



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 290 149**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01946126 .8**

(86) Fecha de presentación : **06.06.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1287134**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2003**

(54) Título: **Subunidad β 1A de los canales de sodio regulados por el voltaje humanos y método de utilización.**

(30) Prioridad: **07.06.2000 US 294405 P**
29.09.2000 US 236664 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

(73) Titular/es: **Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.**
920 U.S. Route 202, P.O. Box 300
Raritan, New Jersey 08869-0602, US

(72) Inventor/es: **Qin, Ning;**
Codd, Ellen y
D'Andrea, Michael

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 290 149 T3

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

DESCRIPCIÓN

Subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio regulados por el voltaje humanos y método de utilización.

5 Antecedentes de la invención

Este caso reivindica prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 60/294.405 registrada el 7 de Junio del 2000 y titulada "DNA Encoding Human Voltage Gated Sodium Channel $\beta 1A$ Subunit" y para la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 60/236.664 registrada el 29 de Septiembre del 2000 y titulada "DNA Encoding Human Voltage Gated Sodium Channel $\beta 1A$ Subunit".

La entrada rápida del ión sodio en las células produce despolarización y la creación de un potencial de acción. Tal entrada de iones de sodio en respuesta a un cambio de voltaje sobre la membrana plasmática en células excitables está mediada por canales de sodio regulados por el voltaje (VGSC). Por tanto, los canales de sodio regulados por el voltaje desempeñan una función fundamental en el control de la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico. El VGSC es un complejo de proteínas que contiene al menos una subunidad α grande (200-300 kDa), formadora de poros, y dos subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ reguladoras pequeñas (30-40 kDa) (Catterall, 1992 y 1993; Isom y col., 1992; Isom y col., 1995). Es bien conocido que las subunidades α de los VGSC determinan las propiedades básicas del canal, ya que la expresión de la subunidad α del VGSC sola en sistemas de expresión heterólogos tales como células HEK, células CHL y oocitos de *Xenopus* es suficiente para sintetizar un canal de sodio funcional, aunque alterado. La coexpresión de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de los VGSC con la subunidad α normalizará habitualmente las propiedades del canal en sistemas de expresión heterólogos. En otras palabras, las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de los VGSC modulan casi todos los aspectos de las propiedades de los canales incluyendo la regulación dependiente del voltaje, la activación y la inactivación y el incremento del número de canales funcionales en la membrana plasmática. Las subunidades β de los VGSC pueden ser también la etapa limitante de la intensidad que controla la expresión incrementada de los canales de sodio (Catterall, 1992; Isom y col., 1994).

Estudios de clonaje molecular han demostrado que existen muchos tipos diferentes de subunidades α de VGSC, que pueden ser categorizados sobre la base de su sensibilidad a la neurotoxina tetrodotoxina (TTX) (Marban y col., 1998). Como los VGSC de tipo I, IIA y III de cerebro, el de tipo I de músculo esquelético, el canal del sodio proteína 6 (SCP6), su estrechamente homólogo nervio periférico 4 (PN4) y el nervio periférico 1 (PN1) son bloqueados por la TTX a concentraciones nanomolares, son denominados canales de sodio sensibles a TTX (TTX-S). El canal de sodio cardíaco (H1) y el nervio periférico 3 (PN3/SNS) y NaN/SNS2 son normalmente bloqueados por la TTX en el rango micromolar y son denominados canales de sodio resistentes a TTX (TTX-R).

Los estudios de las subunidades β de los VGSC están muy por detrás de los llevados a cabo con las subunidades α de los VGSC. Hasta ahora, se han clonado y caracterizado solamente dos tipos de subunidades β , $\beta 1$ y $\beta 2$ (Isom y col., 1992, 1994 y 1995). Recientemente, se ha identificado en la rata una nueva subunidad $\beta 1A$ de los VGSC, una variante por ajuste de la subunidad $\beta 1$ (Kazen-Gillespie y col., 2000). La subunidad $\beta 1A$ de los VGSC de rata es el resultado de un acontecimiento aparente de retención de intrones. El análisis de ADN genómico de rata indicaba que la región divergente (región carboxilo) de $\beta 1A$ estaba codificaba por el intrón 3 con un codón de terminación en marco. Igual que la subunidad $\beta 1$ de los VGSC, la subunidad $\beta 1A$ incrementa la densidad de la corriente de sodio y los sitios de unión de [3 H]-Saxitoxina, y modula la activación y la inactivación dependientes del voltaje del tipo IIA de VGSC. Y lo que es más interesante, el nivel de expresión y el patrón de $\beta 1A$ de VGSC en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) están significativamente alterados en el modelo de dolor neuropático en animales de Chung (ver más adelante), lo cual es consistente con la observación de que la corriente de sodio se incrementa después de una lesión nerviosa. Moran y col. (2000) describen una subunidad $\beta 1A$ endógena expresada en células MEK-293. Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 1A$ de VGSC son ambas glicoproteínas de membrana integrales (Isom y col., 1992; Kazon-Gillespie y col., 2000) que contienen un solo dominio transmembranal en el extremo carboxilo y un motivo plegado similar a una inmunoglobulina extracelular, aminoterminal, mantenido por un único supuesto puente disulfuro entre dos residuos de cisteína altamente conservados. Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 1A$ de VGSC pueden ser clasificadas como miembros del grupo V de la superfamilia de Ig, que incluye muchas moléculas de adhesión celular, sugiriendo que las subunidades $\beta 1$ y $\beta 1A$ desempeñan funciones no sólo en la modulación de las propiedades de los canales de sodio, sino también en la vectorización de proteínas y la adhesión celular (Isom y Catterall, 1996).

Un incremento de la tasa de estimulación espontánea en las neuronas es a menudo observado en los ganglios sensoriales periféricos después de una lesión nerviosa (Ochoa y Torebjork, 1980; Nordin y col., 1984; Devor, 1994; Woolf, 1994). Se ha sugerido que esta hiperexcitabilidad de las neuronas es debida a una expresión alterada de los canales de sodio en algunos síndromes de dolor crónico (Tanaka y col., 1998). Se ha descrito un número incrementado de canales de sodio que dan lugar a una excitación repetitiva, inapropiada, de las neuronas en los extremos de axones lesionados en varios tejidos nerviosos periféricos tales como los DRG, que transmiten señales procedentes de los receptores periféricos al sistema nervioso central (Waxman y Brill, 1978; Devor y col., 1989; Matzner y Devor, 1992; Devor y col., 1992; England y col., 1994; Matzner y Devor, 1994; England y col., 1996). Transcritos que codifican la subunidad α -III, que están presentes solamente a niveles muy bajos en las neuronas de los DRG control, son expresados a niveles que van de moderados a elevados en neuronas de los DRG axotomizadas junto con niveles elevados de ARNms de α -I y α -II (Waxman y col., 1994). A la inversa, transcritos de α -SNS de canales de sodio disminuyen de forma regulada en las neuronas de los DRG tras la axotomía (Dib-Hajj y col., 1996). Además, la eficacia parcial de agentes bloqueantes de sodio está bien documentada en pacientes tratados de dolor neuropático (Chabel y col., 1989;

Devor y col., 1992; Omana-Zapata y col., 1997; Rizzo, 1997), proporcionando un enlace importante entre la expresión incrementada de canales de sodio y el dolor neuropático. Por tanto, las alteraciones en la expresión de canales de sodio y la función posterior pueden ser un acontecimiento molecular clave subyacente en la patofisiología del dolor después de la lesión de un nervio periférico.

Recientemente, se ha clonado la subunidad $\beta 1A$ de VGSC y se ha descrito que incrementaba la densidad de la corriente de sodio en la membrana plasmática cuando era coexpresada con subunidades α -IIA en fibroblastos CHL (Kazan-Gillespie y col., 2000). La $\beta 1A$ está regulada en el cerebro durante el desarrollo, pero su función potencial en el dolor neuropático no ha sido previamente explorada. Por tanto, se investigó la expresión de la proteína $\beta 1A$ en neuronas de los DRG utilizando el modelo de dolor neuropático de Chung (Kim y Chung, 1992) empleando un anticuerpo policlonal dirigido contra una región extracelular exclusiva de $\beta 1A$ que no está presente en $\beta 1$. La inmunohistoquímica y el análisis de imagen asistido por ordenador documentaron un aumento regulado significativo de las subunidades $\beta 1A$ y $\beta 1$ de VGSC después de una lesión neuronal, en comparación con niveles muy bajos en los DRG de animales operados de forma simulada. La clara distribución puntuada y en la membrana del marcaje de $\beta 1A$ después de una lesión de nervios periféricos sugería una traducción activa y una posible acumulación en la membrana plasmática, al contrario que $\beta 1$, cuya distribución subcelular permanecía difusa.

Con el fin de explorar adicionalmente las funciones de la subunidad $\beta 1A$ de VGSC, la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos ha sido clonada y caracterizada en esta invención.

Resumen de la invención

Se ha clonado y caracterizado una molécula de ADN que codifica la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos, y la misma representa una nueva isoforma de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos que es expresada preferencialmente en tejidos importantes para la función neurológica. Utilizando un sistema de expresión recombinante, se han aislado moléculas de ADN funcionales que codifican la subunidad del canal. Se describen las propiedades biológicas y estructurales de estas proteínas tales como la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos. Las moléculas de ADN recombinante y porciones de las mismas son útiles para aislar homólogos de las moléculas de ADN, identificar y aislar equivalentes genómicos de las moléculas de ADN e identificar, detectar o aislar formas mutantes de las moléculas de ADN.

Además, la subunidad $\beta 1A$ está implicada en el dolor neuropático, según es puesto en evidencia mediante la utilización de un modelo de dolor neuropático establecido.

En un primer aspecto de la invención, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, codificando dicho polinucleótido la SEC ID N°:14 o los aminoácidos 150 a 268 de la SEC ID N°:14.

En una realización, el polinucleótido es ARN y en otra realización el polinucleótido es ADN. En otra realización, la secuencia de nucleótidos es seleccionada de un grupo que consta de las SEC ID N°:12 y SEC ID N°:13. En otra realización, la molécula de ADN aislada es ADN genómico.

La invención se refiere además a un vector de expresión para la expresión de una proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos en un huésped recombinante, donde dicho vector contiene un gen recombinante que codifica la SEC ID N°:14. En una realización, el vector de expresión contiene un gen clonado que codifica una proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de: SEC ID N°:12 y SEC ID N°:13. En otra realización, el vector de expresión contiene ADN genómico que codifica la SEC ID N°:14.

La invención se refiere además a una célula huésped recombinante que contiene un gen clonado recombinantemente que codifica la SEC ID N°:14. Preferiblemente, el gen tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de: SEC ID N°:12; SEC ID N°:13. En otra realización, el gen clonado es ADN genómico.

La invención contempla también una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:14, la cual cuando es combinada en una célula con una proteína de la subunidad α de los canales de sodio humanos permite el flujo de iones de sodio en la célula.

La invención se refiere a un proceso para la expresión de una proteína en una célula huésped, que comprende las etapas de: (a) la introducción en una célula de un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico, que tiene la secuencia de la SEC ID N°:12 o su secuencia complementaria, o la SEC ID N°:13 o su secuencia complementaria; (b) el cultivo de la célula de etapa (a) bajo condiciones que permitan la expresión de una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 - Se muestra la secuencia de aminoácidos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio regulados por el voltaje humanos alineada con (A) la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio regulados por el voltaje de rata y con (B) la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio regulados por el voltaje humanos. La identidad global entre las subunidades

$\beta 1A$ de VGSC humanos y de rata es del 72% aproximadamente, mientras que la identidad de sus regiones carboxilo terminales es inferior al 33%. La identidad global de las subunidades $\beta 1A$ y $\beta 1$ de los VGSC humanos es del 75%, pero la identidad de sus regiones carboxilo terminales es inferior al 17%.

La Figura 2 ilustra la organización genómica y transcripcional del gen $\beta 1$ humano (SCN1B). El gen que codifica las subunidades $\beta 1$ y $\beta 1A$ de los canales de sodio se extiende sobre 9-10 kb aproximadamente en el cromosoma 19, conteniendo siete exones (1, 2, 3, 4A, 4, 5 y 6) y cinco intrones. Un exón alternativo, 4A, está situado en la región 5' del intrón 3. La subunidad $\beta 1$ humana está codificada por los exones 1-3 y 4-6, mientras que la $\beta 1A$ humana está codificada por los exones 1-3 y el exón 4A.

La Figura 3 demuestra la coexpresión de las subunidades $\beta 1A$ y $Na_v 1.2$ en oocitos de *Xenopus*. La corriente iónica máxima conducida por $Na_v 1.2$ fue incrementada de manera dependiente de la dosis por su coexpresión con la subunidad $\beta 1A$ en oocitos. La proporción de ARNcs de las subunidades $Na_v 1.2$ y $\beta 1A$ está indicada en la parte inferior de las barras. Los datos representan la media del número de oocitos mostrado en la parte superior de las barras.

Las barras de error representan el ESM.

La Figura 4 ilustra la intensidad del marcaje de $\beta 1A$ en neuronas de los DRG en ratas normales y en ratas con SNL a varios tiempos después de la cirugía. Las barras mostradas representan el marcaje en neuronas nociceptivas (barras en blanco) y sensoriales (barras sombreadas). N = 3-5 animales por grupo y 30-40 neuronas de cada tipo por animal. La intensidad del marcaje en cada tipo neuronal a cada nivel de DRG aumentaba con el tiempo transcurrido después de la cirugía (ver la Tabla 1 para el análisis estadístico).

La Figura 5 ilustra la intensidad del marcaje de $\beta 1$ en neuronas de los DRG en ratas normales y en ratas con SNL a varios tiempos después de la cirugía. Las barras mostradas representan el marcaje en neuronas nociceptivas (barras en blanco) y sensoriales (barras sombreadas). N = 3-5 animales por grupo y 30-40 neuronas de cada tipo por animal. La intensidad del marcaje variaba con el tiempo transcurrido después de la cirugía (ver la Tabla 1 para los resultados estadísticos).

Descripción detallada

Definiciones

El término “dominio de una proteína”, según se utiliza en la presente, se refiere a una región de una proteína que puede plegarse en una estructura tridimensional estable independiente del resto de la proteína. Esta estructura puede mantener una función específica dentro de la proteína, incluyendo el lugar de una actividad enzimática, la creación de un motivo de reconocimiento para otra molécula, o bien proporcionar componentes estructurales necesarios para que la proteína exista en un entorno particular. Los dominios de las proteínas son normalmente regiones de las proteínas conservadas evolutivamente, tanto dentro de una familia de proteínas como de superfamilias de proteínas que desempeñan funciones similares. El término “superfamilia de proteínas”, según se utiliza en la presente, se refiere a proteínas cuya relación evolutiva puede no estar totalmente establecida o puede ser distante por los estándares filogenéticos aceptados, pero que muestran estructuras tridimensionales similares o presentan consensos únicos de aminoácidos críticos. El término “familia de proteínas”, según se utiliza en la presente, se refiere a proteínas cuya relación evolutiva ha sido establecida por los estándares filogenéticos aceptados.

