



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 229 208**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 15/12**

C12N 15/85

C12N 5/10

C12N 15/62

C12P 21/08

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **93915447 .2**

⑧⑥ Fecha de presentación: **22.06.1993**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0647275**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.1995**

⑤④ Título: **Clonación y expresión del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina.**

③⑩ Prioridad: **23.06.1992 US 904072**
21.06.1993 US 80386

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2005

⑦③ Titular/es: **The Mount Sinai School of Medicine, of
the City University of New York
One Gustave Levy Place
New York, New York 10029-6574, US**

⑦② Inventor/es: **Sealfon, Stuart C.**

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Clonación y expresión del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina.

1. Introducción

La presente invención se refiere a la clonación del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-R) y a células huésped modificadas por ingeniería genética que expresan el GnRH-R. Tales células diseñadas pueden usarse para evaluar y seleccionar fármacos y análogos de la GnRH implicados en la activación, regulación y desacoplamiento del GnRH-R.

2. Antecedentes de la invención

El GnRH-R es un mediador clave en la integración de los sistemas neurológico y endocrino. La reproducción normal depende de la liberación pulsátil de concentraciones fisiológicas de GnRH, que se une a receptores hipofisarios específicos de alta afinidad y desencadena la secreción de las gonadotropinas hormona luteinizante (LH) y hormona estimuladora del folículo (FSH). Mientras que concentraciones fisiológicas de GnRH orquestan la reproducción normal, niveles elevados de agonista conducen a una respuesta opuesta, la supresión de la secreción de gonadotropina. La capacidad de los análogos de la GnRH para activar e inhibir el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal ha conducido a su utilidad clínica amplia en el tratamiento de una variedad de trastornos variables desde infertilidad a carcinoma prostático.

La respuesta y la capacidad del GnRH-R gonadotropo se ven influidas por los agonistas, la concentración y el patrón de exposición (Clayton, 1989, J Endocrinol. 120: 11-19). En estudios tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que la concentración pulsátil baja de la GnRH es trófica para el receptor y que una concentración elevada de agonista induce la regulación por disminución y la desensibilización del receptor. La unión de la GnRH a su receptor estimula la fosfolipasa C y genera inositol-1,4,5-trifosfato y diacilglicerol (Huckle y Conn, 1988, Endocrine Reviews 9: 387-395). Estos segundos mensajeros, a su vez, liberan calcio desde los depósitos intracelulares y activan la proteína quinasa C. La regulación por aumento del receptor parece implicar a la proteína quinasa C y al calcio (Huckle y Conn, 1988, Endocrine Reviews 9: 387-395; Huckle y col., 1988, Journal of Biological Chemistry 263: 3296-3302; Young y col., 1985, Journal of Endocrinology 107: 49-56). No está claro qué efectores subyacen a la regulación por disminución.

Sealfon S., C. y col., Molecular Endocrinology, vol. 4, nº 1, páginas 119-124, 1990, describen la caracterización de un receptor de la hormona liberadora de gonadotropina en ovocitos de *Xenopus* en los que se había inyectado ARN aislado de la hipófisis de rata y de una línea celular de gonadotropina: αT_3 , un procedimiento para el fraccionamiento del ARN total de células αT_3 antes de la inyección en ovocitos de *Xenopus*, la fracción de ARN que, tras la inyección en ovocitos de *Xenopus*, genera la respuesta máxima a la GnRH en los ovocitos y el uso de la línea de células αT_3 como fuente adecuada para la clonación del ADNc del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina y el uso de la expresión en ovocitos de *Xenopus* como bioensayo.

Aunque se han hecho muchos progresos en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la regulación y desensibilización del GnRH-R a través de estudios de unión al receptor, la medición directa de la

transcripción del gen del GnRH-R y su biosíntesis no ha sido posible. La clonación del ADNc del GnRH-R mejoraría la evaluación de la activación regulación y desacoplamiento del GnRH-R. La determinación de la secuencia primaria del receptor facilitaría el diseño dirigido de análogos mejorados. Sin embargo, a pesar del intenso interés, el gen del GnRH-R no se ha clonado ni expresado en ninguna especie.

3. Resumen de la invención

La presente invención se refiere a genes y proteínas del GnRH-R. Las secuencias de ADN descritas en la presente memoria descriptiva pueden introducirse mediante ingeniería genética en sistemas de expresión diseñados para la producción del GnRH-R y/o líneas celulares que expresan el GnRH-R y preferentemente responden a la señal de transducción inducida por la GnRH. Tales líneas celulares pueden usarse de forma ventajosa para seleccionar e identificar agonistas y antagonistas de la GnRH. El ADN de la GnRH, las secuencias de oligonucleótidos antisentido, los productos de expresión de GnRH y los anticuerpos frente a tales productos pueden usarse en el diagnóstico y tratamiento de trastornos reproductivos asociados con la expresión anómala del GnRH-R; por ejemplo, la sobre expresión, la expresión disminuida o la expresión de un receptor mutante disfuncional. Los animales transgénicos que contienen el transgén GnRH-R pueden usarse como modelos animales para la evaluación de análogos de GnRH *in vivo*.

La aclaración de la secuencia del GnRH-R descrito en la presente memoria descriptiva refleja un avance de importancia en la endocrinología reproductiva y revela la naturaleza compleja de la transducción de señal y regulación del GnRH-R. Al contrario de la mayoría de señales hormonales, la GnRH se libera de un modo pulsátil, en la que la frecuencia y la amplitud de los pulsos transportan información crucial (Weiss y col., 1990, Mol. Endocrinol. 4: 557-564; Hasenleder y col., 1991, Endocrinology 128: 509-517). La capacidad de unión al GnRH-R se regula por aumento o por disminución mediante agonistas en función de la duración de la exposición y la concentración (Loumaye y Catt., 1982, Science 215: 983-985). La utilidad clínica de los agonistas del GnRH, que ayuda a controlar diversas enfermedades humanas, incluidas hipertrofia prostática, cáncer de próstata, endometriosis y pubertad precoz, depende de esta inducción de desensibilización hipofisaria. La clonación del GnRH-R conducirá a una mayor comprensión de la interacción compleja de las hormonas hipotalámicas, hipofisarias y gonadales, que subyace a la farmacoterapia y la reproducción.

4. Descripción de las figuras

Figura 1. Interrupción por hibridación del receptor de serotonina (5HT) y expresión del GnRH-R por oligonucleótidos antisentido. Se introdujeron en el baño en las líneas horizontales 5HT 100 nM y GnRH 200 nM. A, respuesta a 5HT y GnRH en ovocitos en los que previamente se había inyectado una mezcla de ARN del cerebro de ratas (para la respuesta a 5HT), ARN de αT_3 (para la respuesta a GnRH) y oligonucleótido antisentido del receptor 5HT_{1C}. Dieciocho células mostraron respuestas idénticas. B, respuesta a GnRH y 5HT en ovocitos en los que previamente se había inyectado una mezcla de ARN de cerebro de rata, ARN de αT_3 y oligonucleótido antisentido WZ7. Veinticuatro células tuvieron respuestas idénticas.

Figura 2. Caracterización del clon WZ25 expre-

sado en ovocitos. A, respuesta electrofisiológica a GnRH de ovocitos en los que se había inyectado el transcrito WZ25 en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de antagonista de GnRH. Los tres trazados que se muestran proceden de células diferentes. Las líneas continuas y discontinuas indican la administración de GnRH y de antagonistas de GnRH, respectivamente. Los ovocitos que no habían recibido la inyección no mostraron respuesta a GnRH (n = 12). B, desplazamiento de 125 I-GnRH-A por GnRH-A y GnRH en membranas de ovocitos en los que se había inyectado el transcrito de WZ25. También se muestra una curva comparativa del desplazamiento usando membranas de células α T3-1 combinadas con membranas de ovocitos en los que no se había inyectado nada (●). Las barras de error muestran el error típico de la media.

Figura 3. Secuencias de nucleótidos (Nº1) y de aminoácidos deducidas (SEC ID Nº2) del clon WZ25. La numeración comienza con la primera metionina del marco de lectura abierto de 981 pares de bases. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos. Las regiones transmembrana I-VII posibles están subrayadas. Los símbolos que aparecen debajo de las secuencias de aminoácidos indican los sitios potenciales de N-glucosilación (▲) y los sitios de fosforilación para la proteína quinasa A (◆), la caseínaquinasa (●) y la proteína quinasa C (*) (Hubbard e Ivatt, 1981, Ann Rev. Biochem. 50: 555-583; Kemp y Pearson, 1990, Trends Biochem. Sci. 15: 342-346; Pearson y Kemp, 1991, Meth. Enzymol. 200: 62-81; Kennelly y Krebs, 1991, J. Biol. Chem. 266: 15555-15558).

Figura 4. Gráfico de la hidrofobicidad del GnRH-R y alineación de la secuencia de aminoácidos de: GnR, receptor de la hormona liberadora de gonadotropina de ratón; ILR, receptor de la interleucina-8 humana (Murphy y Tiffany, 1991, Science 253: 1280-1283); SPR, receptor de la sustancia P de rata (Hershey y Krause, 1990, Science 247: 958-962); β 1R, receptor β 1-adrenérgico Frielle y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4851-4855). I-VII indican regiones transmembrana posibles. Los cuadros indican residuos aminoacídicos idénticos.

Figura 5. Distribución del ARNm del GnRH-R. La autorradiografía de A, ensayo de hibridación en solución con 2 μ g de ARN total hipófisis de ratón, GT-1, GH3 y AtT20 y 625 ng de ARN total de α T3-1, B, análisis por la técnica *Northern* con 3 μ g de ARN poli(A)⁺ α T3-1, y C-F, hibridación *in situ* en la adenohipófisis de rata. C, autorradiografía con rayos X con la sonda antisentido. D, control con sonda sentido (barra de calibración = 450 μ m). E,F, fotomicrografías de campo oscuro (barra de calibración = 50 μ m), de campo claro (barra de calibración = 100 μ m) de sección de adenohipófisis sumergida en emulsión. Los marcadores del peso molecular son ADN X digerido con Hind III.

Figura 6. Expresión del ADNc de GnRH-R humano en ovocitos de *Xenopus*.

Figura 7. Desplazamiento de la unión del agonista de [125 I]GnRH a membrana preparada a partir de células COS-1 sometidas a transfección con la construcción pSV2A-humano GnRHR.

Figura 8. Efectos de la GnRH y del antagonista de GnRH sobre la producción de fosfato de inositol en células COS-1 sometidas a transfección con pSV2A-humano y GnRH-R.

Figura 9. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos posibles del GnRH-R humano.

Figura 10. Análisis mediante la técnica *Northern* con ADNc de GnRH-R: carril 1 (T): ARN poli(A) de testículo humano; carril 2 (P): ARN poli(A) de hipófisis humana; carril 3 (A): ADNc de β -actina humana; carril 4 (R): ADNc del GnRH-R humano.

Figura 11. Esquema del GnRH-R humano.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la clonación y expresión de GnRH-R murino y humano. El GnRH-R, que desempeña un papel central en el sistema reproductor, se caracteriza por siete dominios transmembrana característicos de receptores acoplados a proteína G, pero carece del extremo C intracelular típico. La estructura poco frecuente y el dominio regulador del GnRH-R son responsables de los aspectos únicos de la transducción de señal y de la regulación mediada por el receptor. El GnRH producido en la presente memoria descriptiva puede usarse para evaluar y seleccionar fármacos y análogos de la GnRH implicados en la activación, regulación y desacoplamiento del receptor. Como alternativa, el ADN del GnRH-E, los oligonucleótidos y/o las secuencias antisentido o el GnRH-R, fragmentos peptídicos del mismo, o anticuerpos frente a él pueden usarse en el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos de la reproducción.

