215 | 220 |     |
| 5  | Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr |     |     |     |
|    | 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
|    | Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu |     |     |     |
|    |                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| 10 | Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe |     |     |     |
|    |                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| 15 | Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro |     |     |     |
|    |                                                                 | 275 | 280 | 285 |
|    | Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu |     |     |     |
| 20 |                                                                 | 290 | 295 | 300 |
|    | Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg |     |     |     |
|    | 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| 25 | Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg |     |     |     |
|    |                                                                 | 325 | 330 | 335 |
|    | Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Lys     |     |     |     |
| 30 |                                                                 | 340 | 345 | 350 |
|    | Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn |     |     |     |
|    |                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| 35 | Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Glu |     |     |     |
|    |                                                                 | 370 | 375 | 380 |
|    | Asn Arg His Glu Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg |     |     |     |
| 40 |                                                                 | 385 | 390 | 395 |
|    |                                                                 |     |     | 400 |
|    | Asp Lys Trp Arg Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val |     |     |     |
|    |                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| 45 | Ser Tyr Leu Cys Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln |     |     |     |

|    |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|
|    | 420 | 425 | 430 |
| 50 |     |     |     |

55

60

65

# ES 2 300 318 T3

5 Pro Leu Glu Gly Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr  
 435 440 445  
 Leu Arg Leu Ala Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe  
 450 455 460  
 10 Phe Ile Thr Asn Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val  
 465 470 475 480  
 Asn Ser Leu Phe Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr  
 485 490 495  
 15 Ser Val Leu Val Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu  
 500 505 510  
 20 Ala Tyr Leu Ala Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn  
 515 520 525  
 Ala Leu Tyr Phe Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile  
 530 535 540  
 25 Met Ile Gln Lys Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val  
 545 550 555 560  
 30 Tyr Leu Leu Phe Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu  
 565 570 575  
 35 Asn Pro Cys Ala Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys  
 580 585 590  
 Thr Val Pro Thr Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr  
 595 600 605  
 40 Phe Leu Leu Asp Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu  
 610 615 620  
 45 Met Leu Ser Ser Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val  
 625 630 635 640  
 Thr Tyr Ile Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala  
 645 650 655  
 50 Leu Met Gly Glu Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile  
 55  
 60  
 65

# ES 2 300 318 T3

660                      665                      670  
 5                      Trp Lys Leu Gln Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe  
                          675                      680                      685  
                          Pro Val Phe Leu Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val  
 10                      690                      695                      700  
                          Gly Lys Ser Ser Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val  
 15                      705                      710                      715                      720  
                          Asp Glu Val Asn Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn  
 20                      725                      730                      735  
                          Glu Asp Pro Gly Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His  
 25                      740                      745                      750  
                          Thr Val Gly Arg Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg  
 30                      755                      760                      765  
                          Val Val Glu Leu Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val Pro  
 35                      770                      775                      780  
                          Leu Asp Ser Met Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr  
 40                      785                      790                      795                      800  
                          Pro Arg Lys Trp Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu  
 45                      805                      810

<210> 10

<211> 2229

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

45                      atggcggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggcccgggg aggtggctga gctccccggg 60  
                          gatgagagtg gcaccccagg tggggaggct ttctctctct cctccctggc caatctgttt 120  
 50                      gagggggagg atggctccct ttgcccctca cgggtgatg ccagtcgccc tgctggccca 180  
                          ggcgatgggc gaccaaattt gcgcatgaag ttccagggcg ccttcgcaa gggggtgccc 240  
                          aaccccatcg atctgctgga gtccacccta tatgagtcct cgggtggtgcc tgggcccaag 300  
                          aaagcaccca tggactcact gttgactac ggcacctatc gtcaccactc cagtgacaac 360

55

60

65

# ES 2 300 318 T3

aagaggigga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gccccaaagc ccctgccct 420  
cagccgcccc ccatcctcaa agtcttcaac cggcctatcc tcttgacat cgtgtcccg 480  
5 ggctccactg ctgacctgga cgggctgctc ccattcttgc tgaccacaa gaaacgccta 540  
actgatgagg agtttcgaga gccatctacg gggaagacct gcctgccccaa ggccttgctg 600  
aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tggacatgc ggagcgacc 660  
ggcaacatga gggagttcat taactgccc ttccgtgaca tctactatcg aggtcagaca 720  
10 gccctgcaca tcgccattga gcgtcgtgc aaacactacg tggaaactct cgtgcccag 780  
ggagctgatg tccacgcca gggcgtggg cgtctctcc agccaagga tgagggggg 840  
tacttctact ttggggagct gccctgtcg ctggctgcct gcaccaacca gcccacatt 900  
gtcaactacc tgacggagaa cccccacaag aaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcga 960  
ggcaacacag tctgcatgc gctggggcc attgtgaca acaccgtga gaacaccaag 1020  
15 ttgttacca agatgtacga cctgtgctg ctcaagtgtg ccgcctctt cccgacagc 1080  
aacctggagg cgtgctcaa caacgacggc ctctgcccc tcatgatggc tgccaagacg 1140  
ggcaagattg gga!cttca gcacatc cggcgggagg tgacggatga ggacacacg 1200  
cacctgtccc gcaagtcaa ggactgggccc latgggccag tgtattctc gctttatgac 1260  
20 ctctctccc tggacacgtg tggggaagag gcctccgtgc tggagatcct ggtgtacaac 1320  
agcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgctgcgg 1380  
gacaagtggc gcaagttcgg ggccgtctc ttctacatca acgtggtcic ctacctgtg 1440  
gccatgttca tcttactct caccgcctac taccagccgc tggagggcac accgccgtac 1500  
25 ccttaccgca ccacggtgga ctacctgcgg ctggctggcg aggtcattac gctcttact 1560  
ggggtcctgt tcttctcac caacatcaa gactgttca tgaagaaatg ccctggagtg 1620  
aattctctct tcatgatgg ctcttccag ctgcttact tcatctactc tgcctggtg 1680  
atcgtctcag cagccctcta cctggcaggg atcgaggcct acctggccgt gatgtctt 1740  
30 gccctggicc tgggctggat gaatgccct tacttaccg gtgggctgaa gctgacggg 1800

acctatagca tcatgatcca gaagattctc ttcaaggacc ttctcgatt cctgctcgtc 1860  
tacttctct tcatgatcgg ctacgttca gccctggct cctcctgaa cccgtgtgc 1920  
35 aacatgaagg tgtgcaatga ggaccagacc aactgcacag tggccactta cccctcgtc 1980  
cgtgacagcg agaccttcag cacttctc ctggacctgt ttaagctgac catcggcag 2040  
ggcgacctgg agatgctgag cagcaccaag taccctgtg tcttcatcat cctgctggtg 2100  
acctacatca tcttacctt tgtgtgctc ctcaacatgc tcatgccct catgggcgag 2160  
40 acagtgggccc aggtctcaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagag cggcaggcgc 2220  
aggctgtga 2229