El término “proteína de fusión”, según se utiliza en la presente, se refiere a construcciones proteicas que son el resultado de la combinación de múltiples dominios de proteínas o de regiones adaptadoras. Las proteínas de fusión son creadas muy a menudo mediante el clonaje molecular de secuencias de nucleótidos para tener como resultado la creación de una nueva secuencia polinucleotídica que codifica la proteína deseada. Alternativamente, la creación de una proteína de fusión puede ser llevada a cabo mediante la unión química de dos proteínas entre sí.

El término “región adaptadora” o “dominio adaptador”, o términos descriptivos similares, según se utilizan en la presente, se refiere a tramos de secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas que son utilizados en la construcción de un vector de clonaje o de una proteína de fusión. Las funciones de una región adaptadora pueden incluir la introducción de sitios de clonaje en la secuencia de nucleótidos, la introducción de un componente flexible o de una región creadora de un espacio entre dos dominios proteicos, o la creación de una marca de afinidad para la interacción con moléculas específicas. Una región adaptadora puede ser introducida en una proteína de fusión sin una finalidad específica, pero es el resultado de elecciones realizadas durante el clonaje.

El término “sitio de clonaje” o “sitio de policlonaje”, según se utiliza en la presente, se refiere a una región de la secuencia de nucleótidos contenida en un vector de clonaje o diseñada en una proteína de fusión, que tiene una o más secuencias consenso de endonucleasas de restricción disponibles. Estas secuencias de nucleótidos pueden ser introducidas en otros vectores de clonaje con el fin de facilitar el clonaje, para la creación de nuevas proteínas de fusión, o pueden ser utilizadas para introducir mutaciones específicas dirigidas a un sitio. Es bien conocido por las personas expertas en la técnica que pueden producirse sitios de clonaje en una posición deseada mediante una mutación silente, una mutación conservada o mediante la introducción de una región adaptadora que contenga las secuencias consenso de enzimas de restricción deseadas. Es también bien conocido por los expertos en la técnica que la localización precisa de un sitio de clonaje puede ser flexible, siempre que se mantenga la función deseada de la proteína o del fragmento de la misma que estén siendo clonados.

El término “marca”, según se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que facilita el aislamiento, la purificación o la detección de una proteína de fusión que contenga la marca. Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de tales marcas, y son adecuadas para ser utilizadas en la presente invención. Las marcas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, péptido HA, péptidos con polihistidina, biotina/avidina, y otros sitios epitópicos de unión a anticuerpos.

Aislamiento del ácido nucleico de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio regulados por el voltaje humanos

El canal de sodio regulado por el voltaje es un complejo proteico de múltiples subunidades que contiene una subunidad α formadora de poros y dos subunidades reguladoras, $\beta 1$ y $\beta 2$. Mientras que la subunidad α determina las propiedades básicas del canal, las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ modulan casi todos los aspectos de las propiedades del canal, incluyendo la regulación dependiente del voltaje, la activación y la inactivación dependientes del voltaje y, lo que es más sorprendente, incrementan la densidad de canales funcionales en la membrana. Desde una perspectiva farmacológica molecular y electrofisiológica, existen más subtipos de canales de sodio regulados por el voltaje en las células excitables que subunidades α clonadas. Esto puede ser debido parcialmente a la existencia en la naturaleza de más subunidades α para ser clonadas y caracterizadas. Por otra parte, podría esperarse también que hubiera más de un tipo de subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$. En otras palabras, la variedad de canales de sodio regulados por el voltaje puede ser el resultado de los diferentes tipos de subunidades α que se asocian con un tipo de subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, y viceversa. De hecho, estudios bioquímicos han revelado que existe más de un tipo de subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio según se determinó mediante transferencia Western con un anticuerpo específico para $\beta 1$ (Sutkowski y col., 1990).

Recientemente se ha clonado $\beta 1A$, una nueva subunidad de los canales de sodio regulados por el voltaje y variante por ajuste de $\beta 1$, y se informó que incrementaba la densidad de la corriente de sodio en la membrana plasmática y que cambiaba la cinética dependiente del voltaje cuando era coexpresada con las subunidades αIIA en fibroblastos CHL (Kazan-Gillespie y col., 2000). La $\beta 1A$ está regulada, desde el punto de vista del desarrollo, en el cerebro. Estudios de distribución subcelular de la subunidad $\beta 1A$ de VGSC de rata demostraron que la misma estaba alterada, además de incrementada de manera regulada, en las neuronas de los DRG como consecuencia de lesiones de los nervios periféricos. Además, la subunidad $\beta 1A$ de VGSC de rata puede ser importante en la regulación de la disposición aberrante de los canales de sodio expresados tras una lesión nerviosa.

Con el fin de estudiar la subunidad $\beta 1A$ humana, nosotros intentamos primeramente clonar la subunidad utilizando una estrategia de clonaje homólogo. Como la $\beta 1A$ es una variante por ajuste con un intrón retenido en el extremo carboxilo de la subunidad $\beta 1$, el cebador directo fue diseñado sobre la base de la subunidad $\beta 1$ de los VGSC humanos; mientras que el cebador inverso fue diseñado sobre la base de la subunidad de $\beta 1A$ de los VGSC de rata. Inesperadamente, este par de cebadores no fue capaz de amplificar ningún fragmento de ADN procedente de bibliotecas de ADNc “Marathon™ ready cDNA libraries” de glándula adrenal, de cerebro fetal y de cerebro adulto humanos. Posteriormente se diseñaron tres cebadores inversos diferentes basados en la secuencia que codificaba el extremo carboxilo de la subunidad $\beta 1A$ de rata. Sin embargo, ninguno de estos cebadores apareados con el cebador directo pudo amplificar ningún fragmento de ADN de las bibliotecas de ADNc anteriores bajo varias condiciones de PCR, sugiriendo que la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos era significativamente diferente de su equivalente en rata.

Con el fin de clonar la variante por ajuste de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos, se utilizó una técnica de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE-PCR). A diferencia de la RT-PCR regular que requiere dos cebadores específicos del gen, la RACE-PCR requiere únicamente un cebador específico que se aparee con un cebador universal (AP1 o AP2) para la amplificación por RT-PCR. Esto requiere la adición de un adaptador reconocido por el cebador universal al extremo de cada ADNc cuando se crea la biblioteca. Actualmente, este tipo de biblioteca de ADNc está disponible comercialmente (Marathon™ ready cDNA library, Clontech). Por tanto, mediante esta técnica, pudo amplificarse la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos con un cebador específico de la $\beta 1$ humana (SB1-10, ver el Ejemplo 1) sin conocer la secuencia del extremo carboxilo de la $\beta 1A$ humana. La dificultad técnica de esta aplicación es distinguir eficazmente la nueva subunidad $\beta 1A$ de la subunidad $\beta 1$, debido a la utilización de un cebador específico para la subunidad $\beta 1$ en la RACE-PCR. Para solucionar este problema, los transformantes fueron preseleccionados mediante PCR con un par de cebadores que reconocían únicamente la subunidad $\beta 1$ de los VGSC humanos y los clones negativos (que no podían ser amplificados mediante tal PCR) fueron sometidos a una caracterización y secuenciación posteriores. Con esta estrategia, una nueva subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos fue clonada a partir de la biblioteca de ADNc “Marathon™ ready cDNA library” de glándula adrenal humana, y amplificada posteriormente a partir de una biblioteca de ADNc “Marathon™ ready cDNA library” de cerebro fetal humano con cebadores específicos de la $\beta 1A$ humana.

El análisis de la secuencia primaria reveló que la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos es también una variante por ajuste de la subunidad $\beta 1$ con un intrón retenido y un codón de parada en marco. Esta nueva subunidad β de VGSC contiene también la estructura básica de la subunidad β de VGSC: un motivo extracelular aminoterminal similar a inmunoglobulina y un dominio transmembranal carboxilo-terminal. Sin embargo, la subunidad $\beta 1$ de los VGSC humanos es significativamente diferente de su equivalente de rata. Comparten únicamente alrededor de un 35% de identidad en su región codificadora carboxilo-terminal.

La presente invención se refiere a ADN que codifica la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos que fue aislado de células productoras de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos. El término “subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos”,

según se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que puede funcionar específicamente como una subunidad del canal. Esto es, puede combinarse con las demás subunidades proteicas para formar un canal de calcio funcional.

La proteína recombinante es útil para identificar moduladores de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos. El análisis de transferencia Northern demostró que la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC estaba ampliamente distribuida en una variedad de tejidos incluyendo, pero sin limitarse a, cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, pulmón, placenta, riñón y páncreas. En el cerebro, la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC se expresa muy intensamente en la región del cerebelo. El estudio inmunohistoquímico demostró también que la $\beta 1A$ de los VGSC se expresaba no sólo en los ganglios de la raíz dorsal (DRG), sino que la misma aumentaba de manera regulada después de una lesión nerviosa, sugiriendo que desempeña una función en el dolor neuropático. La alteración de la expresión y/o función de los canales de sodio puede tener una gran influencia sobre las propiedades excitatorias de las neuronas periféricas y centrales, y de otros muchos tejidos.

Además, según se proporciona en el Ejemplo 12 más adelante, la expresión de la subunidad $\beta 1A$ y de $\beta 1$ fue investigada en neuronas de los DRG procedentes de un modelo de dolor neuropático por ligadura de un nervio en ratas utilizando inmunohistoquímica y análisis de imagen. Los niveles de expresión de la subunidad $\beta 1A$ y de $\beta 1$ fueron incrementados muy significativamente en las neuronas nociceptivas de los DRG, aunque también hubo incrementos en las neuronas sensoriales de los DRG. Sin embargo, el marcaje subcelular de estos dos polipéptidos difería notoriamente en las neuronas de los DRG tras una lesión de un nervio periférico. Estos estudios demostraron que la lesión del nervio periférico estaba asociada con el aumento regulado de la subunidad $\beta 1A$ y de las subunidades $\beta 1$ de los canales de sodio y alteraba los patrones de distribución celular de $\beta 1A$ en los DRG. Esto es una evidencia de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio es importante en la regulación de la expresión aberrante de canales de sodio en las neuronas de los DRG después de una lesión nerviosa.

Puede utilizarse una variedad de células y líneas celulares para aislar el ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos utilizando cebadores seleccionados sobre la base de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos.

Puede utilizarse cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica para clonar molecularmente el ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos con el fin de obtener secuencias relacionadas o variantes alélicas. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la expresión funcional directa de los genes de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos después de la construcción de una biblioteca de ADNc que contenga la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos en un sistema de vectores de expresión apropiado. Otro método es someter a selección una biblioteca de ADNc que contenga la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos construida en un bacteriófago o en un vector plasmídico lanzadera con una sonda oligonucleotídica marcada diseñada a partir de la secuencia de aminoácidos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Un método adicional consiste en someter a selección de una biblioteca de ADNc que contenga la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos construida en un bacteriófago o en un vector plasmídico lanzadera con un ADNc parcial que codifique la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Este ADNc parcial es obtenido mediante la amplificación por PCR específica de fragmentos de ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos a través del diseño de cebadores oligonucleotídicos degenerados a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos purificada.

Otro método es aislar ARN de células productoras de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos y traducir el ARN a proteínas mediante un sistema de traducción *in vitro* o *in vivo*. La traducción del ARN en un péptido o en una proteína tendrá como resultado la producción de al menos una porción de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos que puede ser identificada mediante, por ejemplo, reactividad inmunológica con un anticuerpo anti-subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos o por la actividad biológica de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. En este método, grupos de ARN aislados de células productoras de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos pueden ser analizados para determinar la presencia de un ARN que codifique al menos una porción de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. El fraccionamiento posterior del grupo de ARNs tiene como resultado la purificación del ARN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos a partir del ARN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio no humanos. El péptido o la proteína producidos por este método pueden ser analizados para proporcionar secuencias de aminoácidos que son utilizadas a su vez con el fin de proporcionar cebadores para la producción del ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, o bien el ARN utilizado para la traducción puede ser analizado con el fin de proporcionar secuencias de nucleótidos que codifiquen la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos y producir sondas para esta producción de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Este método es conocido en la técnica y puede ser encontrado en, por ejemplo, Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Es fácilmente obvio para los expertos en la técnica que pueden prepararse bibliotecas de ADNc adecuadas a partir de células o líneas celulares que tengan la actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. La selección de células o de líneas celulares para ser utilizadas en la preparación de una biblioteca de ADNc con el fin de aislar ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, puede ser realizada midiendo primeramente la actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos asociada a las células utilizando la medida de la actividad biológica asociada a la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos o un ensayo de unión de ligandos.

La preparación de bibliotecas de ADNc puede ser realizada mediante técnicas estándar bien conocidas en el oficio. Pueden encontrarse técnicas de construcción de bibliotecas de ADNc bien conocidas en, por ejemplo, Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Es también perfectamente obvio para los expertos en la técnica que se puede aislar también el ADN que codifica la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos a partir de una biblioteca de ADN genómico adecuada. La construcción de bibliotecas de ADN genómico puede ser realizada mediante técnicas estándar bien conocidas en el oficio. Técnicas de construcción de bibliotecas de ADN genómico bien conocidas pueden ser encontradas 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 de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos mediante los métodos anteriores, puede ser necesaria la secuencia de aminoácidos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Para llevar a cabo esto, la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede ser purificada y puede determinarse la secuencia de aminoácidos parcial mediante el empleo de secuenciadores automáticos. No es necesario determinar la secuencia de aminoácidos completa, pero se determina la secuencia lineal de dos regiones de 6 a 8 aminoácidos de la proteína para la producción de cebadores para amplificación por PCR de un fragmento de ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos parcial.

Una vez que se han identificado las secuencias de aminoácidos adecuadas, se sintetizan las secuencias de ADN capaces de codificar las mismas. Como el código genético es degenerado, puede utilizarse más de un codón para codificar un aminoácido particular y, por tanto, la secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquiera de un conjunto de oligonucleótidos de ADN similares. Solamente un miembro del conjunto será idéntico a la secuencia de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, pero será capaz de hibridar con el ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos incluso en presencia de oligonucleótidos de ADN con malos acoplamientos. Los oligonucleótidos de ADN con malos acoplamientos pueden incluso hibridar suficientemente con el ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos para permitir la identificación y el aislamiento del ADN que codifica la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. El ADN aislado mediante estos métodos puede ser utilizado para someter a selección bibliotecas de ADN procedentes de una variedad de tipos celulares, de origen invertebrado y vertebrado, y para aislar genes homólogos.

La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos purificada, biológicamente activa, puede tener varias formas físicas diferentes. La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede existir como un polipéptido naciente de longitud completa o no procesado, o bien como polipéptidos parcialmente procesados o combinaciones de polipéptidos procesados. El polipéptido naciente de longitud completa de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede ser modificado después de la traducción mediante acontecimientos de corte proteolítico específicos que tienen como resultado la formación de fragmentos del polipéptido naciente de longitud completa. Un fragmento o una asociación física de fragmentos pueden tener la actividad biológica total asociada con la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, sin embargo, el grado de actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede variar entre fragmentos individuales de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos y fragmentos polipeptídicos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos asociados físicamente.