Para mayor claridad del análisis, la invención se describe en las siguientes subsecciones a modo de ejemplo para el GnRH-R murino y humano. Sin embargo, los principios se pueden aplicar de forma análoga a los clones y expresar el GnRH-R de otras especies, y clonar y expresar otros receptores pertenecientes a la familia única de GnRH, es decir, tipos de receptores de proteína G que carecen del extremo C intracelular y se unen a la GnRH o a análogos de la misma.

5.1. Secuencia codificadora del GnRH-R

La secuencia nucleotídica codificadora (SEC ID Nº 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID Nº 2) para el GnRH-R murino se representan en la figura 3. El marco de lectura abierto más largo codifica una proteína de 327 aminoácidos de un PM de aproximadamente 37.000. Se encuentran presente tres sitios consenso de glucosilación unidos a N, dos en el extremo N y uno en el primer bucle extracelular (Fig. 3). El análisis de hidrofobicidad de la proteína deducida revela siete tramos de aminoácidos altamente hidrófobos con un 20-30% de similitud de secuencia con otros receptores de proteína G, con el grado de homología más elevado con el receptor de la interleucina 8 (Fig. 4).

El GnRH-R es casi el miembro más pequeño de a superfamilia de receptores de proteína G, el primer bucle citoplásmico del GnRH-R es más largo que cualquier otro receptor de proteína G y, al contrario que los otros receptores de proteína G, carece de un extremo C citoplásmico polar. Aunque en el GnRH-R hay residuos altamente conservados, tales como las cisteínas de cada uno de los dos primeros bucles extracelulares que estabilizan muchos receptores, varias características del GnRH-R son poco habituales. Por ejemplo, el dominio transmembrana II de aspartato/glutamato altamente conservado, que se sabe que es esencial para la función de muchos receptores de proteína G, está sustituido con asparagina. Otra desviación de otros receptores de proteína G es

la sustitución de una serina con la tirosina conservada adyacente al dominio transmembrana III. Esto crea un sitio de fosforilación potencial, único del GnRH-R, en un dominio crucial para la transducción de señal de otros receptores de proteína G. También se encuentran presentes otros posibles sitios de regulación de la fosforilación (véase la Fig. 3).

La invención también se refiere a genes del GnRH-R aislados de seres humanos. El receptor de GnRH humano se clonó mediante el uso de una sonda con una biblioteca de ADNc de λ gt10 de hipófisis humana con el inserto del receptor de GnRH de ratón que se había marcado con ^{32}P mediante cebado hexamérico aleatorio. Para confirmar que el clon aislado codificaba un GnRH-R humano funcional se inyectaron transcritos de ARN sintético en ovocitos. Todos los ovocitos en los que se inyectó el ARN desarrollaron grandes corrientes de despolarización tras la exposición a GnRH, lo que indica que el fragmento de ADN clonado codificaba un receptor funcional.

La secuencia nucleotídica codificadora (SEC ID N°3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N° 4) para el GnRH-R humano se representan en la figura 9. La secuenciación del clon humano identificó un inserto de 2160 pb que contenía un marco de lectura abierto de 984 pb. El marco de lectura abierto codifica una proteína de 328 aminoácidos con un 90% de identidad con la secuencia predicha del receptor de ratón.

Mediante análisis de hidrofobicidad se identificaron los siete dominios hidrófobos característicos de los receptores acoplados a proteína G. Como se encontró para la estructura predicha del receptor de ratón, el GnRH-R humano carece esencialmente de cualquier dominio intracelular C-terminal. Hay dos potenciales sitios de glucosilación ligada a N, uno en cada uno de los primeros dominios extracelulares. En los dominios intracelulares se encuentran varios residuos citoplásmicos de serina y treonina, que pueden servir como sitios de regulación de la fosforilación (Fig. 11).

Mediante análisis por la técnica *Northern*, con GnRH-R humano marcado radiativamente como sonda, se identificó un transcrito de aproximadamente 4,7 kb en el ARN poli(A) de hipófisis humana (FIG: 10). No se detectó señal alguna en el ARN poli(A) purificado de testículos humanos o con un ADNc control de β -actina humana.

Para determinar la extensión de los dominios sin traducir 5' y 3' del ARN se realizaron análisis de PCR de los aislados de fagos de la detección selectiva en la biblioteca principal. Se usó un cebador oligonucleotídico antisentido que representaba la secuencia cerca del extremo 5' del inserto de ADN c del GnRH-R o un cebador sentido cerca del extremo 3' de la misma secuencia, junto con cebadores diseñados contra el sitio de clonación GT1 adyacente para establecer el mapa de los clones no purificados. Los productos más largos identificados en la PCR tenían ~ 1,3 kb de secuencia 5' adicional y ~ 0,3 kb de secuencia 3' adicional. Estos datos sugieren que el ARNm del GnRH-R contiene al menos 1,3 kb de secuencia 5' sin traducir y 1,5 kb de secuencia 3' sin traducir. En función de los datos obtenidos con el análisis por la técnica *Northern* se sugiere que la secuencia sin traducir adicional (< 1 kb) no está contenida en ninguno de los clones aislados.

Los miembros de la familia de GnRH-R se definen

en la presente memoria descriptiva como los receptores que se unen a la GnRH. Tales receptores pueden demostrar aproximadamente un 80% de homología a nivel nucleotídico, e incluso una homología del 90% en el ámbito de aminoácidos es tramos sustanciales de secuencias localizadas en regiones fuera de los dominios transmembrana.

La clonación de otros receptores en la familia de los GnRH-R puede llevarse a cabo de varias formas diferentes. Por ejemplo, la secuencia murina y humana se puede usar para diseñar sondas oligonucleotídicas degeneradas o completamente degeneradas que se pueden usar como sondas de PCR o para realizar detecciones selectivas en bibliotecas de ADNc derivadas de las células adecuadas que expresan el GnRH-R, o genotecas (bibliotecas genómicas). El extremo N y los bucles citoplásmicos (tanto intracelulares como extracelulares) de las secuencias murinas y humanas representadas en la Figura 3 y la figura 11, respectivamente, pueden usarse de forma ventajosa para diseñar sondas oligonucleotídicas, ya que estas regiones deberían estar relativamente conservadas en la familia de los GnRH-R.

Como alternativa se puede realizar la detección selectiva en una biblioteca de ADNc de bacteriófagos, en condiciones de rigurosidad reducida, con un fragmento marcado de forma radiactiva del clon de GnRH-R murino o humano para aislar las proteínas relacionadas con el GnRH-R. Como revisión de las estrategias de clonación que se pueden usar véase, por ejemplo, Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press, N.Y. y Ausubel y col., 1989, *Current Protocols in molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un GnRH-T, fragmentos, proteínas de fusión o equivalentes funcionales de los mismos, se pueden usar para generar moléculas de ADN recombinante que dirigen la expresión del GnRH-R, o de un péptido, proteína de fusión o equivalente funcional de los mismos funcionalmente activos, en las células huésped adecuadas. Como alternativa, las secuencias de nucleótidos que hibridan con porciones de la secuencia del GnRH-R también pueden usarse en los ensayos de hibridación de ácido nucleico, análisis Southern y técnica *Northern*, etc.

Debido a la degeneración del código genético, en la práctica de la presente invención se pueden usar otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la secuencia de aminoácidos del GnRH-R, por ejemplo la secuencia murina (SEC ID N° 2) representada en la Figura 3 o la secuencia humana o un equivalente funcional, para la clonación y expresión del GnRH-R. Tales secuencias de ADN incluyen aquellas que son capaces de hibridar con la secuencia del GnRH-R murino y humano en condiciones estrictas, o que serían capaces de hibridar en condiciones estrictas pero por la degeneración del código genético. Las condiciones estrictas se pueden ajustar de varios modos. Por ejemplo, cuando se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede ajustar la temperatura a la que tiene lugar la hibridación de los cebadores con el molde o la concentración del MgCl_2 en el tampón de reacción. Cuando se usan fragmentos de ADN u oligonucleótidos marcados de forma radiactiva para poner en contacto los filtros con sondas la rigurosidad se puede ajustar mediante cambios en

la fuerza iónica de las soluciones de lavado o con el control cuidadoso de la temperatura a la que se llevan a cabo los lavados del filtro.

Entre las secuencias de ADN alteradas que se pueden usar se incluyen delecciones, adiciones o sustituciones de distintos residuos nucleotídicos que dan como resultado una secuencia que codifica el mismo o un producto génico funcionalmente equivalente. El propio producto génico puede contener delecciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos en la secuencia del GnRH-R, que tiene como resultado un cambio silente que, por tanto, produce un GnRH-R funcionalmente equivalente. Tales sustituciones de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, entre los aminoácidos con carga negativa se incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva se incluyen lisina y arginina; entre los aminoácidos con cabezas polares sin carga que tienen valores similares de hidrofilia se incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, anilina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, tirosina. Como se usa en la presente memoria descriptiva, un GnRH-R funcionalmente equivalente se refiere a un receptor que se une a la GnRH, aunque no necesariamente con la misma afinidad de unión que su GnRH-R homólogo nativo.

Las secuencias de ADN de la invención pueden someterse a técnicas de ingeniería genética para alterar la secuencia codificadora del GnRH-R para una variedad de fines, incluidas, pero no limitadas a ellas, alteraciones que modifican el procesamiento y la expresión del producto génico. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones mediante técnicas bien conocidas en la materia, por ejemplo, mutagénesis dirigida, para insertar nuevos sitios de restricción, para alterar los patrones de glucosilación, fosforilación, etc. Por ejemplo, en ciertos sistemas de expresión tales como levaduras, las células huésped pueden glucosilar en exceso el producto génico. Cuando se usan tales sistemas de expresión puede ser preferible alterar las secuencias codificadoras del GnRH-R para eliminar los sitios de glucosilación ligada a N; por ejemplo, en la secuencia murina esto se puede llevar a cabo mediante la alteración de uno o más sitios de glucosilación indicados en la figura 3. En otra forma de realización de la invención, el GnRH-R o una secuencia del GnRH-R modificada puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. La proteína de fusión puede someterse a ingeniería genética para que contenga un sitio de escisión localizado entre la secuencia de GnRH-R y la secuencia proteica heteróloga, de forma que el GnRH-R se pueda escindir del resto heterólogo.

La secuencia codificadora del GnRH-R podría sintetizarse, toda o parte, con procedimientos químicos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Caruthers y col., 1980, Nuc. Acids. Res. Symp. Ser. 7: 215-233; Cres y Hornm, 180, Nuc. Acids. Res. 9 (10):2331; Matteucci y Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters, 21: 719; y Chow y Kempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9 (12): 2807-2817. Como alternativa, la propia proteína podría producirse mediante procedimientos químicos para sintetizar todo o parte de la secuencia aminoacídica del GnRH-R. Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante técnicas de fase sólida,

escindir d la resina y purificarse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. (Por ejemplo, véase Creighton, 1983, Proteins Structures And Molecular Principles, W. H. Freeman y Co., N. Y., páginas 50-60). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de los aminoácidos (por ejemplo, con el procedimiento de degradación de Edman; véase Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles. W. H. Freeman y Co., N. Y., páginas 34-49).