<210> 11

<211> 4059

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

tgtgcaggcc agggagggct ttccagagga gcccagtga gctggaacac cagtggggag 60

# ES 2 300 318 T3

5      gaggtagacca gcaaagggtgc agggaggggat cagcacitgt cactggggag cagagttgt 120  
       gcactgggga agtcaactca agtattggag cctcagtttc ctgtctgtta aaatgggttc 180  
 10     atcatgacag tgtttgatga ggaaaaggac tggcggccta cacagcaagt ccacatggat 240  
       ttctgagcc cctcctgtgc ctgaagccca cggtaaatgg ttctgcctta gcagggtgct 300  
       accacgtgcc aggcactgca ctgcactggc cactggactg catgttctgt ccatgaggct 360  
       tggatatccc catcttacag atcaggaagc tgaggctatg aaatgtcgc ttgctcaatg 420  
 15     tcatggaaatg actaagtgtg gagcctggat ttgaacttgg ctctctgggg ctccaaagct 480  
       ggctttcttg gtcagcagta gggctctggga tccaagtatg ggggtccagc ttgacctga 540  
       agtcaccctt ctctcagcta atgccaagg tagttggacc tggggccaat ttgtttcc 600  
       aggttctga aagagctcct gttgcagtgc ccgcctgagg ctggcgggcc aaccacatct 660  
       gggagtgggc tccctgtgcc cctgtcatta caacgggtggc ttgaagcag ctggcagcac 720  
 20     tgcctgtgtt ccacgtggaa gggggcttcc tggagcccc gccctggcc gggttctgcc 780  
       tgactcccc ttatcccc tgcaggctga gcagtgcaga cgggcctggg gcaggcatgg 840  
       cggattccag cgaaggcccc cgcgcggggc cggggagggt ggcagagct cccggggatg 900  
       agagtggcac cccaggtggg gaggcttct ctctctctc cctggccaat ctgtttgagg 960  
 25     gggaggatgg ctccctttcg cctcaccgg ctgatgccag tggcctgtct gggcaggcg 1020  
       atggcgacac aaatctgcgc atgaagtcc agggcgctt ccgaagggg gtgccaacc 1080  
       ccatcgtatc gctggagtcc accctatg agtctcgtt ggtgcctggg ccaagaaag 1140  
       caccatgga ctactgtt gactacggca cctatgtca cactccagt gacaacaaga 1200  
 30     ggtggaggaa gaagatcata gagaagcagc cgcagagccc caaagcccc gccctcagc 1260  
       cgcccccat cctcaaagtc ttaaccggc ctatcctct ttgacatgtg tccggggct 1320  
       ccactgtga cctggacggg ctgctccat tctgtgtac ccacaagaaa cgcctaactg 1380  
       atgaggagt tggagagcca tctacgggga agactgcct gccaaggcc ttgctgaacc 1440  
       tgagcaatgg ccgaacgac accatccctg tgcctgtga catcgcggag cgcaccggca 1500  
 35     acatgaggga gttaataac tggccttcc gtgacatca ctatcagggt cagacagccc 1560  
       tgcacatgc cattgagct cgtgcaaac actacgtgga acttctctg gccagggag 1620  
       ctgatgtca cggcaggcc cgtggcgct tctccagcc caaggatgag gggggctact 1680  
       tctactttg ggagctgccc ctgtcgtgg ctgcctgcac caaccagccc cacattgtca 1740  
 40     actacctgac ggagaacccc cacaagaagg cggacatgc gcgccaggac tgcgaggca 1800  
       acacagtct gcatgcgtg gtggccattg ctgacaacac ccgtgagaac accaagtgtg 1860  
       ttaccaagat gtacgacctg ctgctgtca agtgtgccc cctctcccc gacagcaacc 1920  
       tggaggccgt gctcaacaac gacggcctct cggccctcat gatggctgcc aagacgggca 1980  
 45     agattgggat ctctcagcac atcatccggc gggagggtgac ggatgaggac acacggcacc 2040  
       tgccccgaa gttaaggac tgggcctatg ggccagtgt ttctctgctt tatgacctct 2100  
       cctccctgga cactgttggg gaagaggcct ccgtgctgga gatcctgggt tacaacagca 2160  
       agattgagaa ccgccacgag atgctggctg tggagccat caatgaactg ctgagggaca 2220  
       agtggcgcaa gtccggggcc gtctcctct acatcaacgt ggtctctac ctgtgtgcca 2280  
 50     tggctacttt cactctacc gcctactacc agccgctgga gggcacacc ccgtacctt 2340  
       accgcaccac ggtggactac ctgcggtgg ctggcgagg cattacgctc ttactgggg 2400  
       tctgttctt ctacaccaac atcaaagact tgttcatgaa gaaatgccct ggagtgaatt 2460  
       ctctctcat tgatggctcc ttccagctgc tctactcat ctactctgc ctggtgatc 2520

# ES 2 300 318 T3

tctcagcagc cctctacctg gcaggggatcg aggcctacct ggccgtgatg gtctttgccc 2580  
 tggctctggg ctggatgaat gcccttlact tcacccgtgg gctgaagctg acggggacct 2640  
 atagcatcat gatccagaag attctcttca aggacctttt ccgattcctg ctgctctact 2700  
 5 tgccttcat gatcggctac gcttcagccc tggctccct cctgaacccg tgtgccaaca 2760  
 tgaaggtgtg caatgaggac cagaccaact gcacagtgcc cacttaccct tcgtgccgtg 2820  
 acagcgagac cttcagcacc ttctctctgg acctgtttaa gctgaccatc ggcattgggcg 2880  
 acctggagat gctgagcagc accaagtacc ccgtggctt calcatcctg ctggtgacct 2940  
 10 acatcatcct cactttgtg ctgctctca acatgctcat tgcctcatg ggcgagacag 3000  
 tgggccaggi ctccaaggag agcaagcaca tctggaagct gcagagcggc aggcgcaggc 3060  
 tgtgaggctc accgatgtcc ctctgaccc tccctccccg cagtgggcca ccaccatct 3120  
 ggacattgag cgtccttcc ccgtattct gaggaaggcc ttccgtctg gggagatggt 3180  
 15 caccgtgggc aagagctcg acggcactcc tgaccgcagg tggctctca gggatgga 3240  
 ggtgaactgg tctcactgga accagaactt gggcatcatc aacgaggacc cgggcaagaa 3300  
 tgagacctac cagtattatg gcttctcga taccgtgggc cgcctccga gggatcgtg 3360  
 gtctcgggtg glaccccgcg tggtggaact gaacaagaac tcgaaccgg acgaggtggt 3420  
 20 ggtgcctctg gacagcatgg ggaacccccg ctgcgatggc caccagcagg gttacccccg 3480  
 caagtggagg actgatgacg ccccgtcta gggactgcag cccagcccca gcttctctg 3540  
 ccactcattt ctatccagc cgcattttag cagtgccttc tggggtgtcc cccacaccc 3600  
 tgccttgccc ccagaggcga gggaccagtg gaggtgccag ggaggcccca ggacctgtg 3660  
 gtcccctggc tctgcctccc caccctgggg tgggggtcc cggccacctg tctgtctct 3720  
 25 atggagtcac ataagccaac gccagagccc ctccacctca ggccccagcc cctgcctctc 3780  
 cattatttat ttgtctgtc ctacaggaagc gacgtgaccc ctgccccagc tggaaacctg 3840  
 cagaggcctt aggaccccgt tcaaagtga ctgcccggcc aagccccagc ctacgctgc 3900  
 gcctgagctg catgcgccac cattttggc agcgtggcag ctttgaagg ggctggggcc 3960  
 30 ctggcggtgg ggccatgcct tctgtgtgt ctgtagtgtc tgggatitgc cgtgtctcaa 4020  
 taaatgttta ttcattgacg gtggaaaaaa aaaaaaaaaa 4059

<210> 12

<211> 742

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro  
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser  
 35 40 45

# ES 2 300 318 T3

5 Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg  
 50 55 60  
 10 Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val  
 85 90 95  
 15 Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr  
 100 105 110  
 20 Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile  
 115 120 125  
 25 Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro  
 130 135 140  
 30 Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg  
 145 150 155 160  
 35 Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His  
 165 170 175  
 40 Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys  
 180 185 190  
 45 Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp  
 195 200 205  
 50 Thr Ile Pro Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg  
 210 215 220  
 55 Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr  
 225 230 235 240  
 60 Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu  
 245 250 255  
 65 Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe  
 260 265 270

# ES 2 300 318 T3

5 Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro  
 275 280 285  
 Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu  
 290 295 300  
 10 Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg  
 305 310 315 320  
 Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg  
 325 330 335  
 15 Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Leu Lys  
 340 345 350  
 20 Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn  
 355 360 365  
 Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly  
 370 375 380  
 25  
 30 Ile Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg  
 385 390 395 400  
 His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser  
 405 410 415  
 35 Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Ala Ser  
 420 425 430  
 40 Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu  
 435 440 445  
 45 Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg  
 450 455 460  
 Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys  
 465 470 475 480  
 50  
 55  
 60  
 65

# ES 2 300 318 T3

Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly  
485 490 495

5 Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala  
500 505 510

Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Phe Thr Asn  
10 515 520 525

Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe  
530 535 540

15 Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val  
545 550 555 560

Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala  
20 565 570 575

Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe  
580 585 590

25 Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys  
595 600 605

Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe  
30 610 615 620

Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asn Pro Cys Ala  
625 630 635 640

35 Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys Thr Val Pro Thr  
645 650 655

Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr Phe Leu Leu Asp  
40 660 665 670

Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser  
675 680 685

45 Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val Thr Tyr Ile Ile  
690 695 700

Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu  
50 705 710 715 720

Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile Trp Lys Leu Gln  
725 730 735

55 Ser Gly Arg Arg Arg Leu  
740

60 <210> 13

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

## ES 2 300 318 T3

<400> 13

ctacctgacg gagaaccccc acaag

25

5

<210> 14

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

15

<400> 14

gtagtaggcg gtgagactga agatga

26

20

<210> 15

<211> 51

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

30

<400> 15

aacgttggcg gccgcgccac catggcggat tccagcgaag gccccgcgc g

51

35

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

45

<400> 16

aacgtttcta gactgggctg cagtcctag

30

50

<210> 17

<211> 233

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de Micromatriz de ADN

60

<400> 17

ccaccatcct ggacattgag cgctccttcc ccgtattcct gaggaaggcc ttccgctctg 60  
gggagatggc caccgtgggc aagagctcgg acggcactcc tgaccgcagt ggtgcttcag 120  
ggtggatgag gtgaactggc ctcactggaa ccagaacttg ggcatcatca acgaggaccc 180  
gggcaagaat gagacctacc agtattatgg ctctcgcgat accgtgggcc gcc 233