Como el código genético es degenerado, más de un codón puede ser utilizado para codificar un aminoácido particular y, por tanto, la secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquiera de un conjunto de oligonucleótidos de ADN similares. Solamente un miembro del conjunto será idéntico a la secuencia de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, pero será capaz de hibridar con el ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos incluso en presencia de oligonucleótidos de ADN con desacoplamientos bajo condiciones apropiadas. Bajo condiciones alternativas, los oligonucleótidos de ADN desacoplados pueden aún hibridar con el ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos para permitir la identificación y el aislamiento del ADN que codifica la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos.

Puede utilizarse ADN que codifique la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos de un organismo particular para aislar y purificar homólogos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos de otros organismos. Para llevar a cabo esto, el primer ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede ser mezclado con una muestra que contenga ADN que codifique homólogos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos bajo condiciones de hibridación apropiadas. El complejo de ADN hibridado puede ser aislado y a partir del mismo puede purificarse el ADN que codifica el ADN homólogo.

Identidad o Similitud, según se conocen en la técnica, son relaciones entre dos o más secuencias polipeptídicas o entre dos o más secuencias de polinucleótidos, determinadas comparando las secuencias. En la técnica, identidad indica también el grado de parentesco de secuencias entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, determinado mediante el acoplamiento entre tramos de tales secuencias. La identidad y la similitud pueden ser ambas calculadas fácilmente (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991). Aunque existen varios métodos para medir la identidad y la

similitud entre dos secuencias polinucleotídicas o dos secuencias polipeptídicas, ambos términos son bien conocidos por los técnicos expertos (Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D. (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o similitud entre secuencias incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Carillo, H. y Lipman, D. (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073. Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la máxima igualdad entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas de ordenador. Los métodos preferidos en programas de ordenador para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J. y col. (1984) Nucleic Acids Research 12(1): 387), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul, S.F. y col. (1990) J. Molec. Biol. 215, 403).

Polinucleótido(s) se refiere de forma general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificados. Así, por ejemplo, el término polinucleótidos, según se utiliza en la presente, se refiere entre otros a ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias o de regiones monocatenarias, bicatenarias y tricatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que contienen ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o tricatenarias, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, el término polinucleótido según se utiliza en la presente se refiere a regiones tricatenarias que contienen ARN o ADN o ambos, ARN y ADN. Las cadenas de tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solamente una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región triple helicoidal es a menudo un oligonucleótido. Según se utiliza en la presente, el término polinucleótido incluye ADNs o ARNs como los descritos anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, ADNs o ARNs con esqueletos modificados por razones de estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" según el significado de ese término en la presente. Además, ADNs o ARNs conteniendo bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas tales como bases tritiladas, para mencionar solamente dos ejemplos, son polinucleótidos según la utilización del término en la presente. Se comprenderá que se han realizado una gran variedad de modificaciones en el ADN y en el ARN que sirven para muchas finalidades útiles conocidas por las personas con experiencia en la técnica. El término polinucleótido, según es empleado en la presente, incluye tales formas de polinucleótidos modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células incluyendo, *inter alia*, células sencillas y complejas. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos cortos referidos a menudo como oligonucleótido(s).

El término polipéptidos, según es utilizado en la presente, se refiere a la estructura química básica de los polipéptidos que es bien conocida y ha sido descrita en innumerables libros de texto y otras publicaciones de la técnica. En este contexto, el término es utilizado en la presente para referirse a cualquier péptido o proteína que contenga dos o más aminoácidos unidos entre sí en una cadena lineal mediante enlaces peptídicos. Según se utiliza en la presente, el término se refiere a cadenas cortas, que son también referidas comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas que son referidas generalmente en la técnica como proteínas, de las cuales existen muchos tipos. Se comprenderá que los polipéptidos contienen a menudo aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos referidos comúnmente como los 20 aminoácidos existentes en la naturaleza, y que muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, pueden ser modificados en un polipéptido dado, ya sea por procesos naturales tales como el procesamiento y otras modificaciones posteriores a la traducción, o también por técnicas de modificación química que son bien conocidas en el oficio. Incluso las modificaciones comunes que tienen lugar en los polipéptidos de manera natural son demasiado numerosas para enumerarlas exhaustivamente en la presente, pero están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una literatura de investigación voluminosa, y son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen el polipéptido de la SEC ID N°:14 (en particular el polipéptido maduro).

Expresión recombinante de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos

El ADN clonado de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos obtenido mediante los métodos descritos en la presente, puede ser expresado recombinantemente mediante clonaje molecular en un vector de expresión que contenga un promotor adecuado y otros elementos reguladores de la transcripción apropiados, y transferido a células huésped procarióticas o eucarióticas para producir la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante. Técnicas para tales manipulaciones están descritas en profundidad en Maniatis, T. y col., *supra*, y son bien conocidas en el oficio.

Los vectores de expresión se definen en la presente como secuencias de ADN que son requeridas para la transcripción de copias clonadas de genes y para la traducción de sus ARNs en un huésped apropiado. Tales vectores pueden ser utilizados para expresar genes eucarióticos en una variedad de huéspedes tales como bacterias, incluyendo *E. coli*, algas verdiazules, células de plantas, células de insecto, células fúngicas incluyendo células de levadura, y células animales.

Vectores diseñados específicamente permiten el transporte de ADN entre huéspedes 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 huésped, marcadores seleccionables, un número limitado de sitios de enzimas de restricción útiles, potencial para un número elevado de copias y promotores activos. Se define un promotor como una secuencia de ADN que dirige a la ARN polimerasa para que se una al ADN e inicie la síntesis de ARN. Un promotor potente es aquél que hace que los ARNs se inicien con una frecuencia elevada. Los vectores de expresión pueden incluir, pero no se limitan a, vectores de clonaje, vectores de clonaje modificados, plásmidos o virus específicamente diseñados.

Puede utilizarse una variedad de vectores de expresión de mamífero para expresar en células de mamífero la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante. Vectores de expresión de mamífero disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante incluyen, pero no se limitan a, pMAMneo (Clontech), vectores pIRES (Clontech), pTET-On y pTET-Off (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593, ATCC, Manassas, VA), 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) y 1ZD35 (ATCC 37565).

Puede utilizarse una variedad de vectores de expresión bacterianos para expresar la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante en células bacterianas. Vectores de expresión bacterianos disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante incluyen, pero no se limitan a, vectores pET (Novagen), vectores pGEX (Pharmacia) y vectores pQE (Qiagen).

Puede utilizarse una variedad de vectores de expresión de células fúngicas para expresar la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante en células fúngicas tales como levaduras. Vectores de expresión de células fúngicas disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante incluyen, pero no se limitan a, pYES2 (Invitrogen) y el vector de expresión Pichia (Invitrogen).

Puede utilizarse una variedad de vectores de expresión de células de insecto para expresar la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante en células de insecto. Vectores de expresión de células de insecto disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante incluyen, pero no se limitan a, pBlueBacII (Invitrogen).

El ADN que codifica la SEC ID N°:14 puede ser clonado en un vector de expresión para su expresión en una célula huésped recombinante. Las células huésped recombinantes pueden ser procarióticas o eucarióticas, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levaduras, células de mamífero incluyendo, pero sin limitarse a, líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, de mono y roedores, y células de insecto incluyendo, pero sin limitarse a, líneas celulares derivadas de drosophila y del gusano de seda. Líneas celulares derivadas de especies de mamíferos que pueden ser adecuadas y que están disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan 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, HEK-293 (ATCC CRL 1573), PC12 (ATCC CRL-1721).

El vector de expresión puede ser introducido en las células huésped mediante cualquiera de varias técnicas incluyendo, pero sin limitarse a, transformación, transfección, fusión de protoplastos, lipofección y electroporación. Las células que contienen el vector de expresión son propagadas clonalmente y analizadas individualmente con el fin de determinar si producen la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. La identificación de los clones de células huésped que expresan la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede ser realizada mediante varios medios incluyendo, pero sin limitarse a, reactividad inmunológica con anticuerpos anti-subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, y la presencia de actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos asociada a las células huésped.

La expresión del ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede ser realizada también utilizando ARNm sintético producido *in vitro*. ARNm sintético o ARNm aislado de células productoras de la SEC ID N°:14 puede ser traducido eficazmente en varios sistemas sin células incluyendo, pero sin limitarse a, extractos de germen de trigo y extractos de reticulocitos, así como traducido eficazmente en sistemas basados en células incluyendo, pero sin limitarse a, microinyección en oocitos de rana, prefiriéndose generalmente la microinyección en oocitos de rana.

Con el fin de determinar la(s) secuencia(s) de ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos que produce(n) niveles óptimos de actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos y/o de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, pueden construirse moléculas de ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes: el marco de lectura abierto de longitud completa del ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos que codifica la proteína de 32 kDa desde la base 4 aproximadamente hasta la base 808 aproximadamente (estos números corresponden al primer nucleótido de la primer metionina y al último nucleótido antes del primer codón de parada) y varias construcciones conteniendo porciones del ADNc que codifica la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Todas las construcciones pueden ser diseñadas para que contengan ninguna, toda o porciones de la región 5' ó 3' no traducida del ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. La actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos

y los niveles de expresión de la proteína pueden ser determinados después de la introducción, individualmente y en combinación, de estas construcciones en células huésped apropiadas. Después de la determinación del casete de ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos que produzca una expresión óptima en ensayos transitorios, esta construcción de ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos es transferida a una variedad de vectores de expresión para su expresión en células huésped incluyendo, pero sin limitarse a, células de mamífero, células de insecto infectadas con baculovirus, *E. coli* y la levadura *S. cerevisiae*.

Métodos de ensayo para determinar la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos

Pueden utilizarse células huésped transfectantes y oocitos microinyectados para analizar los niveles de actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos funcional y los niveles de proteína total de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos mediante los métodos siguientes. En el caso de células huésped recombinantes, esto implica la cotransfección de uno o posiblemente dos o más plásmidos que contengan el ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos que codifica uno o más fragmentos o subunidades. En el caso de oocitos, esto implica la coinyección de ARNs sintéticos para la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Después de un periodo de tiempo apropiado para permitir la expresión, la proteína celular es marcada metabólicamente con, por ejemplo, ^{35}S -metionina durante 24 horas, después de lo cual se recogen los lisados celulares y los sobrenadantes del cultivo celular y se someten a inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos.

Los niveles de proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos en células huésped son cuantificados mediante técnicas de inmunoafinidad y/o afinidad de ligandos. Las células que expresan la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos pueden ser analizadas para determinar el número de moléculas de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos expresadas midiendo la cantidad de [ligando]radiactivo que se une a las membranas celulares. Se utilizan esferas de afinidad específicas para la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos o anticuerpos específicos hacia la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos para aislar, por ejemplo, la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos marcada con ^{35}S -metionina o sin marcar. La proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos marcada es analizada mediante SDS-PAGE. La proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos sin marcar es detectada mediante transferencia Western, ensayos de ELISA o RIA empleando anticuerpos específicos hacia la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos.

Otros métodos para detectar la actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos implican la medida directa de la actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos en células completas transfectadas con ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos o en oocitos inyectados con ARNm de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos y opcionalmente con ARNm de la subunidad α de los canales de sodio. La actividad de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos es medida por las características biológicas de las células huésped que expresan ADN de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. En el caso de células huésped recombinantes que expresan la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, pueden utilizarse técnicas de pinzamiento zonal de membrana ("patch voltage clamp") para medir la actividad de los canales y cuantificar la modificación del flujo de iones por la subunidad de los canales de sodio como función de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. En el caso de oocitos, puede utilizarse la técnica del pinzamiento zonal de membrana ("patch clamp") así como la técnica de fijación del voltaje ("voltage clamp") de dos electrodos para medir la actividad de los canales de sodio y cuantificar la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos.

Purificación de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos

Después de la expresión de la SEC ID N°:14 en una célula huésped recombinante, la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos puede ser recuperada con el fin de proporcionar la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos purificada en forma activa. Hay disponibles varios procedimientos de purificación de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos y son adecuados para ser utilizados. Según se describió anteriormente para la purificación de la SEC ID N°:14 a partir de fuentes naturales, una subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante puede ser purificada a partir de lisados y extractos celulares, o a partir de medio de cultivo condicionado, mediante varias combinaciones de, o la aplicación individual de, fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaños, cromatografía de adsorción a hidroxilapatita y cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía con lectinas y cromatografía de afinidad a un anticuerpo/ligando.

Las subunidades $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinantes pueden ser separadas de otras proteínas celulares mediante la utilización de una columna de inmunoafinidad producida con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos naciente de longitud completa, específicos para fragmentos polipeptídicos de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos o específicos para subunidades de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. La resina de afinidad es posteriormente equilibrada 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 una subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos o subunidades de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos son pasados lentamente a través de la columna. La columna es luego lavada con el tampón hasta que la densidad óptica (A_{280}) disminuya a niveles de fondo, posteriormente la proteína es eluida cambiando la condición del tampón, tal como disminuyendo el pH utilizando un tampón tal como glicina 0,23 M-HCl (pH 2,6). La proteína es luego dializada frente a un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención.

Ejemplo 1

5 Clonaje de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos

Amplificación Rápida del Extremo de ADNc (RACE-PCR): La biblioteca de ADNc de glándula adrenal humana Marathon-Ready™ (Nº de Cat. 7430-1) fue adquirida a Clontech (Palo Alto, CA). La RACE-PCR primaria fue realizada en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción contenía 5 μ l de ADNc de glándula adrenal humana Marathon-Ready™, 5 μ l de tampón de reacción 10x, dNTP 200 μ M, 200 nM del cebador AP1 (Clontech, 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3', SEC ID Nº:1), 200 nM del cebador específico para la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos SB1-10 (5'-TGG ACC TTC CGC CAG AAG GGC ACTG-3', SEC ID Nº:2) y 1 μ l de mezcla de ADN polimerasas Advantage2 50x (Clontech). Los parámetros del ciclador térmico para RACE-PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 30 segundos, 5 ciclos de 94°C/5 segundos y 72°C/4 minutos, 5 ciclos de 94°C/5 segundos y 70°C/4 minutos, y 20 ciclos de 94°C/5 segundos y 68°C/4 minutos.

Determinación del Producto de RACE-PCR: La calidad de la reacción RACE-PCR fue evaluada analizando si el extremo carboxilo de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos había sido amplificado. Esto se llevó a cabo mediante PCR con 1 μ l del producto de la RACE-PCR como molde y 200 nM de dos cebadores específicos de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos. Los cebadores específicos fueron: un cebador directo SB1-11 (5'-CTG GAG GAG GAT GAG CGC TTC GAG-3', SEC ID Nº:3) situado corriente abajo de SB1-10 y un cebador inverso SB1-13 (5'-CTA TTC GGC CAC CTG GAC GCC-3', SEC ID Nº:4) situado en el extremo de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos. Los parámetros de la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 55°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Según lo pronosticado, se observó un fragmento potente de ADN de 0,5 kb, sugiriendo que la RACE-PCR había tenido éxito en términos de amplificación del extremo carboxilo de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos.