5.2. Expresión del GnRH-R

Con el fin de expresar un GnRH-R biológicamente activo, la secuencia de nucleótidos que codifica el GnRH-R, o un equivalente funcional como se ha descrito antes en la Sección 5.1, se inserta en un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificadora insertada. Los productos génicos GnRH-R, así como las células huésped o las líneas celulares sometidas a transfección o a transformación con vectores de expresión del GnRH-R recombinante se pueden usar para una variedad de propósitos. Estos incluyen, aunque no se limita a ellos, la generación de anticuerpos (es decir, monoclonales o policlonales) que se unan al receptor, incluidos los que inhiben de forma competitiva la unión a la GnRH y "neutralizan" la actividad de la GnRH; la detección y selección de análogos de la GnRH o fármacos que actúan a través del GnRH-R, etc.

5.2.1. Sistemas de expresión

Para construir los vectores de expresión que contengan la secuencia codificadora del GnRH-R y señales adecuadas del control de la transcripción/traducción se pueden usar procedimientos bien conocidos para el experto en la técnica. Entre estos procedimientos se incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética/recombinación *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. y Ausubel y col., 1989, Current Protocols in molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N. Y.

Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión en huéspedes para expresar la secuencia codificadora del GnRH-R. Entre estos se incluyen, pero no se limita a ellos, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófagos, de ADN plasmídico o de ADN de cósmido que contienen la secuencia codificadora del GnRH-R; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia codificadora del GnRH-R; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia codificadora del GnRH-R; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, VMC; virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia codificadora del GnRH-R, o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, adenovirus, virus de la vacuna), incluidas las líneas celulares sometidas a ingeniería genética para que contengan múltiples copias del ADN

del GnRH-R, bien amplificado de forma estable (por ejemplo, CHO/dhfr) o amplificadas de forma inestable en minicromosomas (por ejemplo, líneas celulares murinas).

Los elementos de expresión de estos sistemas varían en sus resistencias y especificidades. En función del sistema de vectores/huésped utilizado, en el vector de expresión se puede usar cualquiera de una serie de elementos de la transcripción y de la traducción adecuados, incluidos promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tales como el pL del bacteriófago γ , plac, ptrp, pteo (promotor híbrido ptrp-lao) y similares; cuando se clona en sistemas de células de insectos, se pueden usar promotores tales como el promotor de polihedrina del baculovirus; cuando se clona en sistemas de células vegetales, se pueden usar promotores derivados del genoma de las células vegetales (por ejemplo, promotores del choque térmico; el promotor de la subunidad pequeña de la RUBISCO; el promotor de la proteína de unión a/b a la clorofila) o de virus vegetales (por ejemplo, el promotor del ARN 35 s del CaMV, el promotor de la proteína de la cubierta del TMV); cuando se clona en sistemas de células de mamífero, se pueden usar promotores derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus de la vacuna); cuando se generan líneas celulares con múltiples copias del ADN del GnRH-R, se pueden usar vectores basados en los SV40, BPV y EBV con un marcador seleccionable adecuado.

En los sistemas bacterianos se puede seleccionar de forma ventajosa una serie de vectores de expresión según el uso que se pretende hacer del GnRH-R expresado. Por ejemplo, cuando se quieren producir cantidades grandes de GnRH-R para la generación de anticuerpos, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de productos proteicos de fusión que se purifican con facilidad. Entre tales vectores se incluyen, pero no se limita a ellos, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Rutner y col., 1983, EMBO J., 2: 1791), en el que la secuencia codificadora de GnRH-R puede estar ligada en el vector en el marco con la región codificadora lac Z de modo que se produzca una proteína híbrida AS-kacZ; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509) y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con la glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad de las células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa, seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para que incluyan sitios de escisión por la proteasa del factor Xa o de la trombina, de forma que el polipéptido clonado de interés se pueda liberar desde el resto GST.

En levaduras, se puede usar una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Como revisión, véase Current Protocols in Molecular Biology, vol. 2, 1988, Ed. Ausubel y col., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Cap. 13; Grant y col., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast. En Methods in Ezymology, Eds. WU

y Grossman, 1987, Acad. Press., N. Y., vol. 153, páginas 516-644; Glover, 1988, DNAA cloning, vol. II, IRL Press Wash. D.C., Cap. 3 y Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Ezymology, Eds. Berger y Kimmel, Acad. Press., N. Y., vol. 152, páginas 673-684 y The Molecular Biology of The Yeast Saccharomyces, 1982, Eds. Strathern y col., Cold Spring Harbor Press., Vol. I y II.

En los casos en los que se usan vectores de expresión en plantas, la expresión de la secuencia codificadora del GnRH-R puede impulsarse por cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, se pueden usar promotores virales tales como los promotores del ARN 35S y del ARN 19S del CaMV (Brisson y col., 1984, Nature 310: 511-514) o el promotor de la proteína de la cubierta del TMV (Takamatsu y col., 1987, EMBO J. 6: 307-311); como alternativa, se pueden usar promotores vegetales tales como el promotor de la subunidad pequeña de la RUBISCO (Coruzzi y col., 1984, EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie y col., 1984, Science 224: 838-843) o del choque térmico, por ejemplo, hsp 17.5-E o hsp 17.3-B de soja (Gurley y col., 1986, Mol. Cel. Biol. 8: 559-565). Estas construcciones se pueden introducir en las células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos RI, vectores de virus vegetales, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación, etc. Como revisión de tales técnicas, véase, por ejemplo, Welssbach y Weissbach, 1988, Methods for Plan Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, páginas 421-483 y Grierson y Corey, 1988, Plant Molecular Biology, 2ª ed., Blackie, Londres, Cap. 7-9.

Un sistema de expresión alternativo que podría usarse para expresar GnRH-R es un sistema en insectos. En uno de tales sistemas, el virus de la polihidrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el GnRH-R puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo en el gen de polihedrina) del virus y situarse bajo el control de un promotor de AcPNV (por ejemplo, el promotor de polihedrina). La inserción satisfactoria de la secuencia codificadora de GnRH-R tendrá como resultado la inactivación del gen de la polihedrina y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carece de la cubierta proteinácea codificada por el gen de la polihedrina). A continuación, estos virus recombinantes se usan para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado. (Por ejemplo, véase Smith y col., 1983, J. Virol. 46: 584; Smith, patente de EE.UU. n° 4.215.051).

En células huésped de mamíferos se puede utilizar una serie de sistemas de expresión con base viral. En los casos en los que se usa adenovirus como vector de expresión, la secuencia que codifica el GnRH-R se puede ligar a un complejo de control de transcripción/traducción, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen químico se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará lugar a un virus recombinante viable y capaz de expresar GnRH-R en huéspedes infectados. (Por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 3655-3659). Como alternativa, se puede usar el promotor 7,5K del virus de la vacuna. (Por ejemplo, véase Mac-

kett y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415-7419; Mackett y col., 1984, J. Virol. 49: 857-864; Panicali y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4927-4931).

Para una traducción eficaz de secuencias codificadoras de GnRH-R insertadas también se pueden requerir señales de iniciación específicas. Entre estas señales se incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en los que la totalidad del gen de GnRH-R, incluido su propio codón de iniciación y las secuencias adyacentes, se inserta en el vector de expresión adecuado, puede que no sean necesarias señales adicionales de control de la traducción. Sin embargo, en los casos en los que se inserta sólo una porción de la secuencia codificadora del GnRH-R, deberán proporcionarse señales exógenas de control de la traducción, incluido el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificadora de GnRH-R para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales exógenas de control de la traducción y los codones de iniciación pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede intensificarse mediante la inclusión de los adecuados elementos intensificadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. véase, Bitter y col., 1987, Methods in Enzymol, 153: 516-544).

Además, puede seleccionarse una cepa de células huésped que modifica la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico del modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped poseen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de las proteínas. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas de huésped adecuados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, las células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, se pueden usar glucosilación y fosforilación del producto génico. Entre tales células huésped de mamífero se incluyen, aunque no se limita a ellas, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, W138, etc.

Para la producción a largo plazo y con rendimiento elevado de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden someter a ingeniería genética las líneas celulares que expresan de forma estable el GnRH-R. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con el ADN del GnRH-R controlado por elementos adecuados de control de la expresión (por ejemplo, promotor, intensificador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción de ADN extraño, puede dejarse crecer las células sometidas a ingeniería genética durante 1-2 días en medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren de forma estable en los cromosomas del plásmido y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en las líneas

celulares. Este procedimiento puede usarse de forma ventajosa para someter a ingeniería genética las líneas celulares que expresan el GnRH-R en la superficie celular y que responden a la señal de transducción mediada por GnRH. Tales líneas celulares producidas por ingeniería genética son particularmente útiles en la detección selectiva de análogos de la GnRH.

Se puede usar una serie de sistemas de selección, incluidos, aunque no limitados a ellos, la timidínquinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., 1977, Cell, 11:223), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., 1980, Cell 22: 817), los genes se pueden emplear en células tk^- , $hprt^-$ o $aprt^-$, respectivamente. Asimismo, se puede usar resistencias a antimetabolitos como base de selección de los genes $dhfr$, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare y col., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt , que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo , que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin y col., 1981, J. Mol. Biol., 150:1) e $hgro$, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., 1984, Gene 30: 147). Recientemente se han descrito más genes seleccionables, a saber, $trpB$, que permite que las células usen indol en lugar de triptófano; $hisD$, que permite que las células usen histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047) y ODC (ornitina descarboxilasa), que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue L., 1987, En: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.)

En una forma de realización específica, descrita en la presente memoria descriptiva, el ADNc de GnRH-R humano se subclonó en un vector de expresión, pSV2A, que contienen el promotor temprano SV40. Células COS-1 se sometieron a transfección con la construcción pSV2A-GnRH-R humano usando el procedimiento DEAE-dextrano de transfección (Keown, W. A., y col., 1990, en Methods of Enzymology, V1, 185 (Goeddel, D. V., ed.), páginas 527-537 Academic Press, Nueva York). En los experimentos realizados con membranas de células COS-1 sometidas a transfección se indicó que el receptor expresado de forma heteróloga era capaz de unirse a la GnRH. También se encontró que la unión del ligando estaba acoplada al metabolismo del fosfato de inositol, lo que indica que las células COS-1 sometidas a transfección expresaban un GnRH-R humano funcional.

5.2.2. Identificación de transfectantes y transformantes que expresan GnRH-R

Las células huésped que contienen la secuencia codificadora y que expresan el producto génico biológicamente activo pueden identificarse mediante al menos cuatro abordajes generales: (a) hibridación ADN-ADN o ADN-ARN; (b) presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras"; (c) valorar el nivel de transcripción medido por la expresión de los transcritos de ARNm del GnRH-R en la célula huésped; y (d) detección del producto génico medido mediante inmunoensayo o mediante su actividad biológica.

En el primer abordaje, la presencia de la secuencia codificadora de GnRH-R insertada en el vector de ex-

presión se puede detectar mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN usando sondas que comprenden secuencias de nucleótidos homólogas a la secuencia codificadora del GnRH-R, respectivamente, o sus porciones o derivados.