65

## ES 2 300 318 T3

### LISTADO DE SECUENCIAS

|    |                                                                         |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <110> Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.                                 |    |
| 5  | <120> ADN que codifica las Isoformas del Receptor Vanilloide VR3 humano |    |
|    | <130> P031355EP                                                         |    |
| 10 | <140> 01908798.0                                                        |    |
|    | <141> 2001-02-01                                                        |    |
| 15 | <150> US 09/500123                                                      |    |
|    | <151> 2000-02-08                                                        |    |
|    | <160> 17                                                                |    |
| 20 | <170> PatentIn Ver. 2.1                                                 |    |
|    | <210> 1                                                                 |    |
| 25 | <211> 26                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                              |    |
| 30 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación      |    |
|    | <400> 1                                                                 |    |
| 35 | accggcctat cctctttgac atcgtg                                            | 26 |
|    | <210> 2                                                                 |    |
| 40 | <211> 25                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                              |    |
| 45 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación      |    |
|    | <400> 2                                                                 |    |
| 50 | tgtccgcctt cttgtggggg ttctc                                             | 25 |
|    | <210> 3                                                                 |    |
| 55 | <211> 48                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                              |    |
| 60 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación      |    |
|    | <400> 3                                                                 |    |
| 65 | aacgttggtgta cgcaccat gccgattcc agcgaaggcc cccgcgcg                     | 48 |

# ES 2 300 318 T3

<210> 4

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación

10

<400> 4

taaagcggcc gcttcaggag ggacatcggt gaggctcac

39

15

<210> 5

<211> 2616

<212> ADN

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

25

```

atggcggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggcccgggg aggtggctga gctccccggg 60
gatgagagtg gcacccaggg tggggaggct ttctctctct cctccctggc caatctgttt 120
gagggggagg atggctccct ttgcgcttca ccggctgatg ccagtcgccc tgctggccca 180
ggcgatgggc gaccaaattct gcgcattgaag ttccaggggc ccttccgcaa gggggtgccc 240
aaccctatcg atctgctgga gtccaccctt tatgagtcct cgggtggtgc tgggcccagg 300
aaagcaccca tggactcact gtttgactac ggcacctatc gtcaccactc cagtgacaac 360
aagaggtgga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gcccacaaag cctgcccct 420
cagccgcccc ccatcctcaa agtcttcaac cggcctatcc tctttgacat cgtgtccccg 480
ggctccactg ctgacctgga cgggctgctc ccattcttgc tgaccacaa gaaacgccta 540
actgatgagg agtttcgaga gccatctacg gggaagacct gcctgcccaa ggcttctgtg 600
aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tggacatcgc ggagcgacc 660
ggcaacacag gggagttcat taactcgccc ttccgtgaca tctactatcg aggtcagaca 720
gccctgcaca tcgccattga gcgtcgctgc aaacactacg tggaaactct cgtggccagg 780
ggagctgatg tccacgcccc ggcccggtgg cgcttcttcc agcccaagga tgaggggggc 840
tacttctact ttggggagct gcccctgtcg ctggctgcct gcaccaacca gcccacatt 900
gtcaactacc tgacggagaa cccccacaa gaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcca 960
ggcaacacag tgctgcatgc gctgggtggc attgctgaca acaccctga gaacaccaag 1020
tttgttacca agatgtacga cctgctgctg ctcaagtgtg cccgctctct ccccgacagc 1080
aacctggagg ccgtgctcaa caacgacggc ctctcgcccc tcatgatggc tgccaagacg 1140
ggcaagattg ggcattttca gcacatcatc cggcgggagg tgacggatga ggacacacgg 1200
cacctgtccc gcaagttcaa ggactgggcc tatgggccag tgtattcttc gctttatgac 1260
ctctectccc tggacacgtg tggggaagag gctccgtgc tggagatcct ggtgtacaac 1320
agcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgctgcgg 1380
gacaagtggc gcaagttcgg ggccgtctcc ttctacatca acgtggtctc ctacctgtgt 1440
gccatggtca tcttcaactc caccgcctac taccagccgc tggagggcac accgcgctac 1500
ccttaccgca ccaagggtga ctacctgcgg ctggctggcg aggtcattac gctcttctac 1560
gggttctgt tcttcatcac caacatcaa gacttgttca tgaagaaatg cctggagtg 1620
aattctctct tcatgtatgg ctcttccag ctgctctact tcatctactc tgcctggtg 1680
atcgtctcag cagccctcta cctggcaggg atcgaggcct acctggccgt gatggtcttt 1740
gccctggtcc tgggctggat gaatgccctt tacttcaccc gtgggctgaa gctgacgggg 1800
acctatagca tcatgatcca gaagattctc ttcaaggacc tttccgatt cctgctctgc 1860
tacttgctct tcatgatcgg ctacgcttca gccctggtct cctcctgaa cccgtgtgcc 1920
aacatgaagg tgtgcaatga ggaccagacc aactgcacag tgcccactta cccctcgtgc 1980
cgtgacagcg agaccttcag cacttctctc ctggacctgt ttaagctgac catcggcattg 2040
ggcgacctgg agatgctgag cagcaccaag taccctgtgg tcttcatcat cctgctggtg 2100
acctacatca tcttcacctt tgtgctgctc ctcaacatgc tcattgccct catgggagag 2160
acagtgggac aggtctccaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagtg ggcacaccac 2220
atcctggaca ttgagcgctc cttcccgcta ttcttgagga aggccttccg ctctggggag 2280
atggctaccg tgggcaagag ctcgacggc actcctgacc gcagggtgtg ctacaggggtg 2340
gatgaggtga actggtctca ctggaaccag aacttgggca tcatcaacga ggaccggggc 2400
aagaatgaga cctaccagta ttatggcttc tcgcataacc tgggcccgtc ccgcagggat 2460
cgctggtcct cgtggttacc ccgctggtg gaactgaaca agaactcgaa cccggacagag 2520
gtggtggtgc ctctggacag catggggaac cccgctgcg atggccacca gcagggttac 2580
ccccgcaagt ggaggactga tgacgccccg ctctag 2616