Clonaje de los Productos de la RACE-PCR en el Vector pPCR-Script: El producto de la RACE-PCR fue clonado con el kit de clonaje PCR-Script™ Amp Cloning Kit (Stratagene, CA) siguiendo el protocolo proporcionado por la compañía. Brevemente, el producto de la RACE-PCR fue purificado primeramente con una columna de purificación StrataPrep PCR. Posteriormente, 10 μ l del producto de la RACE-PCR purificado se hicieron de extremos romos a 72°C durante 30 minutos en un volumen final de 13 μ l con 10 μ l del producto de la RACE-PCR purificado, 1,3 μ l de tampón de pulido, 1 μ l de dNTP 10 mM y 1 μ l de ADN polimerasa *Pfu* clonada 0,5 U/ μ l. La ligadura se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora en un volumen final de 10 μ l que contenía 4,5 μ l del producto de la RACE-PCR de extremos romos, 1 μ l del vector de clonaje pPCR-Script 10 ng/ μ l, 1 μ l de tampón de reacción PCR-Script 10x, 0,5 μ l de rATP 10 mM, 1 μ l del enzima de restricción *SrfI* 5 U/ μ l y 1 μ l de ADN ligasa de T4 4 U/ μ l. La reacción de ligadura fue parada mediante calentamiento de la muestra a 65°C durante 5 minutos y, finalmente, 2 μ l de la mezcla de ligadura fueron transformados en bacterias XL10-Gold.

Identificación del Clon de $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos: Como se utilizó un cebador específico de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos para la RACE-PCR del extremo carboxilo de la subunidad $\beta 1A$, teóricamente se clonarán ambas subunidades $\beta 1$ y $\beta 1A$. Para excluir la subunidad $\beta 1$, los clones individuales fueron caracterizados mediante PCR con un par de cebadores para la amplificación específica de la subunidad $\beta 1$. Los cebadores utilizados en la PCR fueron: cebador directo SB1-17 (5'-GTG TCT GAG ATC ATG ATG-3', SEC ID Nº:5) y el cebador inverso SB1-13 (ver anteriormente). Los parámetros de la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 55°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Todos los clones negativos en la PCR no son de una subunidad $\beta 1$ y fueron sometidos a un análisis de secuenciación posterior.

Clonaje de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio a Partir de ADNc de Cerebro Fetal Humano: Con los cebadores específicos para la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos obtenidos mediante RACE-PCR, se clonó también $\beta 1A$ de los canales de sodio a partir de la biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano Marathon-Ready™ (Nº de Cat de Clontech 7402-1, Palo Alto, CA). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que contenía 5 μ l de ADNc de glándula adrenal humana Marathon-Ready™, 5 μ l de tampón de reacción 10x, 200 μ M de dNTP, 200 nM del cebador SB1-6 (5'-GCC ATG GGG AGG CTG CTG GCC TTA GTG GTC-3', SEC ID Nº:6) y el cebador SB1-19 (5'-GTG TGC CTG CAG CTG CTC AA-3', SEC ID Nº:7) y 1 μ l de mezcla de ADN polimerasas Advantage2 50x (Clontech). Los parámetros de la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 55°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Se recogieron 4 clones independientes y se sometieron a análisis de secuenciación de ADN bicatenario. Los cuatro clones independientes de cerebro fetal humano tenían todas secuencias idénticas a la de la subunidad $\beta 1A$ clonada en RACE-PCR a partir de glándula adrenal humana. La región codificadora del ácido nucleico de la subunidad $\beta 1A$ humana está proporcionada como SEC ID Nº:12 y el ADNc completo aislado, incluyendo regiones no traducidas (UTR), está proporcionado como SEC ID Nº:13. La región 5' no traducida es la misma que la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos regulados por voltaje. La región 3' no traducida tiene 160 pb de longitud aproximadamente sin el tracto poliA. La traducción empieza en el ATG que comienza en el nucleótido 4 y finaliza en el codón de parada en el nucleótido 808.

Ejemplo 2

Estructura Primaria de la Proteína de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos Regulados por el Voltaje y Estructura Genómica del Gen de $\beta 1$ y $\beta 1A$ (SCN1B)

Mediante la utilización de la técnica RACE-PCR, se clonó una nueva subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. El ADNc contenía una región de 807 pares de bases que codificaba 268 aminoácidos y una región 3' no traducida de 164 pares de bases. La secuencia de aminoácidos traducida se presenta como SEC ID N°:14 e incluye una secuencia señal y sitios potenciales de glucosilación ligada a N, además de un dominio transmembranal. El clon, denominado $\beta 1A$, está relacionado con la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio. Los motivos conservados encontrados en la familia de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio incluyen una secuencia peptídica señal, un dominio plegado de inmunoglobulina extracelular y un dominio transmembranal carboxilo terminal. El péptido pronosticado contiene residuos aminoterminales hidrofóbicos (1-16 residuos) con secuencias enormemente predictivas de los sitios de corte señal que tendrán como resultado proteínas maduras que se inician en el aminoácido 17 [Alanina]. Los residuos carboxilo terminales hidrofóbicos (residuos 243-262) pueden funcionar como dominio transmembranal. La masa molecular estimada de la proteína es de 28,8 kDa aproximadamente después de eliminar el péptido señal del extremo amino. La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos clonada migraba con un Mr aparente de 32 kDa cuando se analizó mediante SDS 8-20%/PAGE. La comparación de las secuencias peptídicas revela que el péptido pronosticado es un 72% idéntico a la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos y a la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC de rata. Igual que la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio de rata, la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos contiene una región amino terminal (1-149) que presenta un 100% de identidad con la subunidad $\beta 1$ humana y una nueva región carboxilo terminal (150-268) que presenta menos de un 17% de identidad con la de la subunidad $\beta 1$ humana (Figura 1). El estudio de la organización genómica del gen de la subunidad $\beta 1$ de los canales de sodio humanos, *SCN1B* (Makita y col., 1994) ha revelado que el gen se extiende 9 kb aproximadamente con seis exones y cinco intrones sobre el cromosoma 19 (19q13.1-q13.2). La búsqueda con BLAST de secuencias genómicas humanas reveló que la región amino terminal de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos (1-149) estaba codificada por los exones 1-3, mientras que la nueva región carboxilo terminal estaba codificada por el intrón 3 adyacente al exón 3 (Figura 2). Como el lugar de divergencia entre los ADNcs de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 1A$ estaba situado precisamente en el límite entre el exón 3 y el intrón 3 del gen *SCN1B*, la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos debe ser considerada como una variante por ajuste de la subunidad $\beta 1$ a través del intrón retenido con un codón de parada en marco. Sin embargo, la región carboxilo terminal de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC humanos tiene menos de un 33% de identidad con la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC de rata. La búsqueda con BLAST de secuencias genómicas humanas con el ADNc que codificaba el extremo carboxilo de la $\beta 1A$ de rata no fue capaz de identificar ninguna región homóloga en el gen de la $\beta 1$ humana, lo cual sugiere firmemente que los extremos carboxilo de la $\beta 1A$ de rata y humana están codificados por el intrón 3 y la diferencia es debida a las diferencias entre especies.

La búsqueda con BLAST en la base de datos del NIH con la secuencia carboxilo terminal de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos reveló también un clon sin asignar (Número de Acceso: AI1742310) en la base de datos EST humana, que fue clonado a partir de un conjunto de cinco bibliotecas de ADNc normalizadas. El clon AI1742310 era más corto que, pero un 100% idéntico a, la región carboxilo terminal (residuos 150-268) de la $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Una búsqueda con BLAST similar no fue capaz de revelar ninguna secuencia con más de un 25% de identidad procedente de cualquier otra base de datos.

Ejemplo 3

De referencia

Producción de Anticuerpos Policlonales

Se seleccionaron dos secuencias peptídicas (HB1A-1 y HB1A-2) derivadas del extremo carboxilo de la subunidad $\beta 1A$ humana, para la producción de anticuerpos policlonales en conejo. Las secuencias de aminoácidos son: (HB1A-1) AC-RWRDRWQAVDRTGC-AMIDA (SEC ID N°:8) y (HB1A-2) AC-CVPHRRSGYRTQL-AMIDA (SEC ID N°:9). Los péptidos fueron sintetizados y se produjeron y purificaron los anticuerpos mediante BioSource International, Inc. Los anticuerpos fueron analizados mediante ELISA frente a los péptidos antigénicos y purificados por afinidad con los mismos péptidos. El suero y los anticuerpos purificados por afinidad fueron utilizados para inmunoanálisis tales como transferencia Western, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

Ejemplo 4

Análisis de la Traducción In Vitro de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos

El ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fue subclonado primeramente en el vector pAGA3, que fue manipulado para obtener una alta eficacia de la transcripción y la traducción *in vitro*. Brevemente, el fragmento de ADNc que codificaba la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fue escindido de la construcción pcDNA3.1 (ver el Ejemplo 6) por digestión con *NcoI* y *XbaI*. Un fragmento de ADNc de 900 pb aproximadamente fue separado en un gel de agarosa al 1% y purificado con el kit de purificación "Qiaquick Spin Purification Kit" (Qiagen). El vector pAGA3 fue también digerido con los enzimas de restricción *NcoI* y *XbaI*. El vector lineal purificado fue ligado con el fragmento de ADNc y transformado en bacterias. Los recombinantes fueron aislados y confirma-

dos mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN. La traducción *in vitro* de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fue realizada con el sistema de transcripción/traducción acopladas “TnT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System” (Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Brevemente, 1 μg de la construcción h $\beta 1A$ /pAGA3 fue añadido a 40 μl de “TnT Quick Master Mix” con 2 μl de [^{35}S]-metionina (1000 Ci/mmol a 10 mCi/ml) en un volumen final de 50 μl . La mezcla de reacción fue incubada a 30°C durante 90 minutos. Se mezclaron 5 μl de la mezcla de reacción con un volumen igual de tampón de carga para SDS/PAGE y se sometieron a SDS 8-20%/PAGE para análisis. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con Azul de Coomassie R250, secado y expuesto a una película de rayos X. La $\beta 1$ humana y la $\beta 1A$ humana migraban hasta el peso molecular pronosticado por la traducción de las secuencias de aminoácidos a partir de las secuencias de ácido nucleico correspondientes.

La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos traducida *in vitro* fue también analizada mediante transferencia Western e inmunoprecipitación.

Ejemplo 5

Análisis de Transferencia Northern de la Expresión de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos

Se utilizó una transferencia Northern para analizar la distribución tisular de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Se utilizó como sonda el fragmento de ADNc que codificaba los residuos 217-268 de la $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Para construir la sonda, un fragmento de ADN de 153 pb fue amplificado primeramente a partir de la construcción de ADN (NQC130) que contenía ADNc de longitud completa de $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos con cebadores específicos para la $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos SB1-25 (5'-T CAA AGC ATG CCT GTC CC-3', SEC ID N°:10) y SB1-20 (5'-TCA AAC CAC ACC CCG AGA AA-3', SEC ID N°:11). Después de la amplificación, el producto de la PCR fue clonado directamente en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y fue confirmado posteriormente mediante secuenciación del ADN. La construcción NQC226 resultante fue digerida con el enzima de restricción *Hind*III y el ADN fue precipitado posteriormente tras extracción con fenol y cloroformo. Para marcar la sonda, el fragmento de ADNc antisentido fue amplificado linealmente con el kit de PCR “Strip-EZ™” (Ambion, TX). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μl , que contenía 25 ng de NQC226 linealizado, 2 μl de tampón de reacción 10x, 2 μl de una solución de dNTP 10x, 2 μl de [α - ^{32}P]-dATP 3000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech), 1 U de ADN polimerasa termoestable y 2 μl del cebador SB1-20 10 pmoles/ μl . Los parámetros de la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 55°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. La sonda marcada fue separada posteriormente del [α - ^{32}P]-dATP libre con una columna MicroSpin™ G-50 (Amersham Pharmacia Biotech).

La transferencia “Human MTN™ (Multiple Tissue Northern) blot” (N° de Cat. 7760-1) y la transferencia “Human Brain MTN™ Blot II” (7755-1) fueron adquiridas a Clontech (Palo Alto, CA). Las transferencias fueron prehibridadas con 5 ml de Solución UltraHyb (Ambion, TX) a 42°C durante 2 horas y posteriormente hibridadas en presencia de 1×10^6 cpm/ml de sonda de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos a 42°C durante una noche. Las transferencias fueron lavadas con 2×200 ml de una solución de SSC 0,2x/SDS 0,1% a 65°C durante 2 horas. Finalmente las transferencias fueron expuestas a una película de rayos X en un congelador a -80°C durante una noche.

El fragmento de ADNc de 2,0 kb que codificaba la β -actina humana fue utilizado como sonda control. Las mismas transferencias fueron cortadas en tiras a 68°C durante 15 minutos con el kit de extracción Strip-EZ™ suministrado por Ambion. Las transferencias fueron luego prehibridadas con 5 ml de UltraHyb a 42°C durante 2 horas y posteriormente hibridadas en presencia de la sonda de β -actina humana durante 2 horas a 42°C. Las transferencias fueron lavadas con 2×200 ml de una solución de SSC 0,2x/SDS 0,1% a 68°C durante 2 horas. Finalmente las transferencias fueron expuestas a una película de rayos X en un congelador a -80°C durante 1 hora.

El análisis de transferencia Northern demostró que había una expresión elevada de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC en, pero sin limitarse a, la mayoría de las regiones del cerebro humano y en el músculo esquelético. Se observaron niveles menores de expresión en corazón, placenta, hígado, riñón y páncreas. En el cerebro, la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC se expresaba muy intensamente en la región de cerebelo. El tamaño de los transcritos de la subunidad $\beta 1A$ de los VGSC variaba ligeramente en los diferentes tejidos. Sin embargo, el transcrito principal tenía un tamaño de 7,5 kb aproximadamente.

Ejemplo 6

Clonaje del ADNc de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos en un Vector de Expresión de Mamífero

El ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fue clonado en los vectores de expresión de mamífero pIRESneo (Clontech) y pcDNA3 (Invitrogen). Los fragmentos de ADNc que codificaban la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fueron escindidos de los plásmidos pPCR-Script (NQC128) mediante digestión con *Bam*HI y *Nor*I, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y purificados mediante el kit de purificación Qiaquick Spin (Qiagen). El vector pIRESneo fue también linealizado con *Bam*HI y *Nor*I y purificado, y ligado posteriormente con el fragmento de ADNc de h $\beta 1A$ aislado de NQC128. Los recombinantes fueron aislados y confirmados mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación con ADN. Los clones NQC141 (h $\beta 1A$ /pIRESneo) fueron utilizados posteriormente para transfectar células de neuroblastoma humano (SK-N-SH) mediante SuperFect (Qiagen) siguiendo

el protocolo del proveedor. Los clones de células estables fueron seleccionados por crecimiento en presencia de G418. Clones individuales resistentes a G418 fueron aislados y se demostró que contenían el gen intacto de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Los clones que contenían los ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fueron analizados para determinar la expresión utilizando técnicas inmunológicas tales como transferencia

5 Western, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para las proteínas de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Los anticuerpos fueron obtenidos de conejos inoculados con péptidos que fueron sintetizados a partir de la secuencia de aminoácidos pronosticada a partir de las secuencias de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. La expresión fue también analizada utilizando un ensayo de entrada de sodio.