En el segundo abordaje, el sistema huésped/vector de expresión recombinante se puede identificar y seleccionar en función de la presencia o la ausencia de ciertas funciones génicas "marcadoras" (por ejemplo, actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificadora de GnRH-R se inserta dentro de una secuencia génica marcadora del vector, los recombinantes que contienen la secuencia codificadora de GnRH-R se puede identificar por la ausencia de la función génica marcador. Como alternativa, se puede colocar un gen marcador en tándem con la secuencia de GnRH-R bajo el control del mismo promotor o de otro distinto usado para controlar la expresión de la secuencia codificadora de GnRH-R. La expresión del marcador como respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificadora de GnRH-R.

En el tercer abordaje, la actividad transcripcional de la región codificadora de GnRH-R se puede valorar mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, el ARN se puede aislar y analizar mediante técnica *Northern* con una sonda homóloga a la secuencia codificadora de GnRH-R o a porciones concretas del mismo. Como alternativa, se puede extraer el total de ácidos nucleicos y analizar mediante hibridación a tales sondas.

En el cuarto abordaje, la expresión del producto génico GnRH-R se puede valorar inmunológicamente, por ejemplo mediante análisis por inmunotransferencia, inmunoensayos tales como radioinmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas y similares. Sin embargo, la última prueba del éxito del sistema de expresión implica la detección del producto génico GnRH-R biológicamente activo. Se puede usar una serie de ensayos para detectar la actividad del receptor, incluidos, pero no limitados a ellos, ensayos de unión a GnRH y ensayos biológicos de GnRH con líneas celulares producidas mediante ingeniería genética como sustrato de la prueba.

En una forma de realización específica descrita en la presente memoria descriptiva se prepararon membranas celulares de células COS-1 sometidas a transfección con un vector de expresión recombinante que contenía el ADNc del GnRH-R humano. La expresión del GnRH-R humano se detectó usando un análogo a la GnRH marcado con ¹²⁵I. Además, la expresión de GnRH-R biológicamente activo se podría detectar en células sometidas a transfección mediante la medición de los niveles de producción de fosfato de inositol (IP) estimulados por GnRH, como se describe en la sección 7.15.

5.2.3. Recuperación del GnRH-R

Una vez que se ha identificado un clon que produce niveles elevados de GnRH-R biológicamente activo, el clon se puede expandir y usar para producir cantidades grandes del receptor, que puede purificarse con técnicas bien conocidas en la materia, incluidas, pero no limitadas a ellas, purificación por inmunoafinidad, procedimientos cromatográficos en los que se incluye la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de afinidad con ligando inmoviliza-

do tal como GnRH o análogos de la misma unida a perlas, purificación por inmunoafinidad con anticuerpos y similares.

Cuando la secuencia codificadora del GnRH-R se somete a ingeniería genética para que codifique una proteína de fusión escindible, la purificación se puede llevar a cabo con facilidad usando técnicas de purificación por afinidad. Por ejemplo, una secuencia consenso de reconocimiento de la escisión de colagenasa se puede introducir mediante ingeniería genética entre el extremo carboxi del GnRH-R y la proteína A. La proteína de fusión resultante se puede purificar con facilidad mediante una columna de IgG que se une al resto de proteína A. El GnRH-R sin condensar se puede liberar fácilmente de la columna mediante tratamiento con colagenasa. Otro ejemplo sería el uso de vectores pGEX que expresan polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). La proteína de fusión se puede someter a técnicas de ingeniería genética con sitios de escisión de trombina o del factor Xa entre el gen clonado y el resto GST. La proteína de fusión puede purificarse con facilidad a partir de extractos celulares mediante adsorción a perlas de glutatión agarosa, seguido por elución en presencia de glutatión. En este aspecto de la invención, cualquier sitio de escisión o sustrato enzimático de escisión se pueden introducir mediante ingeniería genética entre la secuencia de GnRH-R y un segundo péptido o proteína que tenga un par de unión que podría usarse para la purificación, por ejemplo, cualquier antígeno para el que se pueda preparar una columna de inmunoafinidad.

5.3. Generación de anticuerpos que definen el GnRH-R

Para la producción de anticuerpos frente a epítopos del GnRH-R producido de forma recombinante se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que compiten por el sitio de unión a la GnRH del receptor se prefieren especialmente para usos diagnósticos. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limita a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab.

Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar varios animales huésped mediante inyección con el GnRH-R, incluidos, pero no limitados a ellos, conejos, ratones, ratas, etc. Se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria, depende de las especies huésped, incluidos pero no limitados a ellos, adyuvante de Freund (completos e incompletos), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales frente a GnRH-R se pueden preparar mediante el uso de cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante cultivos continuos de líneas celulares. Entre estas se incluyen, pero no se limita a ellas, la técnica del hibridoma descrita en un principio por Kohler y Millstein (Nature, 1975, 256: 495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor y col., 1983, Immunology Today, 4: 72; Cols y col.,

1983, Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 2026-2030) y la técnica del hibridoma -EBV (Cols y col., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos híbridos” (Morrison y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855; Neuberger y col., 1984, Nature, 312: 604-608; Takeda y col., 1985, Nature, 314: 452-454) mediante el corte de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de la adecuada especificidad antigénica junto con los genes de una molécula de anticuerpo humano de la adecuada actividad biológica. Como alternativa, se pueden adaptar las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de los EE.UU. 4.946.778, para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos del GnRH-R.

Los fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica de GnRH-R se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, entre tales fragmentos se incluyen, pero no se limita a ellos, fragmentos $F(ab')_2$ que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab que se pueden generar mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa se pueden construir genotecas de expresión de Fab (Huse y col., 1989, Science, 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada a GnRH-R.

5.4 Usos de GnRH-R, ADN y líneas celulares producidas por ingeniería genética

El ADN del GnRH-R, los oligonucleótidos antisentido, los productos de la expresión de GnRH-R, los anticuerpos y las líneas celulares producidas por ingeniería genética descritos antes tienen una serie de usos para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos de la reproducción y en el diseño y descubrimiento de fármacos.

Por ejemplo, la secuencia de ADN del GnRH-R puede usarse en los ensayos de hibridación de biopsias para el diagnóstico de anomalías de la expresión de GnRH-R; por ejemplo, análisis *Southern* o *Northern*, incluidos ensayos de hibridación *in vitro*. En aplicaciones terapéuticas, las moléculas antisentido o de ribozima diseñadas sobre la base de la secuencia de ADN del GnRH-R puede usarse para bloquear el transporte y la expresión del producto génico GnRH-R. A este respecto, se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo entre las regiones -10 y +10 de la secuencia nucleotídica del GnRH-R. Como alternativa, se podría usar el ADN del GnRH-R en el enfoque de terapia génica para introducir el gen recombinante normal en las células defectivas de un individuo o para corregir una mutación endógena con el fin de reconstituir el GnRH-R y su función.

Se pueden usar anticuerpos específicos para GnRH-R para determinar el patrón de expresión del receptor en tejido de biopsia o para técnicas de imagen diagnósticas *in vivo*; en tales aplicaciones se pueden preferir los anticuerpos “neutralizantes”. Por ejemplo, se podría administrar a un paciente un anticuerpo conjugado con un compuesto de imagen para “realizar el mapa” de las localizaciones y la distribución del GnRH-R *in vivo*.

El propio GnRH-R, o un fragmento con el sitio de unión a GnRH. Podría administrarse *in vivo*. El

GnRH-R libre o el fragmento peptídico podrían unirse de forma competitiva a la GnRH e inhibir su interacción con el receptor nativo *in vivo*.

La estimulación de una respuesta de anticuerpos, específica para el GnRH-R, puede usarse como medio anticonceptivo. Por ejemplo, se pueden inmunizar varios animales huésped mediante inyección con GnRH-R o proteína de fusión de GnRH-R, lo que conduce a la estimulación de su sistema inmunitario y la producción de anticuerpos antiGnRH-R circulantes.

Las líneas celulares producidas por ingeniería genética que expresan el GnRH-R y responden a la transducción de señal pueden utilizarse para detectar e identificar análogos de GnRH biológicamente activos, es decir, agonistas o antagonistas. Se pueden producir mediante ingeniería genética animales transgénicos que contengan el ADN de GnRH-R como transgén para comprobar los efectos de tales agonistas o antagonistas *in vivo*.

Recientemente, se han desarrollado modelos generados por ordenador de las interacciones ligando-receptor y en una forma de realización preferida de la invención, la información derivada de los modelos por ordenador de GnRH-R pueden usarse para diseñar agonistas o antagonistas del receptor. Se han publicado alrededor de 74 secuencias distintas de GPR (receptores acoplados a proteína G) y las alineaciones de la secuencia con secuencias de GnRH-R puede facilitar la comprensión del papel de ciertas secuencias proteicas en la determinación de la unión al ligando y la regulación. Los cambios realizados en las secuencias de GnRH-R, usando, por ejemplo, técnicas para mutagénesis dirigida a sitio, y la expresión de receptores mutantes en líneas celulares se pueden usar para definir el papel funcional de determinadas regiones y residuos del receptor.

6. Ejemplo

Clonación de un GnRH-R murino funcional

En las subsecciones siguientes se describe la clonación de un ADN complementario que representa el GnRH-R de ratón y confirma su identidad mediante el uso de expresión en ovocitos de *Xenopus*. La inyección de transcrito de ARN sentido conduce a la expresión de un GnRH-R funcional de alta afinidad. Sin embargo, la expresión de GnRH-R usando ARN de línea celular gonadotropa se bloquea con un oligonucleótido antisentido. La hibridación *in situ* en adenohipófisis de rata revela una distribución característica del GnRH-R. La secuencia de nucleótidos codifica una proteína de 327 aminoácidos que tiene los siete dominios transmembrana posibles característicos de los receptores acoplados a proteína G, pero que carece de un extremo C intracelular típico. La estructura poco habitual y el nuevo potencial dominio regulador del GnRH-R pueden explicar aspectos únicos de su transducción y regulación de señal.

6.1 Materiales y procedimientos

Los fármacos se obtuvieron de las siguientes fuentes: el antagonista de GnRH [D-Phe^{2,6}, Pro³]-GnRH (Bachern, Torrance, CA), buserelina (D-Ser(But)⁶, Pro⁹-N-etilamida GnRH) Hoechst-Roussel Pharmaceuticals (Somerville, NJ). Los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El cuidado de los animales seguía las normas dictadas en la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

6.1.1. Microinyección y registro en ovocitos

Hembras adultas de *Xenopus laevis* (Nasco, Ft. Atkinson, WI) se mantuvieron a 18-20°C y en un ciclo de día/noche de 15h/9h. Los ovocitos se prepararon para la inyección y las respuestas se registraron como se ha descrito antes (Sealfon y col., 1990, Mol. Endocrinol. 4: 119-124). Las células se colocaron en 0,5 ml de baño y pinzamiento de voltaje a -70 mV mediante la técnica estándar de dos electrodos (Dascal, 1987, CRC Crit. Rev. Biochem. 417: 47-61). Se diluyeron ligandos peptídicos en el tampón de perfusión y se introdujeron en el baño. La corriente pinzada se registró usando un registrador de gráficos. Los potenciales inversos se determinaron mediante desnivel continuo de -70 a +10 mV en 2 segundos con y sin agonista mediante un sistema AT de PC IBM usando la interfase TL-1 el software pCLAMP de Axon Instruments (Burlingame, CA).