```

65

# ES 2 300 318 T3

<210> 6

<211> 3500

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

|    |             |             |            |             |             |            |      |
|----|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| 10 | caattgggat  | ttaaaccag   | ggactatcca | gccccaaagc  | ccttcccacc  | acaccaggtg | 60   |
|    | gcctgtcctg  | gggccagctc  | tgcacacagg | gcctggtgcc  | cccggggtgc  | ttgggaagtg | 120  |
|    | gcagggcaga  | ggtgggccct  | gtggctgttc | tggctcagct  | tctaaaacaa  | gagcctctgc | 180  |
|    | tgggggcaga  | ggggccgtga  | acccctgaaa | tgttaggcag  | ataccctgtg  | ggagctttgt | 240  |
|    | tctgggatgc  | taagaaccgc  | ttgaggattt | aagctttgcc  | actttggctc  | cggagcaagg | 300  |
|    | gcagaggtcg  | agcagtgcag  | acgggcctgg | ggcaggcatg  | gcggattcca  | gcgaaggccc | 360  |
| 15 | ccgcgcgggg  | cccggggagg  | tggctgagct | ccccggggat  | gagagtggca  | ccccaggtgg | 420  |
|    | ggaggtcttt  | cctctctcct  | ccctggccaa | tctgtttgag  | ggggaggatg  | gctccctttc | 480  |
|    | gcctcaccgc  | gctgatgcc   | gtcgccctgc | tggcccaggc  | gatgggcgac  | caaactctgc | 540  |
|    | catgaagttc  | cagggcgcct  | tccgcaaggg | ggtgcccaac  | cccacgatc   | tgctggagtc | 600  |
|    | caccctatat  | gagtcctcgg  | tggcgctgg  | gccccagaaa  | gcacccatgg  | actcactgtt | 660  |
| 20 | tgactacggc  | acctatcgtc  | accactccag | tgacaacaag  | aggtggagga  | agaagatcat | 720  |
|    | agagaagcag  | ccgcagagcc  | ccaaagcccc | tgcccctcag  | ccgcccccca  | tcctcaaagt | 780  |
|    | cttcaaccgg  | cctatcctct  | ttgacatcgt | gtcccggggc  | tccactgctg  | acctggacgg | 840  |
|    | gctgctccca  | ttcttgctga  | cccacaagaa | acgcctaact  | gatgaggagt  | ttcgagagcc | 900  |
|    | atctacgggg  | aagacctgcc  | tgcccaggcc | cttgctgaac  | ctgagcaatg  | gccgcaacga | 960  |
| 25 | caccatccct  | gtgctgctgg  | acatcgcgga | gcgcaccggc  | aacatgcggg  | agttcattaa | 1020 |
|    | ctcgcccttc  | cgtgacatct  | actatcgagg | tcagacagcc  | ctgcacatcg  | ccattgagcg | 1080 |
|    | tcgctgcaaa  | cactacgtgg  | aacttctcgt | ggcccaggga  | gctgatgtcc  | acgcccaggc | 1140 |
|    | ccgtgggcgc  | ttcttccagc  | ccaaggatga | ggggggctac  | ttctactttg  | gggagctgcc | 1200 |
|    | cctgtcgctg  | gctgcctgca  | ccaaccagcc | ccacattgtc  | aactacctga  | cggagaaccc | 1260 |
|    | ccacaagaag  | gcggacatgc  | ggcgccagga | ctcgcgaggc  | aacacagtgc  | tgcatgcgct | 1320 |
| 30 | ggtggccatt  | gctgacaaca  | cccgtagaaa | caccaagttd  | gttaccaaga  | tgtacgacct | 1380 |
|    | gctgctgctc  | aagtgtgccc  | gcctcttccc | cgacagcaac  | ctggaggccg  | tgctcaacaa | 1440 |
|    | cgacggcgatc | tcgcccctca  | tgatggctgc | caagacgggc  | aagattggga  | tctttcagca | 1500 |
|    | catcatccgg  | cgggaggtga  | cggatgagga | cacacggcac  | ctgtcccgca  | agttcaagga | 1560 |
|    | ctgggcctat  | gggccagtg   | attcctcgct | ttatgacctc  | tcctccctgg  | acacgtgtgg | 1620 |
| 35 | ggaagaggcc  | tccgtgctgg  | agatcctggt | gtacaacagc  | aagattgaga  | accgccacga | 1680 |
|    | gatgctggct  | gtggagccca  | tcaatgaact | gctgcgggac  | aagtggcgca  | agttcggggc | 1740 |
|    | cgtctccttc  | tacatcaacg  | tggctctcta | cctgtgtgcc  | atggtcatct  | tcactctcac | 1800 |
|    | cgctacttac  | cagccgctgg  | agggcacacc | gcccgtaccct | taccgcacca  | cggaggacta | 1860 |
|    | cctgcggctg  | gctggcgagg  | tcattacgct | cttccactgg  | gtcctgttct  | tcatacccaa | 1920 |
|    | catcaaagac  | ttgttcatga  | agaaatgccc | tggagtgaat  | tctctcttca  | ttgatggctc | 1980 |
| 40 | cttccagctg  | ctctacttca  | tctactctgt | cctggtgac   | gtctcagcag  | ccctctacct | 2040 |
|    | ggcagggatc  | gaggccctacc | tggccgtgat | ggtctttgcc  | ctggtcctgg  | gctggatgaa | 2100 |
|    | tgccctttac  | ttcaccctgg  | ggctgaagct | gacggggacc  | tatagcatca  | tgatccagaa | 2160 |
|    | gattctcttc  | aaggaccttt  | tccgattcct | gctcgtctac  | ttgctcttca  | tgatcggcta | 2220 |
|    | cgcttcagcc  | ctggtctccc  | tcctgaaccc | gtgtgccaa   | atgaagggtg  | gcaatgagga | 2280 |
| 45 | ccagaccaac  | tgacagtgcc  | ccacttacc  | ctcgtgcggt  | gacagcgaga  | ccttcagcac | 2340 |
|    | cttccctctg  | gacctgttta  | agctgacct  | cggcatgggc  | gacctggaga  | tgctgagcag | 2400 |
|    | caccaagtac  | cccgtggtct  | tcacatcct  | gctggtgacc  | tacatcatcc  | tcacctttgt | 2460 |
|    | gctgctcctc  | aacatgctca  | ttgccctcat | gggcgagaca  | gtgggcccagg | tctccaagga | 2520 |
|    | gagcaagcac  | atctggaagc  | tgcagtgggc | caccaccatc  | ctggacattg  | agcgctcctt | 2580 |
|    | cccgttattc  | ctgaggaagg  | ccttccgctc | tggggagatg  | gtcaccgtgg  | gcaagagctc | 2640 |
| 50 | ggacggcact  | cctgaccgca  | ggtggtgctt | cagggtggat  | gaggtgaact  | ggtctcactg | 2700 |
|    | gaaccagaac  | ttgggcatca  | tcaacgagga | cccgggcaag  | aatgagacct  | accagtatta | 2760 |
|    | tggcttctcg  | cataccgtgg  | gccgcctccg | cagggatcgc  | tggctcctcg  | tggtaccccg | 2820 |
|    | cgtggtggaa  | ctgaacaaga  | actcgaaccc | ggacgaggtg  | gtggtgcctc  | tggacagcat | 2880 |
|    | ggggaaacccc | cgctgcgatg  | gcttaccgcc | gggttaccgc  | cgcaagtggg  | ggactgatga | 2940 |
| 55 | cgccccgctc  | tagggactgc  | agcccagccc | cagcttctct  | gcccactcat  | ttctagtcca | 3000 |
|    | gccgcatttc  | agcagtgcct  | tctggggtgt | ccccccacac  | cctgcttttg  | ccccagaggc | 3060 |
|    | gagggaccag  | tggaggtgcc  | agggaggccc | caggaccctg  | tggtcccctg  | gctctgcctc | 3120 |
|    | cccaccctgg  | ggtgggggct  | cccggccacc | tgtcttgctc  | ctatggagtc  | acataagcca | 3180 |
|    | acgccagagc  | ccctccacct  | caggccccag | ccccctgcct  | tcattatttt  | atttgccttg | 3240 |
| 60 | ctctcaggaa  | gcgacgtgac  | ccctgcccc  | gctggaacct  | ggcagaggcc  | ttaggacccc | 3300 |
|    |             |             |            |             |             |            |      |
|    | gttccaagtg  | cactgcccgg  | ccaagcccca | gcctcagcct  | gcgcctgagc  | tgcatgcgcc | 3360 |
|    | accatttttg  | gcagcgtggc  | agctttgcaa | ggggctgggg  | ccctcggcgt  | ggggccatgc | 3420 |
| 65 | cttctgtgtg  | ttctgtagtg  | tctgggattt | gccgggtgctc | aataaatgtt  | tattcattga | 3480 |
|    | cgggtgaaaa  | aaaaaaaaaa  |            |             |             |            | 3500 |

# ES 2 300 318 T3

<210> 7

<211> 871

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

```

10      Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala
        1          5          10          15

      Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro
        20          25          30

15      Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser
        35          40          45

      Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg
        50          55          60

20      Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro
        65          70          75          80

      Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val
        85          90          95

      Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr
        100          105          110

30      Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile
        115          120          125

      Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro
        130          135          140

35      Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg
        145          150          155          160

      Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His
        165          170          175

40      Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys
        180          185          190

      Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp
        195          200          205

45      Thr Ile Pro Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg
        210          215          220

      Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr
        225          230          235          240

      Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu
        245          250          255

55      Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe

```

60

65

# ES 2 300 318 T3

|    | 260                                                                                | 265 | 270 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro<br>275 280 285     |     |     |
|    | Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu<br>290 295 300     |     |     |
| 10 | Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg<br>305 310 315 320 |     |     |
|    | Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg<br>325 330 335     |     |     |
| 15 | Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Lys<br>340 345 350         |     |     |
|    | Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn<br>355 360 365     |     |     |
| 20 | Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly<br>370 375 380     |     |     |
|    | Ile Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg<br>385 390 395 400 |     |     |
| 25 | His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser<br>405 410 415     |     |     |
|    | Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Ala Ser<br>420 425 430     |     |     |
| 30 | Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu<br>435 440 445     |     |     |
|    | Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg<br>450 455 460     |     |     |
| 35 | Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys<br>465 470 475 480 |     |     |
|    | Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly<br>485 490 495     |     |     |
| 40 | Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala<br>500 505 510     |     |     |
|    | Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Ile Thr Asn<br>515 520 525     |     |     |
| 45 | Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe<br>530 535 540     |     |     |
|    | Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val<br>545 550 555 560 |     |     |
| 50 | Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala<br>565 570 575     |     |     |
|    | Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe<br>580 585 590     |     |     |