10 El gen de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fue insertado en pcDNA3.1 (Invitrogen). El fragmento de ADNc que codificaba la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fue escindido del plásmido NQC130 mediante digestión con *XhoI* y *NotI*, y los insertos de ADNc fueron aislados mediante electroforesis en gel de agarosa y purificados con el kit de purificación "Qiaquick Spin Purification Kit" (Qiagen). El vector, pcDNA3, fue digerido con *BamHI* y *NotI* y el vector lineal fue aislado mediante electroforesis en gel y ligado con los insertos de ADNc. Los

15 plásmidos recombinantes que contenían la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fueron aislados y confirmados mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN. El clon NQC139 ($\beta 1A$ /pcDNA3.1) fue utilizado para transfectar de manera transitoria células de neoblastoma humano (SK-N-SH) mediante SuperFect (Qiagen) y se analizó la función de la $\beta 1A$ sobre la modulación de la entrada de sodio mediante un ensayo de entrada de sodio.

20 La células que expresaban la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos, de manera estable o transitoria, fueron utilizadas para analizar la expresión del canal y para analizar la actividad de unión a ligandos. Estas células fueron utilizadas para identificar y examinar otros compuestos con el fin de determinar su capacidad para modular, inhibir o activar el canal y para competir con la unión de ligandos radiactivos.

25 Casetes que contenían el ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos en orientación positiva con respecto al promotor, fueron ligados en sitios de restricción apropiados 3' desde el promotor e identificados mediante mapeo de los sitios de restricción y/o secuenciación. Estos vectores de expresión de ADNc fueron introducidos en células huésped fibroblásticas, por ejemplo COS-7 (ATCC# CRL 1651) y CV-1 tat [Sackevitz y col., Science 238: 1575 (1987)], 293, L (ATCC# CRL 6362) mediante métodos estándar incluyendo, pero sin limitarse a, electroporación o procedimientos químicos (liposomas catiónicos, DEAE dextrano, fosfato de calcio). Las células transfectadas y los sobrenadantes del cultivo celular pueden ser recogidos y analizados para determinar la expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos según se describe en la presente.

35 Todos los vectores empleados para la expresión transitoria en mamíferos pueden ser utilizados para establecer líneas celulares estables que expresen la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Se espera que las construcciones de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos inalterado clonadas en vectores de expresión programen a las células huésped para que produzcan la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Además, la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos es expresada extracelularmente como una proteína secre-

40 tada ligando las construcciones de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos a ADN que codifique la secuencia señal de una proteína secretada. Las células huésped para la transfección incluyen, pero no se limitan a, CV-1-P [Sackevitz y col., Science 238: 1575 (1987)], tk-L [Wigler y col., Cell 11: 223 (1977)], NS/0 y dHFr-CHO [Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159: 601 (1982)].

45 La cotransfección de cualquier vector conteniendo ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos con un plásmido para selección de fármacos incluyendo, pero sin limitarse a, G418, fosfotransferasa de aminoglucósido, higromicina, fosfotransferasa de higromicina-B, APRT, fosforribosil-transferasa de xantina-guanina, permitirá la selección de clones transfectados de manera estable. Los niveles de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fueron cuantificados por los ensayos descritos en la presente.

50 Las construcciones de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos fueron también ligadas en vectores que contenían marcadores de resistencia a fármacos amplificables para la producción de clones de células de mamífero que sintetizaran los niveles más elevados posibles de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos. Después de la introducción de estas construcciones en las células, los clones que contienen el plásmido son seleccionados con el agente apropiado y se lleva a cabo el aislamiento de un clon que presente sobreexpresión con un elevado número de copias de plásmidos mediante selección en dosis crecientes del agente.

55 La expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante se consigue mediante la transfección de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos de longitud completa en una célula huésped de mamífero.

Ejemplo 7

Clonaje de ADNc de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos en un Vector de Expresión Baculovírico para su Expresión en Células de Insecto

65 Los vectores baculovíricos, que derivan del genoma del virus AcNPV, son diseñados para que proporcionen un nivel de expresión elevado de ADNc en la línea de células de insecto Sf9 (ATCC# CRL 1711). Baculovirus recom-

binantes que expresen ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos son producidos mediante los métodos estándar siguientes (Manual Maxbac de Invitrogen): las construcciones de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos son ligadas en el gen de la polihedrina en una variedad de vectores de transferencia baculovíricos, incluyendo pAC360 y el vector BlueBac (Invitrogen). Los baculovirus recombinantes son generados mediante recombinación homóloga tras la cotransfección del vector de transferencia baculovírico y ADN genómico de AcNPV linealizado [Kitts, P.A., Nuc. Acid. Res. 18: 5667 (1990)] en células Sf9. Los virus pAC360 recombinantes son identificados por la ausencia de cuerpos de inclusión en las células infectadas y los virus pBlueBac recombinantes son identificados sobre la base de la expresión de B-galactosidasa (Summers, M.D. y Smith, G.E., Texas Agriculture Exp. Station Bulletin N° 1555). Después de la purificación de las placas, se mide la expresión de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos mediante los ensayos descritos en la presente.

El ADNc que codifica el marco de lectura abierto completo de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos es insertado en el sitio de *Bam*HI de pBlueBacII. Las construcciones que están en la orientación positiva son identificadas mediante análisis de la secuencia y utilizadas para transfectar células Sf9 en presencia de ADN lineal de AcNPV de tipo medio.

La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos activa, auténtica, se encuentra en el citoplasma de las células infectadas. La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos activa es extraída de las células infectadas mediante lisis hipotónica o lisis por detergentes.

Ejemplo 8

Clonaje del ADNc de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos en un Vector de Expresión de Levaduras

La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos recombinante es producida en la levadura *S. cerevisiae* después de la inserción del cistron óptimo de ADNc de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos en vectores de expresión diseñados para dirigir la expresión intracelular o extracelular de proteínas heterólogas. En el caso de la expresión intracelular, vectores tales como EmBLyex4 o similares son ligados en el cistron de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos [Rinas, U. y col., Biotechnology 8: 543-545 (1990); Horowitz, B. y col., J. Biol. Chem. 265: 4189-4192 (1989)]. Para la expresión extracelular, el cistron de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos es ligado en vectores de expresión de levaduras que fusionan una señal de secreción (un péptido de levadura o de mamífero) al extremo NH_2 de la proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos [Jacobson, M.A., Gene 85: 511-516 (1989); Riett, L. y Bellon, N., Biochem. 28: 2941-2949 (1989)].

Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, pAVE1>6, que fusiona la señal de la seroalbúmina humana al 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 (1989)]. Además, la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos es expresada en levaduras como una proteína de fusión conjugada a 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 la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos expresada son determinados mediante los ensayos descritos en la presente.

Ejemplo 9

Purificación de la Subunidad $\beta 1A$ de los Canales de Sodio Humanos Recombinante

La subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos producida recombinantemente puede ser purificada mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos.

Las columnas de afinidad con anticuerpos hacia la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos son producidas añadiendo los anticuerpos anti-subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos a Affigel-10 (Biorad), un gel soporte que es preactivado con ésteres de N-hidroxisuccinimida de tal manera que los anticuerpos forman enlaces covalentes con el soporte de esferas de gel de agarosa. Los anticuerpos son luego acoplados al gel mediante enlaces amida con el brazo separador. Los ésteres activados restantes son posteriormente amortiguados con etanolamina HCl 1 M (pH 8). La columna es lavada con agua seguido por glicina HCl 0,23 M (pH 2,6) para eliminar cualquier anticuerpo no conjugado o cualquier proteína extraña. La columna es posteriormente equilibrada en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3) junto con agentes solubilizantes de membrana apropiados tales como detergentes y los sobrenadantes del cultivo celular o los extractos celulares que contienen la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos solubilizada son pasados lentamente a través de la columna. La columna es posteriormente lavada con solución salina tamponada con fosfato junto con detergentes hasta que la densidad óptica (A_{280}) descienda hasta niveles de fondo, posteriormente la proteína es eluida con glicina HCl 0,23 M (pH 2,6) junto con detergentes. La proteína de la subunidad $\beta 1A$ de los canales de sodio humanos purificada es dializada posteriormente frente a solución salina tamponada con fosfato.

Ejemplo 10

Inmunohistoquímica de Tejido Humano

5 *Inmunohistoquímica:* Los protocolos para inmunohistoquímica han sido descritos previamente (D'Andrea y col., 1998). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Después de someter a microondas los portaobjetos en Target (Dako, Carpintería, CA), los portas fueron colocados en PBS, posteriormente en H₂O₂ al 3%, lavados en PBS y posteriormente se añadió un suero bloqueante apropiado durante 10 minutos. A continuación, se aplicó a los portas durante 30 minutos un anticuerpo primario, bien un anticuerpo policlonal de conejo anti- β 1A humana (HB1-A-1, ver el Ejemplo 3) a un título de 1:200, o bien un anticuerpo policlonal de conejo anti- β 1A de rata a un título de 1:400. Para el control negativo el anticuerpo primario fue sustituido por un anticuerpo isotópico de la especie apropiado (Vector Labs, Burlingame, CA). Después de varios lavados con PBS se colocó un anticuerpo secundario biotinilado (Vector Labs) sobre los portas durante 30 minutos. Posteriormente, los portas fueron lavados en PBS y luego se aplicó a las células el complejo avidina-biotina (ABC, Vector Labs) durante 30 minutos. La presencia de los anticuerpos primarios fue detectada mediante la adición de DAB (3'-diaminobencidina HCl; Biomedica, Foster City, CA), 2 veces, 5 minutos. Los portas fueron expuestos brevemente a hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, deshidratados y cubiertos con un cubreobjetos.

20 *Resultados:* Con anticuerpo anti- β 1A humana: Fuimos capaces de detectar β 1A intracelular en las neuronas de los DRG humanos. También localizamos β 1A asociada a la membrana en las fibras neuronales de los DRG. También sometimos a selección una miríada de tejidos humanos y determinamos que la proteína β 1A estaba presente en las células epiteliales del intestino (de borde en cepillo), en los túbulos colectores (distal > proximal) del riñón (que mostraban un marcaje destacado) y en la próstata. Observamos también inmunomarcaje de β 1A en el cerebro (neuronas piramidales de la corteza, células de Purkinje del cerebelo y muchas de las fibras neuronales por todo el cerebro), en las células endoteliales del pulmón y de otros tejidos, en la membrana de macrófagos del pulmón y del útero y en los cardiocitos del corazón. No observamos niveles detectables significativos de β 1A en los tejidos siguientes: tiroides, bazo, hígado y páncreas. Observamos también una distribución similar de β 1A en tejido de rata con este anticuerpo anti- β 1A humana.

Ejemplo 11

Análisis de la Subunidad β 1A de los VGSC Expresada en Oocitos de Xenopus Mediante la Técnica de Pinzamiento Zonal de la Membrana ("Patch Clamp")

35 1. *Síntesis de ARNc:* Las construcciones de expresión de β 1A y Na_v 1.2 (una subunidad α de tipo II de la familia de proteínas de los canales de sodio regulados por voltaje obtenida del Dr. A. Correa, UCLA Medical Center, Department of Anesthesiology) fueron linealizadas con enzimas de restricción. Los ARNcs fueron sintetizados *in vitro* con ARN polimerasa de T7 utilizando los reactivos y protocolos del kit de transcripción mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion, Austin, TX), con la excepción de que la etapa de precipitación con LiCl fue repetida dos veces. Los ARNcs fueron suspendidos en H₂O tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) a una concentración final de 1-2 mg/ml.

45 2. *Aislamiento de Oocitos:* Las ranas (*Xenopus laevis*) fueron anestesiadas por inmersión en tricafina al 0,15-0,17% en agua y extraídas del baño de tricafina. Los lóbulos ováricos fueron posteriormente expuestos mediante una pequeña incisión realizada en su pared abdominal, extraídos y colocados en una solución OR-2 libre de Ca²⁺ estéril (OR-2 libre de Ca²⁺: NaCl 82,5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM, ajustando el pH a 7,6 con NaOH) y las ranas fueron devueltas a agua sin tricafina para su recuperación. Los lóbulos ováricos fueron luego lavados con agua estéril, abiertos mediante rasgado e incubados a temperatura ambiente en OR-2 libre de Ca²⁺ que contenía 2 mg/ml de collagenasa (tipo I, BRL) para producir la liberación y desfoliculación de los oocitos. Después de 1 hora en un agitador orbital (60 ciclos por minuto aproximadamente), los oocitos fueron transferidos a una placa Petri con OR-2. Los oocitos muertos y los oocitos demasiado pequeños fueron retirados por aspiración y los oocitos seleccionados fueron lavados varias veces con una solución OR-2 libre de Ca²⁺ y libre de collagenasa, incubados bajo agitación durante una hora adicional con cambios de la solución cada 7-8 minutos y colocados en un incubador a 19°C e incubados durante 1 hora adicional en una mezcla 1:4 de soluciones SOS y OR-2 libre de Ca²⁺ estériles (SOS: NaCl 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, ajustándose el pH a 7,6 con NaOH) y 30 minutos en SOS/OR-2 libre de Ca²⁺ 1:3. Los oocitos fueron colocados posteriormente en SOS al 100%, seleccionados una vez más y mantenidos a 19°C.

60 3. *Inyecciones:* Los oocitos fueron inyectados con 50 nl que contenían los ARNcs que iban a ser traducidos a una concentración final de 100 μ g/ml de cada especie y oligonucleótidos a las concentraciones indicadas. Las inyecciones se llevaron a cabo inmediatamente después del aislamiento o a tiempos variables después del mismo durante un periodo de hasta 3 días. Los oocitos inyectados fueron mantenidos a 17-19°C en SOS estéril que contenía 50 μ g/ml de gentamicina con cambios diarios de la solución hasta que fueron utilizados para el ensayo electrofisiológico (4-6 días después de la inyección).

65 4. *Registros Electrofisiológicos de los Oocitos:* La fijación del voltaje con sello de vaselina en un hueco abierto de los oocitos (Taglialatela y col., 1992) fue realizada con un montaje de fijación de oocitos abiertos CA-1 (Dagan, Minneapolis, MN). La solución experimental externa contenía NMG-Mes 120 mM, HEPES 10 mM y Ca(Mes)₂ 2

mM a pH 7.4. La solución experimental interna contenía NMG-Mes 120 mM, HEPES 10 mM y EGTA 2 mM a pH 7.4. La corriente de descarga espontánea y la corriente de capacidad lineal fueron compensadas y sustraídas en línea utilizando el protocolo p/-4 del potencial de retención de -90 mV (SHP). Las señales fueron filtradas con un filtro de ocho polos de Bessel hasta 1/5 de la frecuencia de muestreo. Todos los registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-23°C).