6.1.2. Clonación por PCR y detección selectiva por interrupción por hibridación

La preparación del ARN y la síntesis del ADNc se llevaron a cabo como se ha descrito antes (Sealfon y col., 1990, Mol. Endocrinol 4: 119-124; Snyder y col., 1991, Neurosci Lett 122: 37-40). Los subclones para la detección selectiva por interrupción por hibridación se aislaron mediante PCR con una variedad de oligonucleótidos degenerados correspondientes a los dominios transmembrana conservados de la superfamilia GPR. Los oligonucleótidos usados para aislar el grupo de subclones, incluido el WZ7, modificados de las secuencias de oligómeros publicados (Zhou y col., 1990, Nature 347: 76-80) correspondían a los dominios transmembrana III (5'-GAGTCGACCTGTG(CT)G(CT)(AG)CNNT(GT)GAC(AC)G(CG)TAC-3') y transmembrana VI (5'-CAGAATTCAG(AT)AGGGCANCCAGCAGAN(CG)(AG)(CT)GAA-3'). La PCR se llevó a cabo en condiciones de rigurosidad baja. Una porción de la reacción se reamplificó en condiciones de rigurosidad elevada, se digirió con enzimas de restricción, se subclonó en pBluescript II KS+ (Stratagene) y se secuenció. Para el ensayo de interrupción por hibridación se sintetizaron un oligonucleótido antisentido correspondiente al dominio transmembrana II del receptor 5HT₁₀ (5'-ATCAGCAATGGCTAG-3') (Julius y col., 1988, Science 241: 558-564) y un oligonucleótido correspondiente a WZ7 (5'-AGCATGATGAGGAGG-3'). Una mezcla de α T3-1 (1 mg/ml) y ARN total de cerebro de rata (1 mg/ml) se preincubó con oligonucleótido antisentido (100 μ g/ml) durante 10 minutos a 37°C en un tampón con NaCl 200 mM y Tris 5 mM, a pH 7,4 en un volumen de 3 μ l. Se inyectaron 50 ml de la mezcla a los ovocitos de *Xenopus* y se incubaron durante 48 horas antes de registrar.

6.1.3. Detección selectiva de la biblioteca y secuenciación

Se sometieron 10⁶ placas de una biblioteca de ADNc de α T3-1 de UniZap (Stratagene) a detección selectiva con el inserto de WZ7, que se había marcado con ³²P con cebadores hexaméricos aleatorios. Se identificaron 40 placas positivas y 7 se purificaron en detecciones selectivas secundaria y terciaria. El WX25 se subclonó en pBlueSript II SK+ mediante escisión del fago auxiliar y ambas cadenas se secuenciaron mediante el método dideoxi de terminación de cadena con la ADN polimerasa Sequenasa T7 (USB). La secuencia se confirmó posteriormente mediante resecuenciación de ambas cadenas con marcaje con po-

limerasa taq y un secuenciador automático de Applied Biosystems. Para excluir la posibilidad de que el extremo C citoplasmático predicho se escindía a causa de una mutación en WZ25, la secuencia 3' se confirmó en dos clones independientes adicionales. Las secuencias nucleotídica y de aminoácidos se analizaron con un paquete Wisconsin GCG en un ordenador VAX y MacVector (IBI) en un microprocesador.

6.1.4. Caracterización del transcrito de ARN de WZ25

El WZ25 en el pBluescript II SK+ (Stratagene) se hizo lineal y el transcrito de ARN protegido se sintetizó usando la ARN polimerasa T3 (Stratagene). En los ovocitos se inyectaron 1,25 ng del transcrito resultante y se incubaron durante 48 horas antes de registrar. Los ovocitos se trataron previamente con tampón o con un antagonista de la GnRH (antagonista 6: [Ac-D-Nal(2'),D, α -Me-pCl-Phe²,D-Trp³,D-Arg⁶,D-Ala¹⁰]GnRH; antagonista 27: [Ac-D-Nal(2)¹,D, α -Me-pCl-Phe²,D-Trp³,N- ϵ -Ipr-Lys⁵,D-Tyr⁶,D-Ala¹⁰]GnRH; ref. (Can der Spuy y col., 1987, En: Vickery B. H. y Nestor J. J. (editores) LHRH and its Analogs: Contraceptive and Therapeutic Applications. NTP Press, Lancaster, Inglaterra) durante 3 minutos antes de la administración de GnRH. Para confirmar la expresión del receptor, se volvió a exponer los ovocitos a GnRH después de un lavado de tres minutos del antagonista.

6.1.5. Ensayo de unión a un ligando radiactivo

Para la preparación de membranas, en cada uno de 500 ovocitos se inyectaron 2,5 ng de ARN sintético de WZ25. Tras 48 horas se prepararon membranas de ovocito como se ha descrito (Koblika y col., 1987, J. Biol. Chem. 262: 15796-15802) y se resuspendieron en tampón de unión con HEPES 10 mM, EDTA 1 mM y 0,1% de seroalbúmina bovina, para dar una concentración final de 20 ovocitos/ml. El ensayo de unión al receptor usando ¹²⁵I-[D-Ala⁶, NaMe-Leu⁷, Pro⁹-NHET]GnRH (GnRH-A) se basó en el descrito antes para membranas hipofisarias de rata y de oveja (Millar y col., 1989, J. Biol. Chem. 264: 21007-21013). La unión en presencia de análogo de GnRH 10⁻⁶ M se consideró que representaba la unión inespecífica. La Bo media (unión máxima) y los valores de unión inespecífica fueron 1429 y 662 cpm, respectivamente. La constante de disociación (Kd) para GnRH-A y GnRH se determinó con Enzfitter (Elsevier-BIOSOFT).

6.1.6. Hibridación en solución, análisis Northern blot e hibridación in situ

Un GnRH-R de 399 nucleótidos marcado con ³²P y una sonda de ARNc antisentido 1B15 (estándar interno de ciclofilina) de 117 nucleótidos se sintetizaron e hibridaron a ARN en solución mediante los procedimientos descritos (Autelitano y col., 1989, Mol. Cell. Endo. 67: 101-105). El análisis por la técnica Northern usando ARN poli(A)⁺ de α T3-a se llevó a cabo como se ha descrito (Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La hibridación in situ con ARNc marcado con ³⁵S-UTP se realizó en secciones hipofisarias independientes siguiendo los procedimientos publicados (Gall y Isackson, 1989, Science 245: 758-761). Las secciones se montaron y expusieron a una película de Amersham Betamax durante 3 días o se sumergieron en emulsión radiactiva y se desarrollaron después de 17 días.

6.2. Resultados

6.2.1. Clonación de ADNc de un GnRH-R funcional murino

Se usó ARN de la línea celular gonadotropa de ratón, α T3-1 [5], que dirige la expresión de un GnRH-R en ovocitos de *Xenopus* (Sealfon y col., 1990, Mol. Endocrinol. 4: 119-124), para sintetizar ADNc mediante PCR con oligonucleótidos degenerados correspondientes a motivos conservados de los receptores acoplados a proteína G (GPR); véase Probst y col., 1992, DNA y Cell Biol. 11: 1-20; los productos de la PCR se subclonaron y secuenciaron, y se sintetizaron oligómeros antisentido para realizar un ensayo de interrupción por hibridación (Kawashi, 1985, Nuc. Acids Res. 13: 4991-5004). Un oligonucleótido correspondiente al clon WZ7, cuando se inyectó en ARN de α -T3-1 y de cerebro de rata abolió por completo la expresión del GnRH-R en ovocitos pero no afectó a la expresión del receptor 5HT₁₀ cerebral (fig. 1). Un segundo oligonucleótido antisentido que representa un segmento diferente de WZ7 también eliminó, del todo y de forma específica la expresión de GnRH-R en todos los ovocitos probados (n = 16). El clon Wz7 se usó como sonda para seleccionar una biblioteca de ADNc de bacteriófago α T3-1-a y se purificaron siete placas positivas.

Para probar si el clon con el inserto más largo de 1,3 kb, WZ25, codifica un GnRH-R funcional, se subclonó para la síntesis de ARN y la expresión en ovocitos. Se demostró que en todos los ovocitos en los que se había inyectado ARN sintético (n > 50), cuando se expusieron a GnRH, presentaban una gran respuesta despolarizante característica de la expresión de GnRH-R (fig. 2). El potencial inverso (V_i) y la dependencia de calcio de la respuesta a la inducción con GnRH en ovocitos por el transcrito de ARN de WZ25 fueron similares a los obtenidos anteriormente usando ARN de α T3-1 (Sealfon y col., 1990, Mol. Endocrinol. 4: 119-124). El V_r de la corriente provocada por la GnRH fue $-27 \pm 0,79$ mV (n = 7), consistente con el del ión cloruro en ovocitos (Barish, 1983, J. Physiol. 342: 309-325). La respuesta provocada por GnRH se abolió por completo mediante la precarga del ovocito con EGTA 5 mM una hora antes del registro (n = 4), pero no se vio significativamente afectada por la ausencia de Ca²⁺ en el perfundido (n = 7). Por tanto, el receptor expresado del clon WZ25 exhibió una respuesta mediada a través de la activación de la corriente de cloruro dependiente de calcio del ovocito por el calcio intracelular, como es característico en los receptores que producen la hidrólisis de fosfatidilinositol (véase Dascal, 1987, CRC Critt. Rev. Biochem. 417: 47-61). La farmacología de la respuesta obtenida fue acorde con la expresión de GnRH-R de mamífero. El agonista de GnRH [D-Ser(t-Bu)⁶,Pro⁹-NH Et]GnRH (buserelina 100 nM, n = 6) provocó una corriente despolarizante en los ovocitos en los que se había inyectado ARN. En presencia del antagonista equimolar de GnRH [D-Phe^{2,5},Pro³]GnRH, se produjo una reducción del 60% en la respuesta a GnRH en comparación con las respuestas a GnRH solo (1880 ± 551 nA, n = 5 y 4758 ± 1082 nA, n = 4, respectivamente). Dos potentes antagonistas de GnRH eliminaron por completo la corriente provocada por la GnRH (fig. 2A).

Para caracterizar más el receptor codificado por este clon de ADNc se llevaron a cabo ensayos de unión a ligando radiactivo sobre membranas purifi-

cadas de ovocitos en los que se había inyectado el transcrito de ARN de WZ25. El agonista de GnRH [D-Ala⁶,NaMe-Leu⁷,Pro⁹-NH Et]GnRH (GnRH-A) se unió con afinidad elevada a membranas de ovocitos en los que se había inyectado ARN sintético (fig. 2B). El desplazamiento de la ¹²⁵I-GnRH-A por la GnRH-A reveló Kd similares de 4,5 y 2,9 nM en membranas de ovocitos en los que se había inyectado ARN de WZ25 y en membranas de α T3-1, respectivamente. El desplazamiento por la GnRH de la GnRH-A unida al receptor clonado fue un orden de magnitud menos eficaz, como se ha comunicado antes para las membranas de α T3-1 (Horn y col., 1991, Mol. Endocrinol. 5: 347-355). Por tanto, los datos de la interrupción por hibridación y de expresión confirman que el clon WZ25 representa el GnRH-R de ratón.