# ES 2 300 318 T3

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Thr | Arg | Gly | Leu | Lys | Leu | Thr | Gly | Thr | Tyr | Ser | Ile | Met | Ile | Gln | Lys |  |
|    |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |
| 5  | Ile | Leu | Phe | Lys | Asp | Leu | Phe | Arg | Phe | Leu | Leu | Val | Tyr | Leu | Leu | Phe |  |
|    |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |
|    | Met | Ile | Gly | Tyr | Ala | Ser | Ala | Leu | Val | Ser | Leu | Leu | Asn | Pro | Cys | Ala |  |
|    | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |
| 10 | Asn | Met | Lys | Val | Cys | Asn | Glu | Asp | Gln | Thr | Asn | Cys | Thr | Val | Pro | Thr |  |
|    |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |
|    | Tyr | Pro | Ser | Cys | Arg | Asp | Ser | Glu | Thr | Phe | Ser | Thr | Phe | Leu | Leu | Asp |  |
| 15 |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |
|    | Leu | Phe | Lys | Leu | Thr | Ile | Gly | Met | Gly | Asp | Leu | Glu | Met | Leu | Ser | Ser |  |
|    |     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |
| 20 | Thr | Lys | Tyr | Pro | Val | Val | Phe | Ile | Ile | Leu | Leu | Val | Thr | Tyr | Ile | Ile |  |
|    |     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |
|    | Leu | Thr | Phe | Val | Leu | Leu | Leu | Asn | Met | Leu | Ile | Ala | Leu | Met | Gly | Glu |  |
|    | 705 |     |     |     | 710 |     |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |
| 25 | Thr | Val | Gly | Gln | Val | Ser | Lys | Glu | Ser | Lys | His | Ile | Trp | Lys | Leu | Gln |  |
|    |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |
|    | Trp | Ala | Thr | Thr | Ile | Leu | Asp | Ile | Glu | Arg | Ser | Phe | Pro | Val | Phe | Leu |  |
|    |     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |  |
| 30 | Arg | Lys | Ala | Phe | Arg | Ser | Gly | Glu | Met | Val | Thr | Val | Gly | Lys | Ser | Ser |  |
|    |     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |  |
|    | Asp | Gly | Thr | Pro | Asp | Arg | Arg | Trp | Cys | Phe | Arg | Val | Asp | Glu | Val | Asn |  |
|    |     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |  |
| 35 | Trp | Ser | His | Trp | Asn | Gln | Asn | Leu | Gly | Ile | Ile | Asn | Glu | Asp | Pro | Gly |  |
|    | 785 |     |     |     | 790 |     |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |  |
|    | Lys | Asn | Glu | Thr | Tyr | Gln | Tyr | Tyr | Gly | Phe | Ser | His | Thr | Val | Gly | Arg |  |
| 40 |     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |  |
|    | Leu | Arg | Arg | Asp | Arg | Trp | Ser | Ser | Val | Val | Pro | Arg | Val | Val | Glu | Leu |  |
|    |     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |  |
| 45 | Asn | Lys | Asn | Ser | Asn | Pro | Asp | Glu | Val | Val | Val | Pro | Leu | Asp | Ser | Met |  |
|    |     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |  |
|    | Gly | Asn | Pro | Arg | Cys | Asp | Gly | His | Gln | Gln | Gly | Tyr | Pro | Arg | Lys | Trp |  |
|    |     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |  |
| 50 | Arg | Thr | Asp | Asp | Ala | Pro | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

<210> 8

<211> 2436

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 300 318 T3

<400> 8

```

5      atggcggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggcccgggg aggtggctga gctccccggg 60
      gatgagagtg gcaccccagg tggggaggct tttcctctct cctccctggc caatctgttt 120
      gagggggagg atggctccct ttcgccctca ccggtgatg ccagtcgccc tgctggccca 180
      ggcgatgggc gaccaaactc gcgcatgaag ttccaggcgc ccttcgcaa ggggggtgcc 240
      aaccccatcg atctgtctga gtccacccta tatgagtcct cgggtggtgcc tgggcccagg 300
      aaagcaccca tggactcact gtttgactac ggcacctatc gtcaccactc cagtacaac 360
10     aagaggtgga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gccccaaagc ccctgccct 420
      cagccgcccc ccacctcaa agtcttcaac cggcctatcc tctttgacat cgtgtcccg 480
      ggctccactg ctgacctgga cgggctgctc ccattcttgc tgaccacaa gaaacgcta 540
      actgatgagg agtttcgaga gccatctacg gggaagacct gcctgcccga ggccttgctg 600
      aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tggacatcgc ggagcgcacc 660
      ggcaacatgc gggagtccat taactcgccc ttccgtgaca tctactatcg aggtcagaca 720
15     gccctgcaca tcgccattga gcgtcgctgc aaacactacg tggaaactct cgtggcccag 780
      ggagctgatg tccacgcccc ggcctgtggg cgcttcttcc agcccaagga tgaggggggc 840
      tacttctact ttggggagct gccctgtcgc ctggtgcct gcaccaacca gcccacatt 900
      gtcaactacc tgacggagaa cccccacaag aaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcga 960
      ggcaacacag tgctgcatgc gctgggtggc attgctgaca acaccgtga gaacaccaag 1020
20     tttgttacca agatgtacga cctgctgctg ctcaagtgtg cccgcctctt ccccgacagc 1080
      aacctggagg ccgtgctcaa caacgacggc ctctcgcccc tcatgatggc tgccaagacg 1140
      ggcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgtgcgg 1200
      gacaagtggc gcaagttcgg ggccgtctcc ttctacatca acgtggtctc ctacctgtgt 1260
      gccatggtca tcttactctc caccgcctac taccagccgc tggagggcac accgcgtac 1320
25     ccttaccgca ccacggtgga ctacctgcgg ctggctggcg aggtcattac gctcttact 1380
      ggggtcctgt tcttcatcac caacatcaaa gacttggtca tgaagaaatg ccctggagtg 1440
      aattctctct tcattgatgg ctccctccag ctgctctact tcatctactc tgtcctgggtg 1500
      atcgtctcag cagccctcta cctggcaggg atcgaggcct acctggcgt gatgtcttt 1560
      gccctggtcc tgggctggat gaatgccctt tacttcaccc gtgggctgaa gctgacgggg 1620
      acctatagca tcatgatcca gaagattctc tcaaggacc ttttccgatt cctgctcgtc 1680
30     tacttgctct tcatgatcgg ctacgcttca gccctggtct cctcctgaa cccgtgtgcc 1740
      aacatgaagg tgtcaatga ggaccagacc aactgcacag tgcccactta cccctcgtgc 1800
      cgtgacagcg agaccttcag caccttcctc ctggacctgt ttaagctgac catcggcag 1860
      ggcgacctgg agatgctgag cagcaccaag taaccctgtg tcttcatcat cctgctgggtg 1920
      acctacatca tctcacctt tgtgctgctc ctcaacatgc tcattgccct catgggcgag 1980
35     acagtgggccc aggtctccaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagtg ggccaccacc 2040
      atcctggaca ttgagcgctc cttccccgta ttctgagga aggccttccg ctctggggag 2100
      atggtcaccg tgggcaagag ctcgacggc actcctgacc gcaggtgggtg cttcagggtg 2160
      gatgaggtga actggctctc ctggaaccag aacttgggca tcatcaacga ggaccggggc 2220
      aagaatgaga cctaccagta ttatggcttc tcgcataacc tgggcccgcct ccgagggat 2280
40     cgctggctct cggtggtacc ccgcgtgggt gaactgaaca agaactcga cccggacgag 2340
      gtggtgggtg ctctggacag catggggaac cccgcgtgcg atggccacca gcagggttac 2400
      ccccgcaagt ggaggactga tgacgccccg ctctag 2436

```

45 <210> 9

<211> 811

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 9

```

55      Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala
          1             5             10             15

      Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro
          20             25             30

60      Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser
          35             40             45

      Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg
          50             55             60

```

65

# ES 2 300 318 T3

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

# ES 2 300 318 T3

Asn Arg His Glu Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg  
 385 390 395 400  
 5 Asp Lys Trp Arg Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val  
 405 410 415  
 Ser Tyr Leu Cys Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln  
 420 425 430  
 10 Pro Leu Glu Gly Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr  
 435 440 445  
 Leu Arg Leu Ala Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe  
 450 455 460  
 15 Phe Ile Thr Asn Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val  
 465 470 475 480  
 Asn Ser Leu Phe Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr  
 485 490 495  
 20 Ser Val Leu Val Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu  
 500 505 510  
 Ala Tyr Leu Ala Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn  
 515 520 525  
 25 Ala Leu Tyr Phe Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile  
 530 535 540  
 Met Ile Gln Lys Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val  
 545 550 555 560  
 30 Tyr Leu Leu Phe Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu  
 565 570 575  
 Asn Pro Cys Ala Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys  
 580 585 590  
 35 Thr Val Pro Thr Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr  
 595 600 605  
 Phe Leu Leu Asp Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu  
 610 615 620  
 40 Met Leu Ser Ser Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val  
 625 630 635 640  
 Thr Tyr Ile Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala  
 645 650 655  
 45 Leu Met Gly Glu Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile  
 660 665 670  
 Trp Lys Leu Gln Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe  
 675 680 685  
 50 Pro Val Phe Leu Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val  
 690 695 700  
 55 Gly Lys Ser Ser Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val