5. *Adquisición y Análisis de los Datos:* Las corrientes de apertura e iónica fueron adquiridas con una consola PC44 (Innovative Technologies, Moorpark, CA), que estaba interconectada con un ordenador Pentium a través de una ranura AT compatible con IBM. La curva G-V máxima fue obtenida con una solución interna de NaMes 15 mM y una solución externa de NaMes 1 mM (con N-metil-glucamina (NMG) para sustituir a los cationes restantes). El potencial inverso fue determinado a partir de una I-V instantánea después de sustraer el componente de apertura y la conductancia máxima fue calculada dividiendo la corriente máxima entre la diferencia de voltaje del potencial inverso. Dentro de la resolución temporal de la fijación, la curva I-V instantánea era lineal, por lo que no se hicieron correcciones adicionales.

6. *Resultados:* Según se muestra en la Figura 3, la corriente iónica conducida por Na_v 1.2 fue incrementada significativamente por la coexpresión con la subunidad β 1A en los oocitos. A la proporción de ARNc de 1:20 (Na_v 1.2 frente a β 1A), la corriente iónica fue incrementada alrededor de 3 veces. Los resultados indican que la subunidad β 1A desempeña un papel importante incrementando el número de canales de sodio funcionales presentes en la superficie celular.

Ejemplo 12

Incremento Regulado y Redistribución de la Subunidad β 1A en Neuronas de los Ganglios de la Raíz Dorsal de Rata Después de una Ligadura del Nervio Espinal

1. *Ligadura del Nervio Espinal:* Todos los procedimientos que implicaban la utilización de animales fueron llevados a cabo según las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee, The R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute and American Association for Laboratory Animal Care. La ligadura de los nervios espinales (SNL) se realizó según está descrito por Kim y Chung (1992). Brevemente, ratas Sprague-Dawley machos (Harlan, Indianapolis, IN) que pesaban aproximadamente 200 g fueron anestesiadas con isoflurano. El nervio espinal a nivel de L5 o L6 fue expuesto a través de una incisión a la izquierda de la línea media dorsal y, después de retirar la apófisis vertebral transversa L6 izquierda, ligado fuertemente con seda 6-0. La incisión fue posteriormente cerrada con vicril 4.0 (fascia) y agrafes cutáneos. Se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia y se comprobó la función motora de los miembros posteriores antes de que fueran devueltos al grupo de estabulación. Los animales control no fueron sometidos a cirugía.

2. *Evaluación de la Alodinia Mecánica:* La alodinia fue determinada colocando las ratas individualmente en una plataforma de rejilla metálica de tal manera que la superficie plantar de cada pata posterior pudiera ser estimulada desde abajo. Se aplicó una serie ascendente de estímulos táctiles utilizando filamentos de von Frey calibrados (0,25 - 15 g) hasta que se observó una respuesta de levantamiento rápido de la pata. Se empleó un método de “arriba-abajo” (Chaplan y col., 1994) para determinar el umbral de respuesta en gramos. Los animales de los que se obtuvo tejido fueron analizados a varios puntos de tiempo después de la cirugía para asegurar que los umbrales de respuesta de la pata ipsilateral estaban en, o por debajo de, el criterio de 4 g. Adicionalmente, un grupo de animales separado de la misma edad (n=3-12 ligados, n=7 control) fueron analizados para determinar la alodinia mecánica a varios tiempos (3 días, 10 días, 21 días y 8 semanas) después de la cirugía para determinar el perfil de la variación con el tiempo de los umbrales de respuesta ipsilateral y contralateral, así como la respuesta de los animales control.

3. *Preparación del Tejido:* A los 2 días, 14 días y 8 semanas después de la cirugía, se sacrificaron animales (n=3-5) mediante asfixia con CO_2 y se perfundieron transcárdialmente con paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los DRGs L4 y L5, se procesaron para inclusión en parafina en un formato multitisular, se seccionaron de manera seriada a 5 μm y se montaron en portaobjetos Superfrost-Plus (Fisher, Pittsburgh, PA).

4. *Inmunohistoquímica:* Los protocolos para la inmunohistoquímica (IHC) de rutina han sido descritos previamente (D'Andrea y col., 1998). Brevemente, los cortes de parafina fueron desparafinados, hidratados y sometidos a microondas en tampón Target (Dako, Carpintería, CA). Las secciones fueron enfriadas, colocadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.4) y tratadas posteriormente con H_2O_2 al 3,0% durante 10 minutos para inactivar las peroxidasa endógenas. Todas las incubaciones con reactivos y lavados posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Un suero bloqueante normal (Vector Labs, Burlingame, CA) fue colocado sobre los tejidos durante 10 minutos seguido por un corto lavado en PBS. Los tejidos fueron luego incubados con el anticuerpo primario durante 30 minutos y lavados, y tratados posteriormente con los anticuerpos secundarios biotinilados, anti-conejo de cabra (Vector Labs) durante 30 minutos. Se utilizaron anticuerpos anti- β 1A y anti- β 1 policlonales de conejo previamente caracterizados (Kazen-Gillespie y col., 2000) con títulos de 1:400. Después de un lavado en PBS, los tejidos fueron tratados con el reactivo complejo de avidina-biotina-HRP (Vector Labs) durante 30 minutos. Los portas fueron tratados 2 x 5 minutos con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Biomedica, Foster City, CA), lavados, contrateñidos con hematoxilina, deshidratados, aclarados en xileno y cubiertos con un cubreobjetos. Se utilizaron como control positi-

vo anticuerpos monoclonales específicos para la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN, 1:1.000; Chemicon, Temecula, CA) para confirmar la antigenicidad del tejido y la calidad de los reactivos. Los controles negativos incluían la sustitución del anticuerpo primario por suero no inmunizado con el isotipo de IgG de la especie (Vector Labs).

5 *5. Evaluación del Inmunomarcaje de $\beta 1A$ y $\beta 1$:* Los tejidos montados en los portaobjetos en un formato de múltiples tejidos fueron teñidos simultáneamente para minimizar la potencial variabilidad de la tinción. Las neuronas de los DRG L4 y L5 ipsilaterales y contralaterales con núcleos prominentes de cada animal fueron caracterizadas como nociceptivas si el diámetro era $<25 \mu m$; todas las demás fueron designadas como neuronas sensoriales (Oh y col., 1996; Gould y col., 1998). La tinción de 30-40 neuronas por DRG por animal fue valorada de acuerdo con los criterios siguientes: 1) la no inmunorreactividad fue puntuada como 0,0; 2) una inmunorreactividad débil fue puntuada como 1,0; 3) una inmunorreactividad moderada fue puntuada como 2,0 y 4) una inmunorreactividad intensa fue puntuada como 3,0. Si la intensidad del inmunomarcaje estaba entre estas unidades de numeración enteras, se utilizaba un incremento de 0,5 (esto es, 1,5 significa un marcate de débil a moderado). Se hizo posteriormente la media de estos 15 datos por animal y por grupo ($n=3-5$ por grupo).

La morfología de la inmunorreactividad de $\beta 1A$ y $\beta 1$ en las neuronas nociceptivas y sensoriales de los DRG L5 fue también caracterizada como 1) homogénea: un patrón de marcate difuso; 2) punteada: varios agregados de tinción agrupados, intracelulares, similares a Nissl y 3) membranar: marcate periférico prominente localizado predominantemente a lo largo de la membrana celular. Los datos están presentados como porcentaje de cada patrón de marcate observado por DRG por grupo (Tabla 2).

Datos y Análisis Estadístico. Los datos de la tinción de $\beta 1A$ y $\beta 1$ fueron agrupados para identificar el nivel espinal de los DRG (L4 o L5), la lateralidad (contralateral o ipsilateral), el tipo neuronal (pequeño o grande) y el tiempo de ligadura (control sin ligadura, 2 días, 14 días y 8 semanas tras la SNL). En los 16 subgrupos resultantes, las medidas de la intensidad de la tinción de proteínas y los factores del tiempo de ligadura representaban valores ordenados de manera natural. La evaluación de los datos iniciales indicaba la ausencia de normalidad en la distribución de la respuesta valorada, sugiriendo la modelización mediante un método no paramétrico. Por tanto, se eligió el test de Jonckheere-Terpstra monolateral para evaluar la hipótesis básica de que la distribución de las valoraciones medias de la expresión de las proteínas cambiaba a lo largo del tiempo de ligadura.

Resultados. Alodinia mecánica: Las ratas con SNL presentaban una drástica disminución ipsilateral en el umbral de respuesta de von Frey hasta menos de 2 g y posteriormente 1 g a los tres y a los diez días después de la lesión, respectivamente. Este nivel incrementado de sensibilidad táctil en la pata ipsilateral se mantuvo a lo largo de todo el periodo de ensayo de ocho semanas. Los umbrales de respuesta de la pata contralateral fueron en general similares a las respuestas de los controles o anteriores a la lesión, esto es, 13-15 g; sin embargo, se observaron sensibilidades incrementadas (8-10 g) tres días después de la lesión, reflejando posiblemente un efecto post-quirúrgico generalizado. Las respuestas de los animales control a la estimulación de von Frey estuvieron dentro del rango de 13-15 g a lo largo de todo el periodo de ocho semanas, bilateralmente.

Intensidad del marcate de $\beta 1A$ en DRG: En la Figura 4 se muestra una representación gráfica de las intensidades medias de tinción en cada grupo de DRGs estudiado. En las neuronas nociceptivas y en las neuronas sensoriales, el inmunomarcaje de $\beta 1A$ aumentaba con el tiempo post-quirúrgico, siendo este incremento más pronunciado en las neuronas ipsilaterales. La Tabla 1 enumera los valores de p resultantes del análisis de Jonckheere-Terpstra de la relación intensidad frente a tiempo.

Intensidad del marcate de $\beta 1$ en DRG: En la Figura 5 se muestra una representación gráfica de la intensidad media de marcate de cada grupo de DRGs estudiado. Aunque el inmunomarcaje de $\beta 1$ tendía a incrementar con el tiempo post-quirúrgico, esta tendencia tenía mayor significación en el DRG L4 que en el DRG L5 (Tabla 1).

Distribución subcelular de la inmunorreactividad $\beta 1A$ y $\beta 1$: En ratas control, las subunidades $\beta 1A$ y $\beta 1$ de los canales de sodio presentaban localizaciones subcelulares idénticas, estando toda la tinción distribuida virtualmente de manera difusa por toda la célula. Tras la SNL, sin embargo, las distribuciones subcelulares de las subunidades divergían notablemente. Mientras que la tinción de la subunidad $\beta 1$ permanecía distribuida uniformemente en las neuronas de los DRG en las que se localizaba, la localización de $\beta 1A$, muy notablemente en las neuronas nociceptivas, asumía un patrón de distribución alterado post-SNL. La tinción de la subunidad $\beta 1A$ se localizaba discretamente en un área proximal a la membrana celular. Mientras que virtualmente el 100% de la tinción de $\beta 1A$ estaba distribuida difusamente en las células de los DRG de las ratas control, solamente el 23% estaba distribuida homogéneamente en las neuronas nociceptivas, ipsilaterales, del DRG L5 (Tabla 2). En estas células, el 51% de la tinción de $\beta 1A$ estaba localizado proximal a la membrana celular. Las neuronas sensoriales de los DRG ipsilaterales, así como las neuronas nociceptivas y sensoriales contralaterales, presentaban también distribuciones subcelulares alteradas de $\beta 1A$. En estas células, el 58-76% de la tinción de $\beta 1A$ permanecía difusa, alrededor del 20% aparecía punteada o similar a Nissl, y el resto se localizaba adyacente a la membrana celular (Tabla 2). Por tanto, además de presentar diferencias en la intensidad de su marcate en neuronas de los DRG después de la SNL, las subunidades $\beta 1A$ y $\beta 1$ de los canales de sodio diferían notablemente en su localización subcelular tras la SNL.

Ejemplo 13

De referencia

5 *Selección e Identificación de Pequeñas Moléculas que Interaccionan Directamente con la Subunidad β 1A de los VGSC*

Una de las funciones reguladoras de la subunidad β 1A es incrementar los canales funcionales mediante el reclutamiento de subunidades α hacia la superficie celular. La alteración de la función normal de la subunidad β 1A puede tener como resultado la disminución regulada de los canales de sodio funcionales en los DRG después de una lesión nerviosa. Pequeñas moléculas que interaccionan con la subunidad β 1A fueron identificadas mediante la tecnología de electroforesis capilar zonal CETEK. En primer lugar, la proteína diana, subunidad β 1A de los VGSC, fue sobreexpresada en bacterias. El ADNc de la subunidad β 1A fue subclonado en el vector de expresión de bacterias pET29b (Novagen). La construcción de expresión fue transformada posteriormente en *E. coli* BL21 (DE3) y la expresión de la β 1A inducida por la adición de IPTG a temperatura ambiente durante 4 horas. Una colonia individual nueva procedente de una placa fue inoculada en 50 ml de medio LB que contenía 15 μ g/ml de Kanamicina e incubada con agitación a 37°C hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,6. La expresión de la proteína de fusión de la subunidad β 1A fue inducida por la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y la incubación a temperatura ambiente durante 4 horas. Para el análisis de SDS-PAGE, se alicuotaron 100 μ l de los cultivos antes y después de la inducción con IPTG. Las células fueron sedimentadas por centrifugación, resuspendidas en 20 ml de tampón de carga SDS y sometidas a SDS 4-20%-PAGE. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con Simple-Blue™ SafeStain (Invitrogen) y desteñido durante una noche con agua. Calle 1: marcador de proteínas de alto peso molecular (BioRad), Calle 2: lisado celular total antes de la inducción y Calle 3: lisado celular total después de la inducción.

La proteína de fusión de la subunidad β 1A resultante tenía una marca S, un motivo de 15 aminoácidos en su extremo N y seis histidinas en su extremo C. la proteína de fusión fue posteriormente purificada por afinidad con una columna de Ni²⁺ y marcada no covalentemente con un fluoróforo en la marca S. Los desplazamientos de la movilidad de la subunidad β 1A en electroforesis capilar después de su unión a una molécula pequeña que cambia la conformación o la carga de la superficie de la proteína diana fueron detectados con fluorescencia inducida por láser.