6.2.2. Caracterización de la secuencia codificada del GnRH-R murino

La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°1) y la correspondiente secuencia predicha de aminoácidos (SEC ID N° 2) del clon WZ25 se muestran en la figura 3. El marco de lectura abierto más largo codifica una proteína de 327 aminoácidos (masa molecular relativa; Mr = 37.683). El tamaño mayor comunicado para la subunidad de unión del GnRH-R solubilizado de rata, M, 50.000-60.000 (Hazum y col., 1986, J. Biol. Chem. 261: 13043-13048; Iwashita y col., 1988, J. Mol. Endocrinol. 1: 187-196) puede deberse a la glicosilación del receptor. Se encuentran presentes tres secuencias consenso de glicosilación ligada a N, dos en el extremo N y una en el primer bucle extracelular posible. Se cree que el primer ATG representa el sitio de iniciación de la traducción porque se aproxima mucho a la secuencia consenso Kozak (Kozak, 1987, Nuc. Acids. Res. 15: 8125-8148) y un segundo clon de ADNc con una secuencia adicional en 5' contiene dos codones sin sentido en este marco de lectura en las posiciones -54 y -57. Por tanto, la iniciación de la traducción en cualquiera de los sitios de inicio en 5' terminaría antes de alcanzar el marco de lectura abierto correcto. No hay señal de poliadenilación y es muy probable que la aparente cola de poli(A) represente el cebado con oligo(dT) en la región 3' sin traducir durante la construcción de la biblioteca. El ADNc del GnRH-R funcional aislado es de 1,3 kb, mientras que el ARNm que contienen esta secuencia es de aproximadamente 4,6 kb, como se ha determinado mediante gradiente de sacarosa (Sealfon y col., 1990, Mol. Endocrinol. 4: 119-124) y análisis por la técnica Northern (fig. 5B). El análisis de PCR de 40 placas positivas identificadas mediante selección primaria de la biblioteca sugiere que el ARNm del GnRH-R contiene ambas secuencias sin traducir adicionales, en 5' y en 3'.

El análisis de hidrofobicidad de la proteína deducida demuestra siete tramos de aminoácidos altamente hidrófobos con un 20-30% de similitud de secuencia con otros GPR, con el grado más elevado de homología con el receptor de la interleucina 8 (fig. 4). Aunque se han observado varios residuos altamente conservados en el GnRH-R, tales como las cisteínas presentes en cada uno de los primeros dos bucles extracelulares que estabilizan muchos receptores, varias de las características del GnRH-R son poco habituales. Por ejemplo, el dominio transmembrana II altamente conservado aspartato/glutamato, que se ha descubierto que es esencial para la función de muchos GPR, está sustituido con una asparagina. El GnRH-

R es casi el miembro más pequeño de la superfamilia de GPR y, al contrario que muchos otros GPR, carece de un extremo C polar citoplasmático. El primer bucle citoplasmático posible es más largo que los otros GPR. Único entre los GPR, el GnRH-R puede activarse a través de dimerización (Conn y col., 1982, Nature 296, 653-655; Gregory y Taylor, 1982, Nature 300: 269-271). Su estructura poco frecuente puede facilitar este mecanismo de activación propuesto.

Otra desviación de otros GPR es la sustitución de serina por la tirosina conservada localizada adyacente al dominio transmembrana III. Esto crea un potencial sitio de fosforilación, único del GnRH-R, en un dominio crucial para la transducción de señal de otros GPR. La fosforilación del extremo C, que no existe en el GnRH-R, contribuye a la desensibilización de varios GPR (véase Probst y col., 1992, DNA and Cell Biology 11: 1-20). Será interesante determinar si el nuevo sitio de fosforilación del GnRH-R media la desensibilización del receptor. También hay otros posibles sitios de regulación de fosforilación (fig. 3).

La presencia de ARNm de GnRH-R en una variedad de líneas de células neuroendocrinas se estudió mediante hibridación en solución/ensayos de protección de nucleasa (fig. 5A). El ARNm de GnRH se detectó en células α T3-1 y en hipófisis de ratón, pero no en las líneas celulares GnRH derivada de neuronas (GT-1), corticotropas (AtT20) o somatolactotropas (GH3) en los límites de detección del ensayo. La ausencia de ARNm de GnRH-R detectable en las líneas celulares AtT-20 y GT-1 se ha confirmado usando concentraciones más elevadas de ARN en la hibridación en solución/ensayo de protección con nucleasa (Dr. Andrea C. Gore, datos no publicados). La figura 5C muestra la distribución del ARNm de GnRH-R en la adenohipófisis de rata. El marcaje se distribuyó de forma heterogénea en toda la glándula, un patrón ya observado mediante autorradiografía del GnRH-R (Badr y Pelletier, 1988, Neuropeptides 11: 7-11). La microscopía de campo claro y de campo oscuro revela la acumulación de las células que expresan el ARNm de GnRH-R. (fig. 5 E, F).

7. Ejemplo

Clonación y caracterización de GnRH-R humano

En las siguientes subsecciones se describen la clonación de ADN complementario que representa el GnRH-R humano y se confirma su identidad mediante expresión en ovocitos de *Xenopus*. Además, el GnRH-R humano se expresó en células COS-1 y se mostró que era funcionalmente activo.

7.1. Materiales y procedimientos

7.1.1. Clonación de GnRH-R humano

En condiciones de baja rigurosidad se pusieron en contacto 1,2 millones de placas de una biblioteca de ADNc de hipófisis humana GT10 (Clontech) con una sonda (Sambrook y col., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) con el inserto de GnRH-R de ratón (Tsutsumi y col., 1992, Mol. Endocrinol. 6: 1163-1169) que se había marcado con 32 P a través de cebado hexamérico aleatorio. Se identificaron treinta y dos placas positivas en filtros por duplicado; diez se seleccionaron para su posterior caracterización y seis se purificaron con éxito mediante la consiguiente detección selectiva. El clon con el inserto más largo se subclonó en el sitio Eco RI de pBluescript II SK+ (Construcción LC27-4) y ambas cadenas se secuenciaron repetidamente en un secuenciamen-

to automático de Applied Biosystems (Foster City, CA. EE.UU.) con cebadores oligonucleotídicos sintéticos. La secuencia se analizó usando el paquete Wisconsin GCG en un ordenador VAX.

7.1.2. Expresión en ovocitos de *xenopus*

La construcción LC27-4 se hizo lineal y el transcrito de ARN UCAPPED se sintetizó con la ARN polimerasa T3. LA preparación de los ovocitos y la electrofisiología se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Sealfon y col., 1990, Mol. Endocrinol. 4: 119-124). Se inyectó a las células 1-10 ng de transcrito sintético y la electrofisiología se registró a través de pinzamiento de voltaje de dos electrodos 48 horas después. Todos los agonistas y antagonistas se aplicaron a una concentración de 0,2 μ M. Los antagonistas se introdujeron en el baño 3 minutos antes de la exposición a GnRH.

Se usaron los siguientes análogos de GnRH: GnRH-A: [D-Ala⁶,N-Me-Leu⁷, Pro⁴-NHRT]GnRH; antagonista 5: [D-pGlu¹,D-Phe²,D-Trp^{3,6}]GnRH; antagonista 6: [Ac-D-Nal(2)¹,D- α -Me-pCl-Phe²,D-Trp³,D-Arg⁶,D-Ala¹⁰]GnRH; antagonista 13: [Ac-D-Nal¹,D- α -4ClPhe²,D-Pal³, D-Arg⁶,D-Ala¹⁰]GnRH; antagonista 27: [Ac-D-Nal(2)¹,D- α -Me-pCl-Phe²,D-Trp³, N- ϵ -Ipr-Lys⁵,D,Tyr⁶,D-Ala¹⁰]GnRH (Van der Spuy y col., 1987, en LHRH and its Analogs: Contraceptive and Therapeutic Applications (Vickery, B. H., y Nestor, J. J. eds) NTP Press, Lancaster. Busirelina [D-Ser(But)⁶,Pro⁹]GnRH) fue un generoso regalo de Hoechst-Roussel Pharmaceuticals (Somerville, NJ, EE.UU.).

7.1.3. Transfección de células COS-1

El ADNc de GnRH-R humano se subclonó en un vector de expresión, pSV2A, que contenía un promotor temprano de SV40. Las células COS-1 se sometieron a transfección transitoria con el vector pSV2A humano con la construcción GnRH-R usando el procedimiento DEAE-dextrano (Keown y col., 1990, en Methods in Enzymology, VI. 185 (Goeddel, D. V., ed.) pág. 527-537, Academic Press, Nueva York). En estudios sobre unión de GnRH, 3 x 10⁶ células/10 cm de placa se sometieron a transfección con 15 μ g de ADN. Para los estudios sobre la producción de fosfato de inositol, 1,8 10⁵ células/pocillo (placas de 12 pocillos) se sometieron a transfección con 1,5 μ g de ADN. Las células se analizaron 48 horas después de la transfección.

7.1.4. Unión al receptor

Se prepararon membranas celulares de células sometidas a transfección con una única etapa de centrifugación, como se ha descrito para las hipófisis de rata (Millar y col., 1989, J. Biol. Chem. 264: 21007-21013). El ensayo de unión al receptor se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Tsutsumi y col., 1992, Mol. Endocrinol. 6: 1163-1169) usando 125I-GnRH-A. Para estimar la unión inespecífica se usó GnRH-A 10⁻⁷.

7.1.5. Estimulación de producción de fosfato de inositol

La producción de fosfato de inositol (IP) estimulada por GnRH se determinó como se ha descrito (Davidson y col., 1990, Endocrinology 126: 80-87). La acumulación de [3 H]IP en presencia de LiCl se usó como un índice del recambio de fosfato de inositol. Brevemente, las células sometidas a transfección se marcaron durante la noche con [3 H]inositol y se estimularon con GnRH 1,0 μ M en presencia de LiCl. La reacción se detuvo mediante la adición de una solu-

ción de ácido perclórico y ácido fítico. Tras neutralizar con KOH, los fosfato de inositol se separaron en una columna de intercambio iónico Dowex y se contaron.

7.1.6. *Análisis Northern Blot y PCR*

Se preparó ARN de seis hipófisis humanas (cinco machos, una hembra, edad 30-45) y testículos humanos (edad 80) mediante extracción con tiocianato de guanidinio seguida por centrifugación en cloruro de cesio (Sambrook y col., 1989, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). El ARN poli(A) de hipófisis (1,6 μ g) y de testículo (0,9 μ g) preparado usando el sistema de aislamiento de ARNm Promega PliA Tract se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 1%, formaldehído 2,2M, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (HYbond-C extra, Amersham) en 20 x SSC y se fijó al vacío a 80°C. El inserto de la construcción LC27-4 se marcó a una actividad específica de $7,2 \times 10^6$ cpm/ μ g con el Kit de marcaje Amersham Megaprime. Las transferencias se hibridaron previamente (2 h) y se hibridaron (durante la noche) en Pipes 2x, con formamida al 50%, SDS al 0,5%, 100 μ g/ml de ADN de esperma de arenque a 42°C, seguido por lavado (lavado final SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 60°C durante 10 minutos). Con el fin de delinear la extensión de la secuencia sin traducir 5' y 3' en el ARN humano, los clones se identificaron en filtros duplicados. En la biblioteca principal, los seleccionados que no se purificaron se usaron como moldes para la PCR con pares de cebadores dirigidos contra el sitio de clonación GT10 y el inserto GnRH-E humano conocido. Los productos de la reacción de PCR obtenidos se compararon con los obtenidos usando el clon LC27-4 como molde para la PCR en geles de agarosa al 1%.