# ES 2 300 318 T3

|    |                                                                         |     |     |  |     |  |      |
|----|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|--|-----|--|------|
|    | 705                                                                     |     | 710 |  | 715 |  | 720  |
|    | Asp Glu Val Asn Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn         |     |     |  |     |  |      |
|    |                                                                         | 725 |     |  | 730 |  | 735  |
| 5  | Glu Asp Pro Gly Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His         |     |     |  |     |  |      |
|    |                                                                         | 740 |     |  | 745 |  | 750  |
|    | Thr Val Gly Arg Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg         |     |     |  |     |  |      |
| 10 |                                                                         | 755 |     |  | 760 |  | 765  |
|    | Val Val Glu Leu Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val Pro         |     |     |  |     |  |      |
|    |                                                                         | 770 |     |  | 775 |  | 780  |
| 15 | Leu Asp Ser Met Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr         |     |     |  |     |  |      |
|    |                                                                         | 785 |     |  | 790 |  | 795  |
|    |                                                                         |     |     |  |     |  | 800  |
|    | Pro Arg Lys Trp Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu                             |     |     |  |     |  |      |
|    |                                                                         | 805 |     |  | 810 |  |      |
| 20 |                                                                         |     |     |  |     |  |      |
|    | <210> 10                                                                |     |     |  |     |  |      |
|    | <211> 2229                                                              |     |     |  |     |  |      |
|    | <212> ADN                                                               |     |     |  |     |  |      |
| 25 | <213> <i>Homo sapiens</i>                                               |     |     |  |     |  |      |
|    | <400> 10                                                                |     |     |  |     |  |      |
| 30 |                                                                         |     |     |  |     |  |      |
|    | atggcgaggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggccccggg aggtggctga gctccccggg 60  |     |     |  |     |  |      |
|    | gatgagagtg gcaccccagg tggggaggct ttctctctct cctccctggc caatctgttt 120   |     |     |  |     |  |      |
|    | gagggggagg atggctccct ttgcacctca cgggtgatg ccagtcgccc tgctggccca 180    |     |     |  |     |  |      |
| 35 | ggcgatgggc gaccaaactt gcgcataaag ttccaggcgc ccttccgcaa ggggggtgcc 240   |     |     |  |     |  |      |
|    | aacccccatcg atctgctgga gtccacctta tatgagtcct cgggtggtgcc tgggcccagg 300 |     |     |  |     |  |      |
|    | aaagcaccca tggactcact gtttgactac ggcacctatc gtccacctc cagtgcacac 360    |     |     |  |     |  |      |
|    | aagaggtgga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gccccaaagc ccctgcccct 420   |     |     |  |     |  |      |
|    | cagccgcccc ccattcctcaa agtcttcaac cggcctatcc tctttgacat cgtgtcccg 480   |     |     |  |     |  |      |
|    | ggctccactg ctgacctgga cgggtgctc ccattcttgc tgaccacaaa gaaacgccta 540    |     |     |  |     |  |      |
| 40 | actgatgagg agtttcgaga gccatctacg gggaagacct gcctgcccga ggcttgctg 600    |     |     |  |     |  |      |
|    | aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tgacatcgc ggagcgcacc 660    |     |     |  |     |  |      |
|    | ggcaacatga gggagttcat taactcgccc ttccgtgaca tctactatcg aggtcagaca 720   |     |     |  |     |  |      |
|    | gccctgcaca tcgccattga gcgtcgctgc aaacactacg ttggaacttc cgtggcccag 780   |     |     |  |     |  |      |
|    | ggagctgatg tccacgcccc ggcccgtggg cgcttcttcc agccccaggga tgaggggggc 840  |     |     |  |     |  |      |
|    | tacttctact ttggggagct gcccctgtcg ctggctgcct gcaccaacca gcccacatt 900    |     |     |  |     |  |      |
| 45 | gtcaactacc tgacggaaga cccccacaag aaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcga 960   |     |     |  |     |  |      |
|    | ggcaacacag tgctgcatac gctggtggcc attgtgaca acacccgtga gaacaccaag 1020   |     |     |  |     |  |      |
|    | tttgttacca agatgtacga cctgtgctg ctcaagtgtg cccgcctctt ccccgacagc 1080   |     |     |  |     |  |      |
|    | aacctggagg ccgtgctcaa caacgacggc ctctcgcccc tcatgatggc tgccaagagc 1140  |     |     |  |     |  |      |
|    | ggcaagattg ggatctttca gcacatcatc cggcgggagg tgacggatga ggacacacgg 1200  |     |     |  |     |  |      |
| 50 | cacctgtccc gcaagttcaa ggactgggcc tatgggccaag tgtattcctc gctttatgac 1260 |     |     |  |     |  |      |
|    | ctctctctcc tggacacgtg tggggaagag gcctccgtgc tggagatcct ggtgtacaac 1320  |     |     |  |     |  |      |
|    | agcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgctgcgg 1380  |     |     |  |     |  |      |
|    | gacaagtggc gcaagtccgg ggccgtctcc acgtggtctc ctacctgtgt 1440             |     |     |  |     |  |      |
|    | gccatggtea tcttactctt caccgcctac taccagccgc tggagggcac accgcccgtac 1500 |     |     |  |     |  |      |
| 55 | ccttaccgca ccacgggtgga ctacctgcgg ctggctggcg aggtcattac gctcttact 1560  |     |     |  |     |  |      |
|    | ggggctcctg tcttcttctc caacatcaaa gacttggtca tgaagaaatg ccctggagtg 1620  |     |     |  |     |  |      |
|    | aattctctct tcatgtatgg ctcttccag ctgctctact tcatctactc tgtcctggtg 1680   |     |     |  |     |  |      |
|    | atcgctcag cagccctcta cctggcaggg atcgaggcct acctggccgt gatggtcttt 1740   |     |     |  |     |  |      |
|    | gccctggtcc tgggctggat gaatgccctt tacttcaccc gtgggctgaa gctgacgggg 1800  |     |     |  |     |  |      |
| 60 | acctatagca tcatgatcca gaagattctc ttcaaggacc ttttccgatt cctgctcgtc 1860  |     |     |  |     |  |      |
|    | tacttgctct tcatgatcgg ctacgcttca gccctggtct ccctcctgaa cccgtgtgcc 1920  |     |     |  |     |  |      |
|    | aacatgaagg tgtgcaatga ggaccagacc aactgcacag tgcccactta cccctcgtgc 1980  |     |     |  |     |  |      |
|    | cgtgacagcg agaccttcag caccttctct ctggacctgt ttaagctgac catcggcagc 2040  |     |     |  |     |  |      |
|    | ggcgacctgg agatgctgag cagcaccaag taccctggtg tcttcatcat cctgctggtg 2100  |     |     |  |     |  |      |
|    | acctacatca tcctcacctt tgtgctgctc ctcaacatgc tcattgccct catgggcgag 2160  |     |     |  |     |  |      |
| 65 | acagtgggcc aggtctccaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagag cggcaggcgc 2220  |     |     |  |     |  |      |
|    | aggctgtga                                                               |     |     |  |     |  | 2229 |