30 Ejemplo 14

Ensayo funcional de los canales de sodio

La actividad reguladora de la subunidad β 1A fue también estudiada mediante su coexpresión con la subunidad α formadora de poros y conductora de iones en células eucarióticas, en las cuales la actividad de los canales de sodio se analizó mediante bioensayos funcionales. Las subunidades α fueron, pero sin limitarse a, Na_v 1.2, Na_v 1.3, Na_v 1.6, Na_v 1.8 y Na_v 1.9, respectivamente. La determinación de la actividad de los canales de sodio se llevó a cabo utilizando dos ensayos basados en células. El primer ensayo implicaba el cultivo de células en placas de 96 pocillos conteniendo una placa base de centelleo. Las monocapas celulares fueron estimuladas con veratridina o cualquier otro activador de canales de sodio apropiado en presencia de [¹⁴C]-guanidina. Cuando el canal de sodio se abre, los iones de [¹⁴C]-guanidinio fluyen hacia las células según su gradiente de concentración. Como las células están muy próximas a la base de centelleo, se emite luz. La cantidad de luz emitida es proporcional al nivel de actividad de los canales de sodio y es cuantificada utilizando un contador de centelleo. El segundo ensayo utilizó un colorante fluorescente sensible al potencial. Monocapas de células fueron cargadas con el colorante sensible al potencial durante 30 minutos a 37°C. Después de este periodo de incubación, las células fueron estimuladas con veratridina o cualquier otro activador de los canales de sodio, y se monitorizó el cambio de la fluorescencia mediante un fluorímetro, un lector de placas de imagen fluorescente (FLIPR) o un sistema de tratamiento de imágenes celulares basado en fluorimetría. Cuando las células se despolarizan el colorante se asocia a la membrana celular, teniendo como resultado un incremento de la fluorescencia. Cuando las células se hiperpolarizan, el colorante se disocia de la membrana, teniendo como resultado una disminución de la fluorescencia.

Ejemplo 15

Ensayo de Adhesión Celular

Como las subunidades β de los canales de sodio han sido implicadas en la adhesión célula-célula homofílica, se analizó la función de la subunidad β 1A sobre la adhesión celular. El ensayo de adhesión utilizó fibroblastos de ratón L, que carecen de la mayoría de las macromoléculas requeridas para la adhesión célula-célula. Estas células L fueron transfectadas, de manera estable o de manera transitoria, con β 1A y sembradas en placas de 96 pocillos. Otro conjunto de transfectantes células L- β 1A fue cargado con un colorante fluorescente viable y añadido a los cultivos de las placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de compuestos candidatos. Después de un periodo de incubación determinado, las placas fueron colocadas en un lector de placas de fluorescencia. Si había tenido lugar una adhesión célula-célula homofílica, se observaba un incremento detectable de la fluorescencia. Con el fin de determinar la actividad específica, la señal se comparó con la fluorescencia observada utilizando células L no transfectadas marcadas con un colorante fluorescente viable.

TABLA 1

Análisis estadísticos de las tendencias a lo largo del tiempo post-SNL del nivel de expresión de $\beta 1A$ y $\beta 1$ en neuronas de los DRG. Los valores de p dados fueron obtenidos mediante el análisis de Jonckheere-Terpstra de una cola de los datos fundamentales de las Figuras 9 y 10

DRG	Lado con Relación a la Ligadura	Tipo de Neurona del DRG	valor de p	
			$\beta 1A$	$\beta 1$
L5	ipsilateral	nociceptiva	0,003*	0,058
		sensorial	0,011*	0,058
	contralateral	nociceptiva	0,029*	0,042*
		sensorial	0,035*	0,097
L4	ipsilateral	nociceptiva	0,007*	0,023*
		sensorial	0,006*	0,001*
	contralateral	nociceptiva	0,001*	0,041*
		sensorial	0,036*	0,019*

*valor de p < 0,05

TABLA 2

Distribución subcelular de la tinción de $\beta 1A$ y $\beta 1$ en neuronas del DRG L5 dos semanas después de la SNL

Anticuerpo	Lado con Relación a la Ligadura	Distribución de la tinción	Porcentaje del total	
			nociceptivas	sensoriales
$\beta 1A$	ipsilateral	Membranal	51	11
		Punteada	26	18
		Homogénea	23	71
	contralateral	Membranal	28	4
		Punteada	14	20
		Homogénea	58	76
$\beta 1$	ipsilateral	Membranal	0	0
		Punteada	0	0
		Homogénea	100	100
	contralateral	Membranal	0	0
		Punteada	0	0
		Homogénea	100	100

Referencias

Balser, J.R. (1999) Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc. Res.* 42: 327-38.

Catterall, W.A. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.* 72: S15-S48.

Catterall, W.A. (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 16: 500-506.

Chabal, C., Russel, L.C., Burchiel, K.J. (1989) The effect of intravenous lidocaine, tocainide, and mexiletine on spontaneously active fibers originating in rat sciatic neuromas. *Pain* 38: 333-338.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., LL. JM., Yaksh, T.L. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Meth.* 53: 55-63.

D'Andrea, M.R., Derian, C.K., Leturcq, D., Baker, S.M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A.L., Santulli, R.J., Brass, L.F., Andrade-Gordon, P. (1998) Characterization of protease activated receptor (PAR-2) immunoreactivity in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 157-164.

Devor, M., Keller, C.H., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. (1989) Na⁺ channel accumulation on axolemma of afferent endings in nerve end neuromas in *Apteronotus*. *Neurosci. Lett.* 102: 149-154.

Devor, M., Wall, P.D., Catalan, N. (1992) Systematic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48: 261-268.

Devor, M. (1994) The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In *Textbook of Pain*, eds. Wall, P.D., Melzack, R. (Churchill Livingstone, Edinburgh), 2^a Ed., pp. 79-101.

Dib-Hajj, S., Black, J.A., Felts, P., Waxman, S.G. (1996) Down-regulation of transcripts for Na channel α -SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *PNAS* 93: 14950-14954.

England, J.D., Gamboni, F., Ferguson, M.A., Levinson, S.R. (1994) Sodium channels accumulate at the tips of injured axons. *Muscle Nerve* 17: 593-598.

England, J.D., Happel, L.T., Kline, D.G., Gamboni, F., Thouron, C.L., Liu, Z.P., Levinson, S.R. (1996) Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurology* 4: 272-276.

Gould, H.J. 3^o, England, I.D., Liu, Z.P., Levinson, S.R. (1998) Rapid sodium channel augmentation in response to inflammation induced by complete Freund's adjuvant. *Brain Research* 802: 69-74.

Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.B., Reber, B.F.X., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L. y Catterall, W.A. (1992) Primary structural and functional expression of the β 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256: 839-842.

Isom, L.L., De Jongh, K.S., Catterall, W.A. (1994) Auxiliary β subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*. 12: 1183-1194.

Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F.X., Scheuer, T., Catterall, W.A. (1995) Structure and function of the β 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83: 433-442.

Isom, L.L., Catterall, W.A. (1996) Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 383(6598): 307-8.

Kazen-Gillespie, K., Ragsdale, D.S., D'Andrea, M.R., Laura, N., Mattei Rogers, K.E., Isom, L.L. (2000) Cloning, localization, and functional expression of sodium channel β 1A subunits. *J. Biol. Chem.* 275:2:1079-1088.

Kazen-Gillespie, K., Ragsdale, D.S., D'Andrea, M.R., Rogers, K.E., Isom, L.L. (2000) Cloning, localization, and functional expression of sodium channel β 1A subunits. *J. Biol. Chem.* 275: 1-12.

Kim, S.H., Chung, J.M. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363.

Marban, E., Yamagisbi, T., Tomaselli, G.F. (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol. (Lond)* 508(Pt 3): 647-57.

Matzner, O., Devor, M. (1992) Na⁺ conductance and the threshold for repetitive neuronal firing. *Brain Res.* 597: 92-98.

Matzner, O., Devor, M. (1994) Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J. Neurophysiol.* 72: 349-359.

Moran, O., Nizzari, M. y Conti, F. (2000) Endogenous expression of the BIA sodium channel subunit in MEK-293 cells. *FEBS Letters* 473: 132-134.

Sutkowski, E.M. y Catterall, W.A. (1990) β 1 subunits of sodium channels. *J. Biol. Chem.* 256: 12393-12399.

Nordin, M., Nystrom, B., Wallin, U., Hagbarth, K.-E. (1984) Ectopic sensory discharges and paresthesiae in patients with disorders of peripheral nerves, dorsal roots and dorsal columns. *Pain* 20: 231-245.

Ochoa, J., Torebjork, H.E. (1980) Paresthesiae from ectopic impulse generation in human sensory nerves. *Brain* 103: 835-854.

Oh, Y., Sashihara, S., Black, J.A., Waxman, S.G. (1995) Na⁺ channel β 1 subunit mRNA: differential expression in rat spinal sensory neurons, *Mol. Brain Res.* 30: 357-361.

Omana-Zapata, I., Khabbaz, M.A., Hunter, J.C., Clarke, D.E., Bley, K.R. (1997) Tetrodotoxin inhibits neuro-pathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. *Pain* 72(1-2): 41-9.

Porreca, F., Lai, J., Bian, D., Wegert, S., Ossipov, M.H., Eglen, R.M., Kassotakis, L., Novakovic, S., Rabert, D.K., Sangameswaran, L., Hunter, J.C. (1999) A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7640-4.

Rizzo, M.A. (1997) Successful treatment of painful mononeuropathy with carbamazepine: insights into a possible molecular pain mechanism. *J. Neurol. Sci.* 152: 103-106.

Tanaka, M., Cummins, T.R., Ishikawa, K., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Waxman, S.G. (1998) SNS Na⁺ channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. *NeuroReport* 9(6): 967-72.

Wallace, R.H., Wang, D.W., Singh, R., Scheffer, I.E., George, A.L. Jr., Phillips, H.A., Saar, K., Reis, A., Johnson, E.W., Sutherland, G.R., Berkovic, S.F., Mulley, J.C. (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nature Genetics* 19: 366-70.

Waxman, S.G., Brill, M.H. (1978) Conduction through demyelinated plaques in multiple sclerosis: computer simulations of facilitation by short internodes. *J. Neurol. Neurosurg.* 41: 408-417.

Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Black, J.A. (1994) Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons and is reexpressed following axotomy. *J. Neurophysiol.* 72: 466-470.

Woolf, C.J., Safieh-Garabedian, B., Ma, Q.-P., Crilly, P., Winters, J. (1994) Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 62: 327-331.

Waxman, S.G., Dib-Hajj, S., Cummins, T.R., Black, J.A. (1999). Sodium channels and pain. *PNAS* 96(14): 7635-9.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que codifica la SEC ID N°:14 o los aminoácidos 150 a 268 de la SEC ID N°:14.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde el polinucleótido es ARN.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde el polinucleótido es ADN.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de: SEC ID N°:12 y SEC ID N°:13.
5. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde dicha molécula de ADN es ADN genómico.
6. Un vector de expresión que contiene un gen recombinante que codifica la SEC ID N°:14.
7. El vector de expresión de la reivindicación 6, donde el vector de expresión contiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de: SEC ID N°:12 y SEC ID N°:13.
8. El vector de expresión de la reivindicación 6, donde el vector de expresión contiene ADN genómico que codifica la SEC ID N°:14.
9. Una célula huésped que contiene un polinucleótido que codifica la SEC ID N°:14.
10. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que dicho polinucleótido tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de: SEC ID N°:12 y SEC ID N°:13.
11. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que dicho polinucleótido es ADN genómico.
12. Un proceso para expresar una proteína en una célula huésped, que comprende: (a) la introducción de un vector de expresión en una célula, donde el vector contiene un polinucleótido de SEC ID N°:12 o SEC ID N°:13 o un polinucleótido cuya secuencia es complementaria a la misma; y (b) el cultivo de la célula de la etapa (a) bajo condiciones que permitan la expresión de una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos o por la secuencia complementaria a la misma.
13. Una proteína aislada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:14, la cual cuando es combinada con una proteína de la subunidad α de los canales de sodio humanos en una célula permite el flujo de iones sodio en la célula.

Figura 1

A:

hβ1A	1	MGRLLALVVGAAALVSSACGGCVEVDSETEAVYGMTFKILCISCKRRSETN	50
rβ1A	1	MGTLLALVVGAVLVSSAWGGCVEVDSETEAVYGMTFKILCISCKRRSETT	50
hβ1A	51	AETFTTEWTFRQKGTEEFVKILRYENEVLQLEEDERFEGRVVWNGSRGTD	100
rβ1A	51	AETFTTEWTFRQKGTEEFVKILRYENEVLQLEEDERFEGRVVWNGSRGTD	100
hβ1A	101	LQDLSIFITNVTYNHSGDYECHVYRLLFFENYEHNTSVVKKIHIEVVDKG	150
rβ1A	101	LQDLSIFITNVTYNHSGDYECHVYRLLFPDNYEHNTSVVKKIHIEVVDKG	150
hβ1A	151	ESGAACPFTVTTHRRARWRDRWQAVDRTGWLCWPNRPPQQRABEGGSSPS	200
rβ1A	151	KWS.....LVTLWQARWRDRWKEGDR...LVSHRGQLTPRSHRGK.DTPF	191
hβ1A	201	CPLQLWPLFLSSPRRGQ.SMPVPHRRSGYRTQLCHLCCMTSGRCL.LSLS	248
rβ1A	192	LVLETSALQHTG...GQIRTPTPPPTNGMCIGL.HSCCVTSDGCIPISEP	237
hβ1A	249	QRVVLGLPGIIR..CVSRGVV.....	268
rβ1A	238	QACPGPERIFCMACCVSQAGPHWRDVGTYLRPQWE	273

B:

β1A	1	MGRLLALVVGAAALVSSACGGCVEVDSETEAVYGMTFKILCISCKRRSETN	50
hβ1	1	MGRLLALVVGAAALVSSACGGCVEVDSETEAVYGMTFKILCISCKRRSETN	50
hβ1A	51	AETFTTEWTFRQKGTEEFVKILRYENEVLQLEEDERFEGRVVWNGSRGTD	100
hβ1	51	AETFTTEWTFRQKGTEEFVKILRYENEVLQLEEDERFEGRVVWNGSRGTD	100
hβ1A	101	LQDLSIFITNVTYNHSGDYECHVYRLLFFENYEHNTSVVKKIHIEVVDKG	150
hβ1	101	LQDLSIFITNVTYNHSGDYECHVYRLLFFENYEHNTSVVKKIHIEVVDKA	150
hβ1A	151	ESGAACPFTVTTHRRARWRDRWQAVDRTGWLCWPNRPPQ.QRABEGGSSP	199
hβ1	151	NRDMA...SIVSEIMMY...VLIVVLTINLVAEMIYCYKKIAAATETAAQ	194
hβ1A	200	SCPLQLWPLFLSSPRRGQSMPVPHRRSGYRTQLCHLCCMTSGRCLLSLSQ	249
hβ1	195	ENASEYLAIITSESKENCTGVOVAE.....	218