# ES 2 300 318 T3

<210> 11

<211> 4059

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

|    |             |            |             |            |             |             |      |
|----|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| 10 | tgtgcaggcc  | agggagggct | ttccagagga  | gcccagttga | gctggaacac  | cagtggggag  | 60   |
|    | gagttgacca  | gcaaagggtc | agggagggat  | cagcactttg | cactggggag  | cagagtttgt  | 120  |
|    | gcactgggga  | agtcactca  | agtattggag  | cctcagtttc | ctgttctgta  | aaatgggttc  | 180  |
|    | atcatgacag  | tgtttgatga | ggaaaaggac  | tgccggccta | cacagcaagt  | ccacatggat  | 240  |
|    | tttctgagcc  | cctcctgtgc | ctgaagccca  | cggttaatgg | ttctgcctta  | gcagggtgctt | 300  |
|    | accacgtgcc  | aggcactgca | ctgcactggc  | cactggactg | catgttctgt  | ccatgaggct  | 360  |
| 15 | tggatatccc  | catcttacag | atcaggaagc  | tgaggctatg | aaatgtcgac  | ttgctcaatg  | 420  |
|    | tcattggaatg | actaagtgtg | gagcctggat  | ttgaacttgg | ctctctgggg  | ctccaaagct  | 480  |
|    | ggctttctttg | gtcagcagta | gggtctggga  | tccaagtatg | gggtcccagc  | ttgaccctga  | 540  |
|    | agtccaccct  | ctttcagcta | atgcccagg   | tagttggacc | tggggccaat  | ttgtgtttcc  | 600  |
|    | aggttcgtga  | aagagctcct | gttgcagttc  | ccgcctgagg | cttggcggcc  | aaccacatct  | 660  |
| 20 | gggagtgggc  | tcctctgtgc | cctgtcatta  | caacggtggc | tttgaagcag  | ctggcagcac  | 720  |
|    | tgctgtctgt  | ccacgtggaa | gggggcttcc  | tggagcccc  | gccccctggc  | gggttctgcc  | 780  |
|    | tgactcccct  | ttcattccct | tgcaggctga  | gcagtgcaga | cgggcctggg  | gcaggcatgg  | 840  |
|    | cggattccag  | cgaaggcccc | cgcgcggggc  | ccggggaggt | ggctgagctc  | cccggggatg  | 900  |
|    | agagtggcac  | cccagggtgg | gaggcttttc  | ctctctcctc | cctggccaat  | ctgtttgag   | 960  |
| 25 | gggaggatgg  | ctccctttcg | ccctcacccg  | ctgatgccag | tcgcccctgt  | ggcccaggcg  | 1020 |
|    | atgggcgacc  | aaatctgcgc | atgaagtcc   | agggcgccct | ccgcaagggg  | gtgcccaacc  | 1080 |
|    | ccatcgatct  | gctggagtcc | accctatatg  | agtcctcggt | ggtgcctggg  | cccaagaaaag | 1140 |
|    | cacccatgga  | ctcactgttt | gactacggca  | cctatcgtea | ccactccagt  | gacaacaaga  | 1200 |
|    | ggtggaggaa  | gaagatcata | gagaagcagc  | gcagagccc  | caaagcccct  | gcccctcagc  | 1260 |
|    | cgccccccat  | cctcaaagtc | ttcaaccggc  | ctatcctctt | tgacatcgtg  | tcccggggct  | 1320 |
| 30 | ccactgctga  | cctggacggg | ctgctcccat  | tcttctgtac | ccacaagaaa  | cgccctaactg | 1380 |
|    | atgaggagtt  | tgcagagcca | lctacgggga  | agacctgcct | gcccaggcc   | ttgctgaacc  | 1440 |
|    | tgagcaatgg  | ccgcaacgac | accatcccctg | tgctgctgga | catcgcgag   | cgcaccggca  | 1500 |
|    | acatgaggga  | gttcattaac | tcgccccttc  | gtgacatcta | ctatcgaggt  | cagacagccc  | 1560 |
|    | tgcacatcgc  | cattgagcgt | cgctgcaaac  | actacgtgga | acttctcgtg  | gcccaggggag | 1620 |
| 35 | ctgatgtcca  | cgcccaggcc | cgtgggcgct  | tcttccagcc | caaggatgag  | gggggctact  | 1680 |
|    | tctacttttg  | ggagctgccc | ctgtcgctgg  | ctgcctgcac | caaccagccc  | cacattgtca  | 1740 |
|    | actacctgac  | ggagaacccc | cacaagaagg  | cgacatgcg  | gcgccaggac  | tcgagaggca  | 1800 |
|    | acacagtgtc  | gcatgcgctg | gtggccattg  | ctgacaacac | ccgtgagaac  | accaagtttg  | 1860 |
|    | ttaccaagat  | gtacgacctg | ctgctgctca  | agtgtgcccg | cctcttcccc  | gacagcaacc  | 1920 |
|    | tggaggccgt  | gctcaacaac | gacggcctct  | cgcccctcat | gatggctgcc  | aagacgggca  | 1980 |
| 40 | agattgggat  | ctttcagcac | atcatccggc  | gggaggtgac | ggatgaggac  | acacggcacc  | 2040 |
|    | tgtcccgcga  | gttcaaggac | tgggcctatg  | ggccagtgtg | ttcctcgctt  | tatgacctct  | 2100 |
|    | cctccctgga  | cacgtgtggg | gaagaggcct  | ccgtgctgga | gatecctggtg | tacaacagca  | 2160 |
|    | agattgagaa  | ccgccacgag | atgctggctg  | tggagcccat | caatgaactg  | ctgcgggaca  | 2220 |
|    | agtggcgcaa  | gttcggggcc | gtctccttct  | acatcaacgt | ggtctcctac  | ctgtgtgcca  | 2280 |
| 45 | tggtcatctt  | cactctcacc | gcctactacc  | agccgctgga | gggcacaccg  | ccgtaccctt  | 2340 |
|    | accgcaccac  | ggtggactac | ctgcggctgg  | ctggcgaggt | cattacgctc  | ttcactgggg  | 2400 |
|    | tcctgttctt  | cttcaccaac | atcaaagact  | tgttcatgaa | gaaatgccct  | ggagtgaatt  | 2460 |
|    | ctctcttcat  | tgatggctcc | ttccagctgc  | tctacttcat | ctactctgtc  | ctggtgatcg  | 2520 |
|    | tctcagcagc  | cctctacctg | gcagggatcg  | aggcctacct | ggcctgtatg  | gtctttgccc  | 2580 |
|    | tggctcctgg  | ctggatgaat | gccctttact  | tcacccgtgg | gctgaagctg  | acggggacct  | 2640 |
| 50 | atagcatcat  | gatccagaag | attctcttca  | aggacctttt | ccgattcctg  | ctcgtctact  | 2700 |
|    | tgtcttctcat | gatcggtac  | gcttcagccc  | tgggtctcct | cctgaacccg  | tgtgccaaca  | 2760 |
|    | tgaaggtgtg  | caatgaggac | cagaccaact  | gcacagtgcc | cacttacccc  | tcgtgccgtg  | 2820 |
|    | acagcgagac  | cttcagcacc | ttcctcctgg  | acctgtttaa | gctgaccatc  | ggcatgggcg  | 2880 |
| 55 | acctggagat  | gctgagcagc | accaagtacc  | ccgtggtctt | catcatcctg  | ctggtgacct  | 2940 |

60

65

# ES 2 300 318 T3

```

5      acatcaccct cacctttgtg ctgctcctca acatgctcat tgccctcatg ggcgagacag 3000
      tgggccaggt ctccaaggag agcaagcaca tctggaagct gcagagcggc aggcgcaggc 3060
      tgtgaggctc accgatgtcc ctccctgacc tccctccccg cagtgggcca ccaccatcct 3120
      ggacattgag cgctccttcc ccgtattcct gaggaaggcc ttccgctctg gggagatggg 3180
      caccgtgggc aagagctcgg acggcactcc tgaccgcagg tgggtgcttca ggggtggatga 3240
      ggtgaactgg tctcactgga accagaactt gggcatcatc aacgaggacc cgggcaagaa 3300
      tgagacctac cagtattatg gcttctcgca taccgtgggc cgctccgca gggatcgctg 3360
      gtcctcggtg gtaccccgcg tggtggaact gaacaagaac tcgaaccgga acgaggtggg 3420
      ggtgcctctg gacagcatgg ggaacccccg ctgcatgggc caccagcagg gttacccccg 3480
10     caagtggagg actgatgacg ccccgctcta gggactgcag cccagcccca gcttctctgc 3540
      ccactcattt ctagtccagc cgcatttcag cagtgccttc tggggtgtcc cccacacccc 3600
      tgctttggcc ccagaggcga gggaccagtg gaggtgccag ggaggcccca ggaccctgtg 3660
      gtcccctggc tctgcctccc caccctgggg tgggggctcc cggccacctg tcttgctcct 3720
      atggagtcac ataagccaac gccagagccc ctccacctca ggccccagcc cctgcctctc 3780
15     cattatattt ttgctctgct ctcaaggaagc gacgtgaccc ctgccccagc tggaaacctgg 3840
      cagaggcctt aggaccccgt tccaagtgca ctgcccggcc aagccccagc ctcagcctgc 3900
      gcctgagctg catgcgccac catttttggc agcgtggcag ctttgcaagg ggctggggcc 3960
      ctggcgctgg ggccatgcct tctgtgtgtt ctgtagtgtc tgggatttgc cgggtgctca 4020
      taaatgttta ttcattgacg gtggaaaaaa aaaaaaaaaa 4059
20

```

<210> 12

<211> 742

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

30

```

      Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala
      1          5          10          15
35     Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro
      20          25          30
      Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser
      35          40          45
40     Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg
      50          55          60
      Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro
      65          70          75          80
45     Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val
      85          90          95
      Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr
50     100          105          110
      Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile
      115          120          125
55     Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro
      130          135          140
      Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg
      145          150          155          160
60     Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His
      165          170          175
      Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys
65

```

# ES 2 300 318 T3

|    | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |  |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 5  | Thr | Cys | Leu | Pro | Lys | Ala | Leu | Leu | Asn | Leu | Ser | Asn | Gly | Arg | Asn | Asp |  |  |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
|    | Thr | Ile | Pro | Val | Leu | Leu | Asp | Ile | Ala | Glu | Arg | Thr | Gly | Asn | Met | Arg |  |  |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| 10 | Glu | Phe | Ile | Asn | Ser | Pro | Phe | Arg | Asp | Ile | Tyr | Tyr | Arg | Gly | Gln | Thr |  |  |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
|    | Ala | Leu | His | Ile | Ala | Ile | Glu | Arg | Arg | Cys | Lys | His | Tyr | Val | Glu | Leu |  |  |
|    |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| 15 | Leu | Val | Ala | Gln | Gly | Ala | Asp | Val | His | Ala | Gln | Ala | Arg | Gly | Arg | Phe |  |  |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
|    | Phe | Gln | Pro | Lys | Asp | Glu | Gly | Gly | Tyr | Phe | Tyr | Phe | Gly | Glu | Leu | Pro |  |  |
|    |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| 20 | Leu | Ser | Leu | Ala | Ala | Cys | Thr | Asn | Gln | Pro | His | Ile | Val | Asn | Tyr | Leu |  |  |
|    |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |  |  |
|    | Thr | Glu | Asn | Pro | His | Lys | Lys | Ala | Asp | Met | Arg | Arg | Gln | Asp | Ser | Arg |  |  |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| 25 | Gly | Asn | Thr | Val | Leu | His | Ala | Leu | Val | Ala | Ile | Ala | Asp | Asn | Thr | Arg |  |  |
|    |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
|    | Glu | Asn | Thr | Lys | Phe | Val | Thr | Lys | Met | Tyr | Asp | Leu | Leu | Leu | Leu | Lys |  |  |
|    |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| 30 | Cys | Ala | Arg | Leu | Phe | Pro | Asp | Ser | Asn | Leu | Glu | Ala | Val | Leu | Asn | Asn |  |  |
|    |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |
|    | Asp | Gly | Leu | Ser | Pro | Leu | Met | Met | Ala | Ala | Lys | Thr | Gly | Lys | Ile | Gly |  |  |
|    |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |
| 35 | Ile | Phe | Gln | His | Ile | Ile | Arg | Arg | Glu | Val | Thr | Asp | Glu | Asp | Thr | Arg |  |  |
|    | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
|    | His | Leu | Ser | Arg | Lys | Phe | Lys | Asp | Trp | Ala | Tyr | Gly | Pro | Val | Tyr | Ser |  |  |
|    |     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| 40 | Ser | Leu | Tyr | Asp | Leu | Ser | Ser | Leu | Asp | Thr | Cys | Gly | Glu | Glu | Ala | Ser |  |  |
|    |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |
|    | Val | Leu | Glu | Ile | Leu | Val | Tyr | Asn | Ser | Lys | Ile | Glu | Asn | Arg | His | Glu |  |  |
|    |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |
| 45 | Met | Leu | Ala | Val | Glu | Pro | Ile | Asn | Glu | Leu | Leu | Arg | Asp | Lys | Trp | Arg |  |  |
|    |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |
|    | Lys | Phe | Gly | Ala | Val | Ser | Phe | Tyr | Ile | Asn | Val | Val | Ser | Tyr | Leu | Cys |  |  |
|    | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |
| 50 | Ala | Met | Val | Ile | Phe | Thr | Leu | Thr | Ala | Tyr | Tyr | Gln | Pro | Leu | Glu | Gly |  |  |
|    |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |  |
| 55 | Thr | Pro | Pro | Tyr | Pro | Tyr | Arg | Thr | Thr | Val | Asp | Tyr | Leu | Arg | Leu | Ala |  |  |
|    |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |

# ES 2 300 318 T3

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Gly | Glu | Val | Ile | Thr | Leu | Phe | Thr | Gly | Val | Leu | Phe | Phe | Phe | Thr | Asn |
|    |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| 5  | Ile | Lys | Asp | Leu | Phe | Met | Lys | Lys | Cys | Pro | Gly | Val | Asn | Ser | Leu | Phe |
|    |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
|    | Ile | Asp | Gly | Ser | Phe | Gln | Leu | Leu | Tyr | Phe | Ile | Tyr | Ser | Val | Leu | Val |
|    | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| 10 | Ile | Val | Ser | Ala | Ala | Leu | Tyr | Leu | Ala | Gly | Ile | Glu | Ala | Tyr | Leu | Ala |
|    |     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
|    | Val | Met | Val | Phe | Ala | Leu | Val | Leu | Gly | Trp | Met | Asn | Ala | Leu | Tyr | Phe |
| 15 |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
|    | Thr | Arg | Gly | Leu | Lys | Leu | Thr | Gly | Thr | Tyr | Ser | Ile | Met | Ile | Gln | Lys |
|    |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
|    | Ile | Leu | Phe | Lys | Asp | Leu | Phe | Arg | Phe | Leu | Leu | Val | Tyr | Leu | Leu | Phe |
| 20 |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
|    | Met | Ile | Gly | Tyr | Ala | Ser | Ala | Leu | Val | Ser | Leu | Leu | Asn | Pro | Cys | Ala |
|    | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| 25 | Asn | Met | Lys | Val | Cys | Asn | Glu | Asp | Gln | Thr | Asn | Cys | Thr | Val | Pro | Thr |
|    |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
|    | Tyr | Pro | Ser | Cys | Arg | Asp | Ser | Glu | Thr | Phe | Ser | Thr | Phe | Leu | Leu | Asp |
|    |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| 30 | Leu | Phe | Lys | Leu | Thr | Ile | Gly | Met | Gly | Asp | Leu | Glu | Met | Leu | Ser | Ser |
|    |     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
|    | Thr | Lys | Tyr | Pro | Val | Val | Phe | Ile | Ile | Leu | Leu | Val | Thr | Tyr | Ile | Ile |
| 35 |     |     |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
|    | Leu | Thr | Phe | Val | Leu | Leu | Leu | Asn | Met | Leu | Ile | Ala | Leu | Met | Gly | Glu |
|    | 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
|    | Thr | Val | Gly | Gln | Val | Ser | Lys | Glu | Ser | Lys | His | Ile | Trp | Lys | Leu | Gln |
| 40 |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
|    | Ser | Gly | Arg | Arg | Arg | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    |     |     |     | 740 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

45 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación  
 55 <400> 13  
 ctacctgacg gagaaccccc acaag  
 60 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

## ES 2 300 318 T3

|    |                                                                           |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación        |    |
|    | <400> 14                                                                  |    |
| 5  | gtagtaggcg gtgagactga agatga                                              | 26 |
|    | <210> 15                                                                  |    |
| 10 | <211> 51                                                                  |    |
|    | <212> ADN                                                                 |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                                |    |
| 15 | <220>                                                                     |    |
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación        |    |
|    | <400> 15                                                                  |    |
| 20 | aacgttggcg gccgcgccac catggcggat tccagcgaag gccccgcgc g                   | 51 |
|    | <210> 16                                                                  |    |
| 25 | <211> 30                                                                  |    |
|    | <212> ADN                                                                 |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                                |    |
| 30 | <220>                                                                     |    |
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda de hibridación        |    |
|    | <400> 16                                                                  |    |
| 35 | aacgtttcta gactgggctg cagtcctag                                           | 30 |
|    | <210> 17                                                                  |    |
| 40 | <211> 233                                                                 |    |
|    | <212> ADN                                                                 |    |
|    | <213> Secuencia Artificial                                                |    |
| 45 | <220>                                                                     |    |
|    | <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de MicroMatriz de ADN |    |
|    | <400> 17                                                                  |    |
| 50 | ccaccatect ggacattgag cgtccttcc ccgtattcct gaggaaggcc ttccgctctg 60       |    |
|    | gggagatggt caccgtgggc aagagctcgg acggcactcc tgaccgcagt ggtgcttcag 120     |    |
|    | ggtggatgag gtgaactggt ctactggaa ccagaacttg ggcacatca acgaggacc 180        |    |
| 55 | gggcaagaat gagacctacc agtattatgg cttctcgcac accgtgggcc gcc 233            |    |
| 60 |                                                                           |    |
| 65 |                                                                           |    |