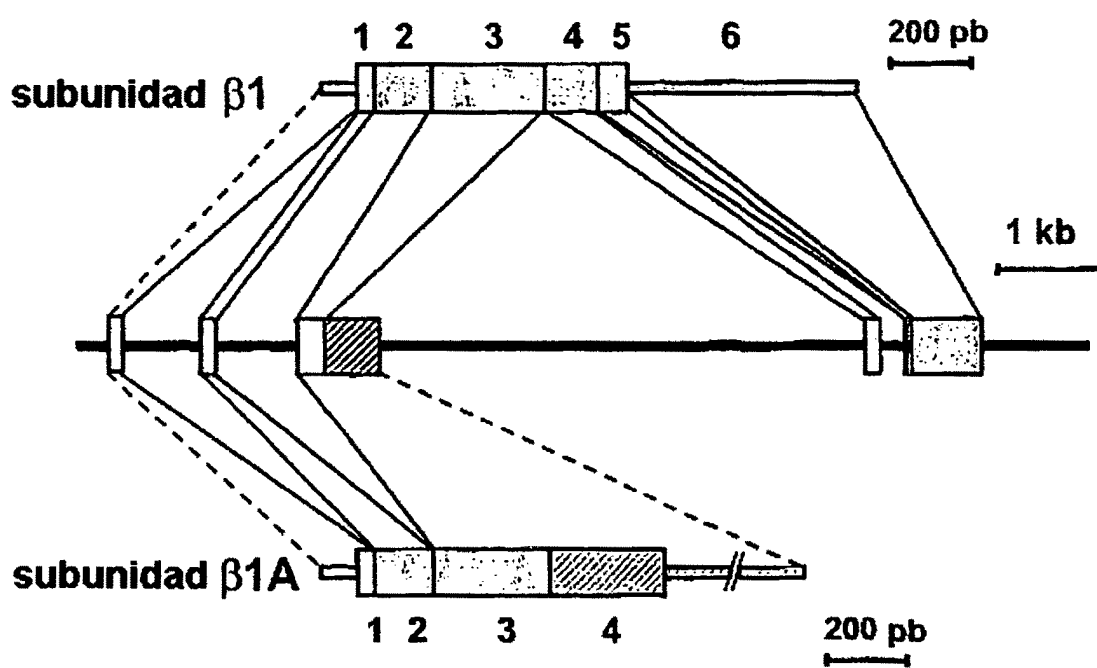


Figura 2

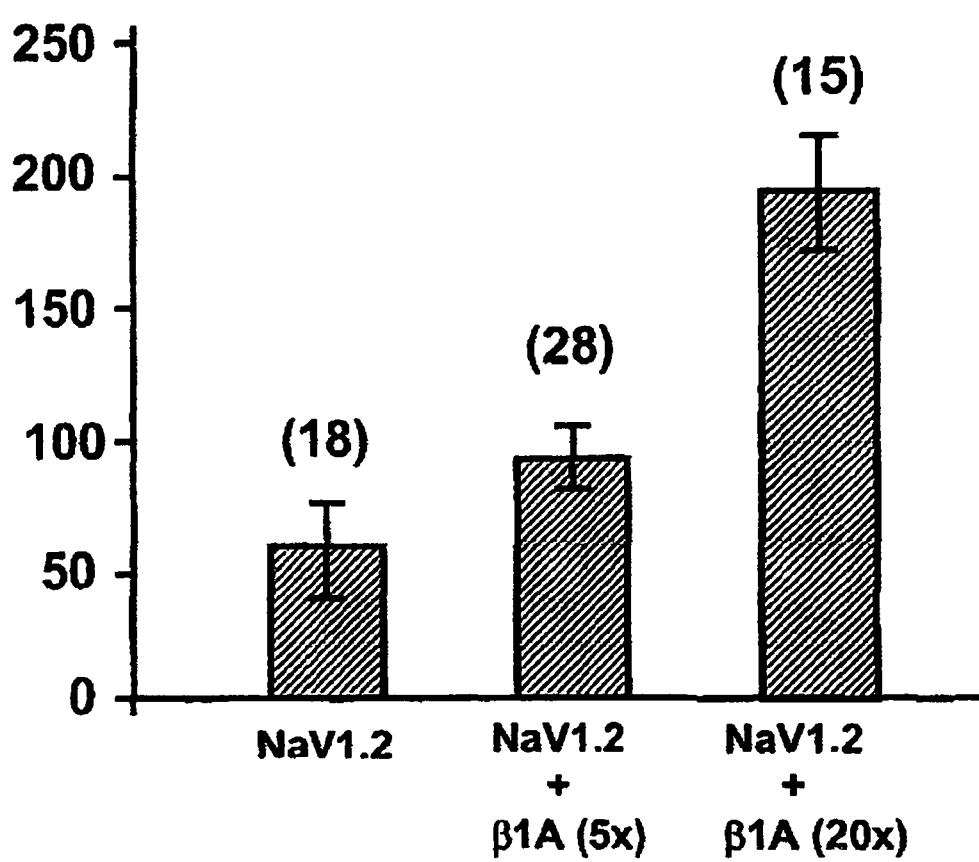
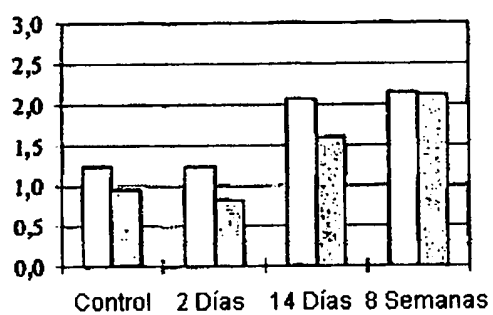
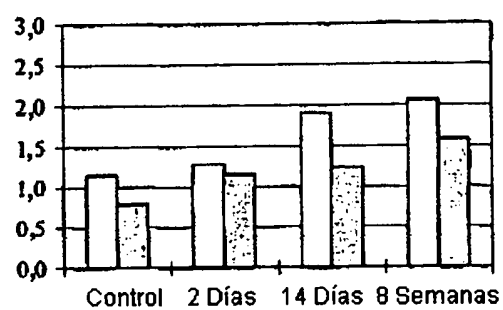


Figura 3

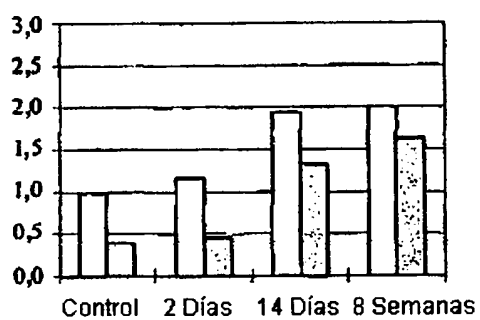
A. DRGs L5, ipsilateral



B. DRGs L5, contralateral



C. DRGs L4, ipsilateral



D. DRGs L4, contralateral

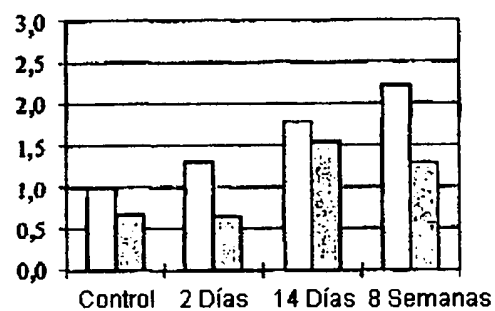


Figura 4

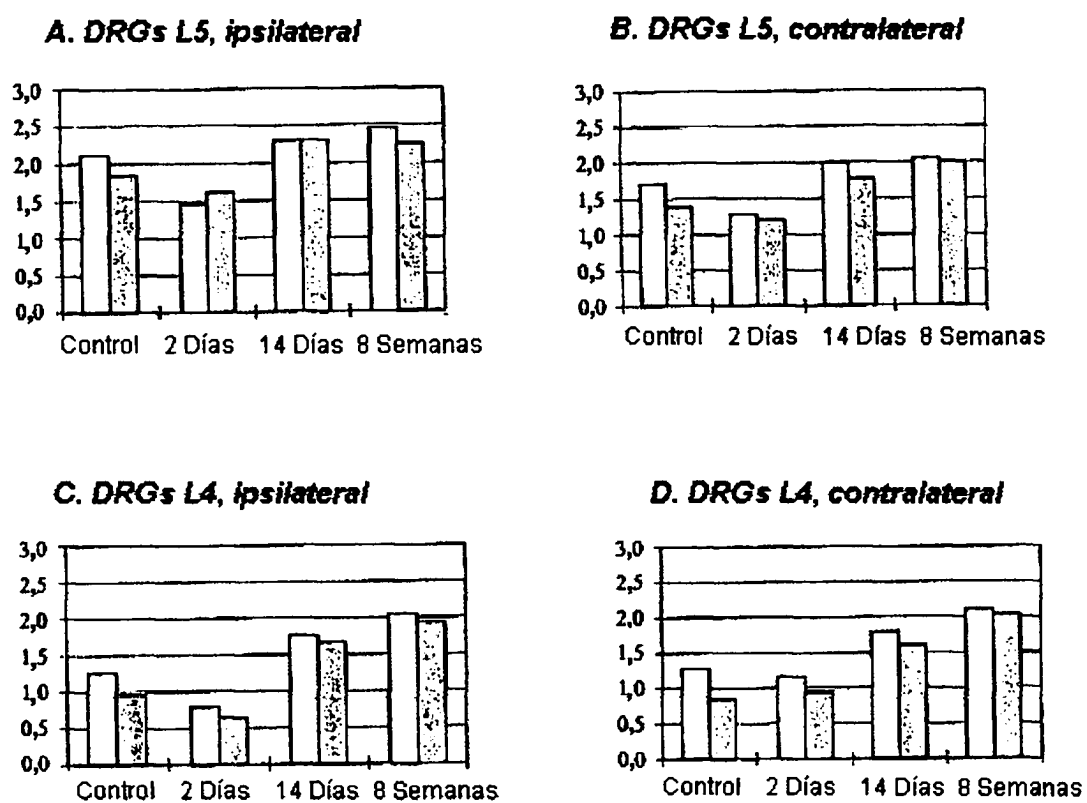


Figura 5

ES 2 290 149 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Ortho McNeil Pharmaceutical, Inc.	
5	<120> DNAs que codifican la subunidad beta-1A de los canales de sodio humanos	
	<130> ORT-1221	
	<140>	
	<141>	
10	<160> 14	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
15	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	
	<400> 1	
25	ccatcctaatacgcactcact atagggc	27
	<210> 2	
	<211> 25	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	
	<400> 2	
40	tggacattcc gccagaaggg cactg	25
	<210> 3	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	
	<400> 3	
55	ctggaggagg atgagcgctt cgag	24
	<210> 4	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	

ES 2 290 149 T3

	<400> 4	
	ctattcggcc acctggacgc c	21
5	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	
15	<400> 5	
	gtgtctgaga tcatgatg	18
20	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	
30	<400> 6	
	gccatgggga ggctgctggc ctagtggtc	30
35	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador oligonucleotídico	
	<400> 7	
45	gtgtgcctgc agctgctcaa	20
	<210> 8	
50	<211> 14	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético	
	<400> 8	
60	Arg Trp Arg Asp Arg Trp Gln Ala Val Asp Arg Thr Gly Cys 1 5 10	
	<210> 9	
65	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 290 149 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

5 <400> 9

Cys Val Pro His Arg Arg Ser Gly Tyr Arg Thr Gln Leu
1 5 10

10 <210> 10

<211> 18

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebadores oligonucleotídicos para el análisis de transferencia Northern

20 <400> 10

tcaaagcatg cctgtcc

18

25 <210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebadores oligonucleotídicos para el análisis de transferencia Northern

35 <400> 11

tcaaaccaca ccccgga

19

40 <210> 12

<211> 807

<212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

	atggggaggc tgctggcctt agtggtcggc gcggcactgg tgtcctcagc ctgcggggggc	60
50	tgcggtggagg tggactcgga gaccgaggcc gtgtatggga tgaccttcaa aattctttgc	120
	atctcctgca agcgccgcag cgagaccaac gctgagacct tcaccgagtg gaccttccgc	180
	cagaagggca ctgaggagtt tgtcaagatc ctgcgctatg agaattgaggt gttgcagctg	240
55	gaggaggatg agcgcttcga gggccgcgtg gtgtggaatg gcagccgggg caccaaagac	300
	ctgcaggatc tgtctatctt catcaccaat gtcacctaca accactcggg cgactacgag	360
	tgccacgtct accgcctgct cttcttcgaa aactacgagc acaacaccag cgtcgtcaag	420
60	aagatccaca ttgaggtagt ggacaaagggt gaggcgggtg ctgcctgccc ctttaccgtc	480
	acccaccgga gagccagatg gagggacaga tggcaggcag tggacaggac aggctggctc	540
	tgtgcctggc cagccaaccg cccacagcag cgggctgagg gggaggggag cagcccctcc	600
65	tgcccactcc agctctggcc tctgtttctc tccagcccac ggagagggtca aggcattgcct	660

ES 2 290 149 T3

gtccccaca gacgctccgg gtacagaacc cagctctgtc acctgtgctg tatgacctct 720
 ggcaggtgcc ttctgtctct gagccaaagg gttgtcctgg gcttgcccgg gataataatc 780
 5 cgatgtgttt ctcggggtgt ggtttga 807

<210> 13

10 <211> 974

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 13

gccatgggga ggctgctggc cttagtggtc ggcgcggcac tgggtgcctc agcctgcggg 60
 20 ggctgctgag aggtggactc ggagaccgag gccgtgtatg ggatgacctt caaaattctt 120
 tgcattctct gcaagcgccg cagcgagacc aacgctgaga ctttcaccga gtggaccttc 180
 cgccagaagg gcaactgagga gtttgtcaag atcctgcgct atgagaatga ggtgttgca 240
 25 ctggaggagg atgagcgctt cgagggccgc gtggtgtgga atggcagccg gggcaccaaa 300
 gacctgcagg atctgtctat cttcatcacc aatgtcacct acaaccactc gggcgactac 360
 gagtgccacg tctaccgctt gctcttcttc gaaaactacg agcacaacac cagcgtcgtc 420
 30 aagaagatcc acattgaggt agtggacaaa ggtgagtcgg gtgctgcctg cccctttacc 480
 gtcaccacc ggagagccag atggagggac agatggcagg cagtggacag gacaggctgg 540
 ctctgtgcct ggccagccaa ccgccacag cagcgggctg agggggaggg gagcagcccc 600
 35 tcctgcccac tccagctctg gcctctgttt ctctccagcc cacggagagg tcaaagcatg 660
 cctgtccccc acagacgctc cgggtacaga acccagctct gtcacctgtg ctgtatgacc 720
 tctggcagggt gccttctgtc tctgagccaa agggttgtcc tgggcttgcc cgggataata 780
 40 atccgatgtg tttctcgggg tgtggtttga gccattcttc catcatgggg ttcatgagga 840
 ttgagcagct gcaggcacac cctggcttcc agcagagcct tgcagggtgg ggcgagggtg 900
 gcggttctta ctgttgagta gctcagccct gctgctctct gtggtgatga ggcaagagag 960
 45 cgtgcctgtg ttgg 974

<210> 14

50 <211> 268

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 14

Met Gly Arg Leu Leu Ala Leu Val Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Ser
 60 1 5 10 15

65

ES 2 290 149 T3

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