7.2. *Resultados*

7.2.1. *Clonación y caracterización de GnRH-R humano*

Mediante la secuenciación del clon LC-27-4 se identificó un inserto de 2160 pb (fig. 9). El marco de lectura abierto más largo (1008 pb) se extiende hacia el extremo 5' del clon. El sitio de iniciación de la traducción se asigna al primer ATG en parte por la presencia de una secuencia consenso Kozak (Kozak, 1987 *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-8148). Dado que el clon caracterizado permanece en el marco de lectura en la totalidad de su extensión 5', no se puede excluir la existencia de sitios de iniciación adicionales en 5'. Sin embargo, la presencia de otra región codificadora adicional en 5' se considera poco probable a causa de la elevada homología con el receptor de ratón del cual el sitio de iniciación de la traducción se puede asignar con mayor certeza (Tsutsumi y col., 1992). Por tanto, el ADNc del receptor humano contiene un marco de lectura de 984 pb que codifica una proteína de 328 aminoácidos con un 90% de identidad con la secuencia predicha del receptor de ratón. La región larga en 3' sin traducir no contiene señal de poliadenilación.

El análisis por técnica *Northern* se llevó a cabo para determinar el tamaño del ARN de GnRH-R humano de longitud completa. La sonda reveló una única banda de ~4,7 kb en ARN poli(A) de hipófisis humana (Fig.10). No se detectó señal alguna en ARN poli(A) purificado de testículo humano o con un control de ADNc de β -actina. Para determinar la extensión de los dominios 5' y 3' sin traducir del ARN, se realizó un análisis de PCR de los aislamientos de fago de

la selección de la biblioteca principal. Se usó un cebador oligonucleótido antisentido que representaba la secuencia cercana al extremo 5' del inserto LC27-4 o un cebador sentido cerca del extremo 3' de la misma secuencia, junto con cebadores diseñados contra el sitio de clonación GT1 para formar el mapa de los clones no purificados. Los productos de la PCR más largos identificados tenían 1,3 kb de secuencia 5' adicional y 0,3 kb de secuencia 3' adicional (no se muestra). Estos datos sugieren que el ARNm de GnRH-R contiene al menos 1,3 kb de secuencia sin traducir en 5' y 1,5 kb de secuencia sin traducir en 3'. Según los datos del análisis por la técnica *Northern*, se sugiere que ninguno de los clones aislados no contiene secuencia adicional sin traducir (- 1kb).

Mediante análisis de hidrofobicidad (Kyte-Doolittle) se identificaron los siete dominios hidrófobos característicos de los receptores acoplados a proteína G (véase la fig. 9). Como se descubrió en la estructura predicha del receptor de ratón, el GnRH-R humano carece esencialmente de dominio extracelular de extremo C. Hay dos sitios de glucosilación ligada a N, uno en cada uno de los dos primeros dominios extracelulares. En los dominios intracelulares se encuentran varios residuos citoplásmicos de serina y treonina, que pueden servir como sitios de regulación de la fosforilación.

7.2.2. *Inyecciones en ovocitos de xenopus*

El clon aislado más largo, LC27-4, contenía un inserto de ~2,2 kb. Para comprobar si este clon codificaba un GnRH-R funcional humano, se inyectó transcrito de ARN sintético en ovocitos de *Xenopus*. Todos los ovocitos en los que se inyectó ARN desarrollaron grandes corrientes despolarizantes tras la exposición a GnRH 2×10^{-7} M ($n = 17$) o a buserelina 2×10^{-7} M ($n = 6$; fig. 1), que eran indistinguibles de las respuestas obtenidas después de la expresión de GnRH-R de mamífero en ovocitos usando ARN tisular o de la línea celular (Sealfon y col., 1990, *Mol. Endocrinol.* 4: 119-124). Estas respuestas se bloquearon por completo con concentraciones equimolares de dos potentes antagonistas del receptor de GnRH ($n = 5$ para cada uno; fig. 6).

7.2.3. *Expresión de GnRH-R humano en células COS-1*

Para caracterizar más el GnRH-R humano clonado, el receptor se expresó en células COS-1. Los datos de unión obtenidos usando membranas de células COS-1 sometidas a transfección con la construcción de GnRH-R humano se presentan en la figura 7. El desplazamiento de la GnRH-A por GnRH-A, GnRH y antagonista 5 tenía constantes de disociación de 0,97 nM, 2,8 nM y 8,4 nM respectivamente, valores similares a los obtenidos anteriormente con membranas de hipófisis humana (Wronald y col., 1985, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 1190-1198).

El receptor expresado en las células COS-1 fue funcional y se descubrió que estaba acoplado al metabolismo del fosfato de inositol. Con la estimulación máxima del receptor se multiplicó por 8 el metabolismo del fosfato de inositol y la CE_{50} de la GnRH fue de -3 nM. LA estimulación del recambio de PI inducido por GnRH (10^{-8})M se inhibió con un antagonista de GnRH de modo dependiente de concentración (fig. 8). LA producción de fosfato de inositol (10^{-8})M estimulada con GnRH se inhibió con el antagonista 13 con una CI_{50} de $6,7 \times 10^{-9}$ M y con el antagonista 5 con una CI_{50} de $1,05 \times 10^{-7}$ M (datos no mostrados),

lo que da valores de K_d de $2,1 \times 10^{-10}$ M y de $3,6 \times 10^{-9}$ M, respectivamente (Leslie F.M. 1987 Pharmacol. Rev. 39: 197-247).

Debe entenderse que todas las longitudes de pares de bases dados para los nucleótidos son aproximadas y se usan con el propósito de describir.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica:

- (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2; o
- (b) la complementaria de la secuencia de (a)

2. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 y que codifica un receptor natural de GnRH, en la que las condiciones estrictas comprenden la hibridación en Pipes 2x, 50% de formamida, 0,5% de SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de arenque a 42°C seguido por lavado con SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 60°C.

3. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1.

4. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica:

- (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 4; o
- (b) la complementaria a la secuencia de nucleótidos de (a).

5. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 y que codifica un receptor natural de GnRH, en la que las condiciones estrictas comprenden la hibridación en Pipes 2x, 50% de formamida, 0,5% de SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de arenque a 42°C seguido por lavado con SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 60°C.

6. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3.

7. Un vector recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

8. Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 asociada operativamente con una secuencia de nucleótidos reguladora que contiene información de regulación de la transcripción y de la traducción que controla la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula huésped.

9. Un vector recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 y que codifica una proteína de fusión receptor de GnRH.

10. Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 9 asociada operativamente con una secuencia de nucleótidos reguladora que contiene información de regulación de la transcripción y de la traducción que controla la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula huésped.

11. Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

12. Una célula sometida a ingeniería genética, que

comprende el vector de expresión de la reivindicación 8 ó 10.

13. Un receptor aislado de GnRH, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

14. Un receptor aislado natural de GnRH codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas con el ácido nucleico de la SEC ID N° 1, en la que las condiciones estrictas comprenden la hibridación en Pipes 2x, 50% de formamida, 0,5% de SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de arenque a 42°C seguido por lavado con SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 60°C.

15. Un receptor de GnRH aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 4.

16. Un receptor aislado natural de GnRH codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas con el ácido nucleico de la SEC ID N° 3, en la que las condiciones estrictas comprenden la hibridación en Pipes 2x, 50% de formamida, 0,5% de SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de arenque a 42°C seguido por lavado con SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 60°C.

17. Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio extracelular, transmembrana o citoplásmico del receptor de GnRH de la reivindicación 13, 14, 15 ó 16.

18. Una proteína de fusión que comprende la proteína receptor de GnRH, o un polipéptido o péptido de la reivindicación 13 ó 15 unido a una proteína o péptido heterólogo.

19. Una composición para la anticoncepción en un mamífero, que comprende un receptor de GnRH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

20. Una composición para la anticoncepción en un mamífero, que comprende un receptor de GnRH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

21. Una composición para la anticoncepción en un mamífero, que comprende una proteína de fusión receptor de GnRH que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de la SEC ID N° 2.

22. Una composición para la anticoncepción en un mamífero, que comprende una proteína de fusión receptor de GnRH que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de la SEC ID N° 4.

23. Uso de un receptor de GnRH que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 en la fabricación de una composición para la anticoncepción en un mamífero.

24. Uso de un receptor de GnRH que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 4 en la fabricación de una composición para la anticoncepción en un mamífero.

25. Uso de una proteína de fusión receptor de GnRH que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 ó 4 en la fabricación de una composición para la anticoncepción en un mamífero.

26. Un procedimiento para producir receptor recombinante de GnRH, que comprende:

- (a) cultivar una célula huésped transformada con el vector de expresión de la reivindicación 8 y que expresa el receptor de GnRH; y
- (b) recuperar el receptor de GnRH.

27. Un procedimiento para producir proteína de

fusión receptor recombinante de GnRH, que comprende:

- (a) cultivar una célula huésped transformada con el vector de expresión de la reivindicación 10 y que expresa la proteína de fusión receptor de GnRH; y
- (b) recuperar la proteína de fusión receptor de GnRH.

28. Un oligonucleótido antisentido complementario a un gen que codifica el receptor de GnRH de las reivindicaciones 13, 14, 15 ó 16, que inhibe la transcripción del gen en una célula.

29. El oligonucleótido de la reivindicación 28, que es complementario a una secuencia de nucleótidos que codifica la región transmembrana del receptor de GnRH de las reivindicaciones 13, 14, 15 ó 16.

30. Un anticuerpo monoclonal que se une de forma inmuno-específica a un epítipo del receptor de GnRH de las reivindicaciones 13, 14, 15 ó 16.

31. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 30, que inhibe de forma competitiva la unión de GnRH al receptor de GnRH de las reivindicaciones 13, 14, 15 ó 16.

32. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 30 ó 31, que se une al receptor de GnRH de las reivindicaciones 13, 14, 15 ó 16, en el que el receptor de GnRH es humano.

33. Un procedimiento para identificar un compuesto que modula la transducción de señal del receptor de GnRH, que comprende:

- (a) poner en contacto el compuesto con una línea celular producida por ingeniería genética que expresa un receptor recombinante de GnRH codificado por una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor

natural de GnRH y que hibrida en condiciones estrictas con la molécula de ácido nucleico de la SEC ID N° 1 ó 3, en el que las condiciones estrictas comprenden la hibridación en Pipes 2x, 50% de formamida, 0,5% de SDS, 100 µg/ml de ADN de espermatozoos de arenque a 42°C seguido por lavado con SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 60°C;

- (b) incubar la mezcla de la etapa (a) en presencia de GnRH, o un análogo de GnRH, durante un intervalo suficiente para que el compuesto estimule o inhiba la transducción de señal;
- (c) medir la transducción de señal; y
- (d) comparar la actividad de la transducción de señal con la del receptor de GnRH incubado sin el compuesto, y de este modo determinar si el compuesto estimula o inhibe la transducción de señal.

34. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que la actividad de la señal del receptor de GnRH se mide mediante el análisis para determinar la estimulación o la inhibición de la actividad de la fosfolipasa C.

35. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que la actividad de transducción de señal del receptor de GnRH se mide mediante el análisis para determinar la estimulación o la inhibición de la actividad del fosfato de inositol (IP).

36. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que la actividad de transducción de señal del receptor de GnRH se mide mediante el análisis para determinar la liberación de iones de calcio desde fuentes intracelulares.



FIG. 1A

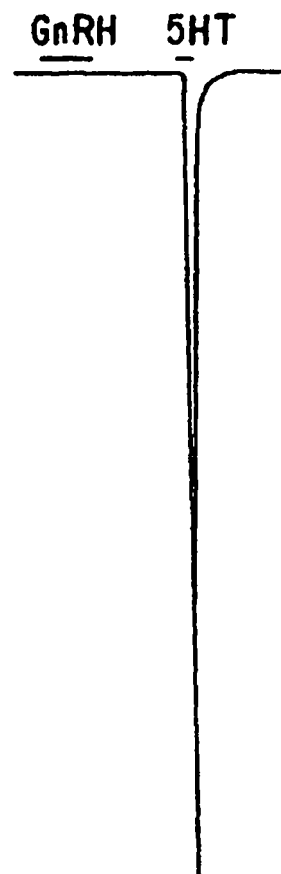


FIG. 1B

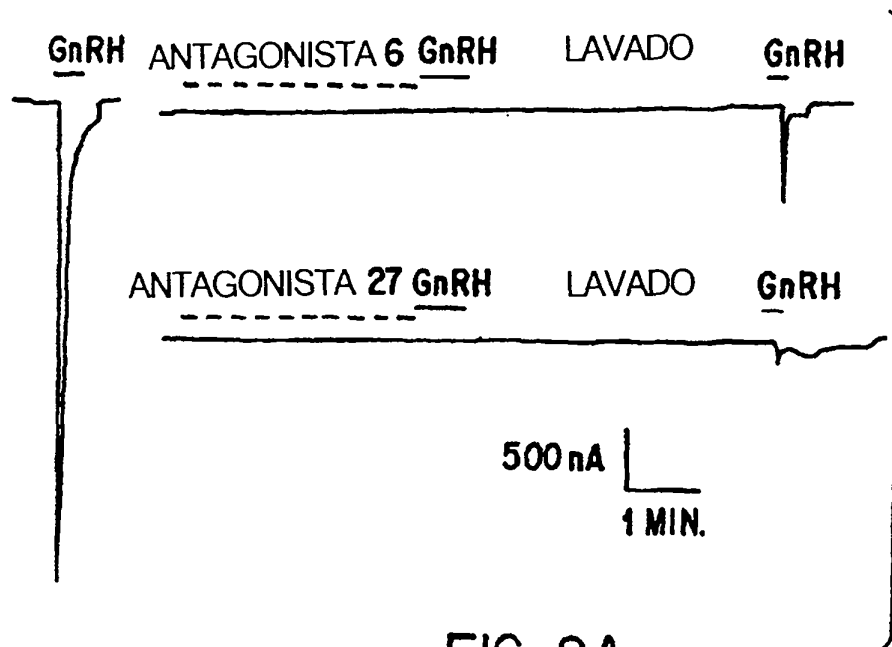


FIG. 2A

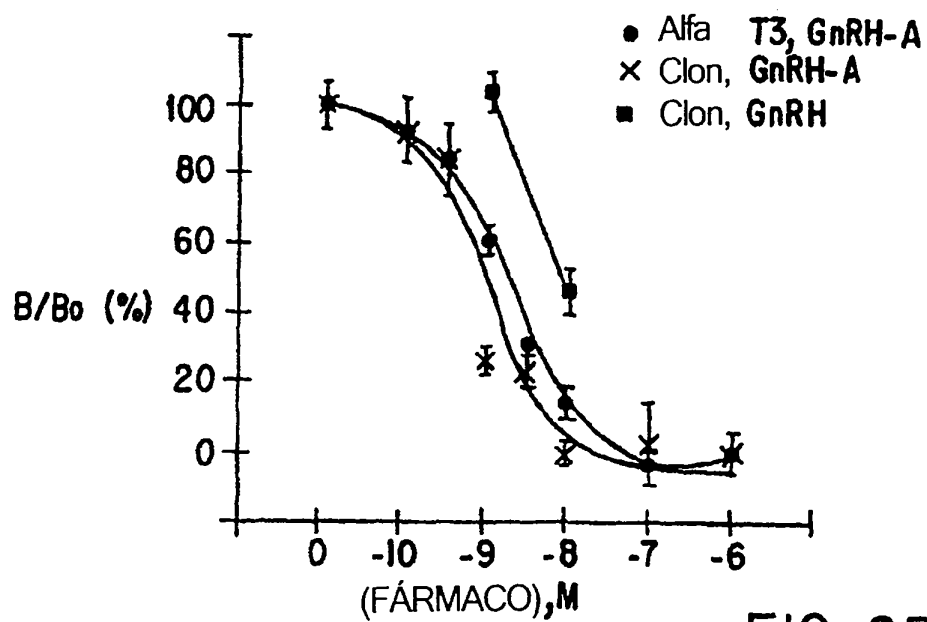


FIG. 2B

CACGAGAGGGACTCCACTCTTGAAGCCTGTCCCTGGAGAAAT -1
 ATGGCTAACAAATGCATCTCTTGAGCAGGAGCCAAATCACTGCTGGCCCATCAACAACAGC 60
 N A N N A S L E Q D P N H C S A I N N S 20
 ATCCCTTGATACAGGGCAAGCTCCCGACTCTAACCGTATCTGAAAGATCCGAGTGACC 120
 I P L I Q G K L P T L T V S G K I R V T 40
 GTGACTTTCTTCCTTTTCTACTCTCTACTGCCCTTCAATGCTTCCTTCTGTGAAGCTG 180
 V T F F L F L L S T A F N A S F L L K L 60
 CAGAAGTGACTCACAAGAGGAAGAAAGCAAAAAGCTCTCAAGGATGAAGTGCTTTTA 240
 Q K W T Q K R K K G K K L S R M K V L L 80
 AAGCATTTGACCTTAGCCAACTGCTGGAGACTCTGATCGTCATGCCACTGGATGGGATG 300
 K H L T L A N L L E T L I V M P L D G M 100
 TGGAAATTAATGTTCACTGGTATGCTGGGGAGTTCCCTCTGCAAGTTCTCAGCTATCTG 360
 W N I T V Q W Y A G E F L C K V L S Y L 120
 AAGCTCTTCTCTATGTATGCCCCAGCTTTCATGATGGTGGTGATTAGCCTGGACCGCTCC 420
 K L F S M Y A P A F M M V V I S L D R S 140
 CTGGCCATCACTCAGCCCTTGCTGTACAAAGCAACAGCAAGCTTGAACAGTCTATGATC 480
 L A I T Q P L A V Q S N S K L E Q S M I 160
 AGCCTGGCTGGATTCTCAGCATTGTCTTTGCAGGACCACAGTTATATATCTTCAGGATG 540
 S L A W I L S I V F A G P Q L Y I F R M 180
 ATCTACCTAGCAGACGGCTCTGGGCCACAGTCTTCTGGCAATGTGTGACCCACTGCAGC 600
 I Y L A D G S G P T V F S Q C V T H C S 200
 TTCCACAGTGGTGGCATCAGGCCTTCTACAACCTTTTCACTTCGGCTGCCTCTTCATC 660
 F P Q W W H Q A F Y N F F T F G C L F I 220
 ATCCCCCTCCTCATCATGCTAATCTGCAATGCCAAATCATCTTTGCTCTCAGCGAGTC 720
 I P L L I M L I C N A K I I F A L T R V 240
 CTTTCATCAAGACCCAGCAAACTACAGATGAATCAGTCCAAGAATAATATCCCAAGAGCT 780
 L H Q D P R K L Q M N Q S K N N I P R A 260

FIG.3A

OGGCTGAGAACGCTAAAGATGACAGTGGCATTGGCTACCTCCTTTGTGCTCTGCTGGACT	840
R L R T L K M T V A F A T S F V V C W T	280
• <u>VI</u>	
CCCTACTATGTCCTAGGCATTTGGTACTGGTTTGATCCAGAAATGTTGAACAGGGTGCTCA	900
<u>P Y Y V L G I W Y W F D P E M L N R V S</u>	300
GAGCCAGTGAATCACTTTTTCTTTCTTTGCTTTTCCTAAACCCGTCCTTCGACCCACTC	960
E P V <u>N H F F F L F A F L N P C F D P L</u>	320
<u>VII</u>	
ATATATGGGTATTTCTCTTTGTAGTTGGGAGACTACACAAGAACTCAGATAGAAATAAGG	1020
<u>I Y G Y F S L</u>	327
TAACATAATTGCACCAATTGAGAATAAACTCAAAGCTTTTGACACACTTATATACAAGGCA	1080
GGGTTTAAGGTTAGATTATCAACCTTGTTTTGTACAGAGTTTGTTGTTAGAGCTTCAGA	1140
AGACCTTCAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1185

FIG.3B

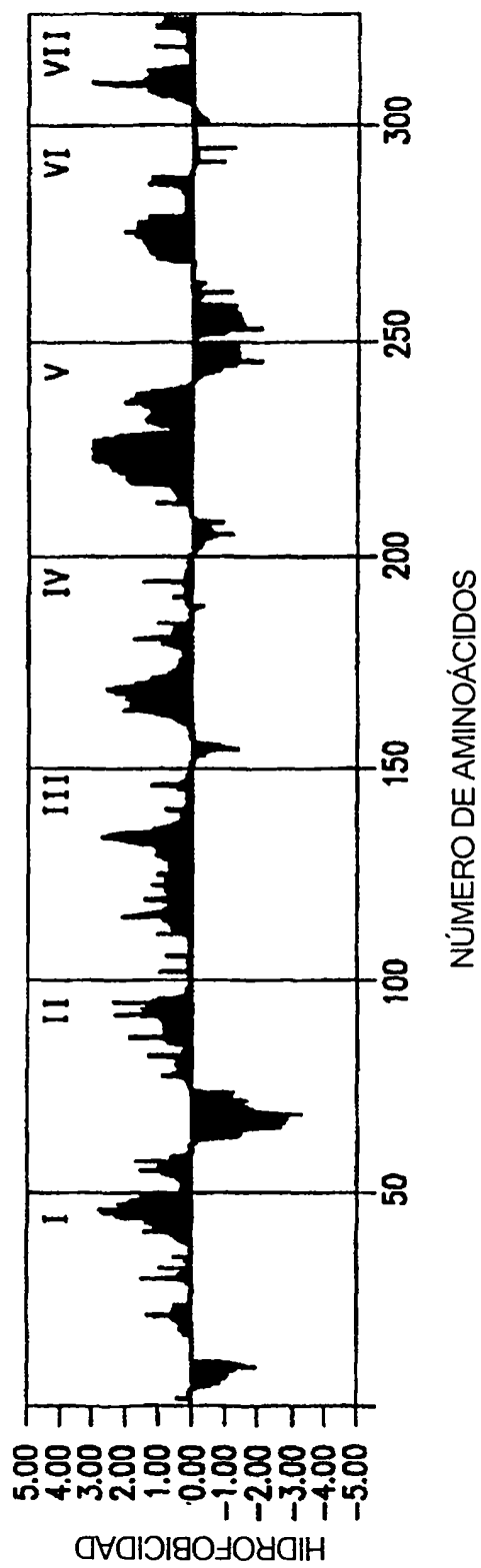


FIG. 4A

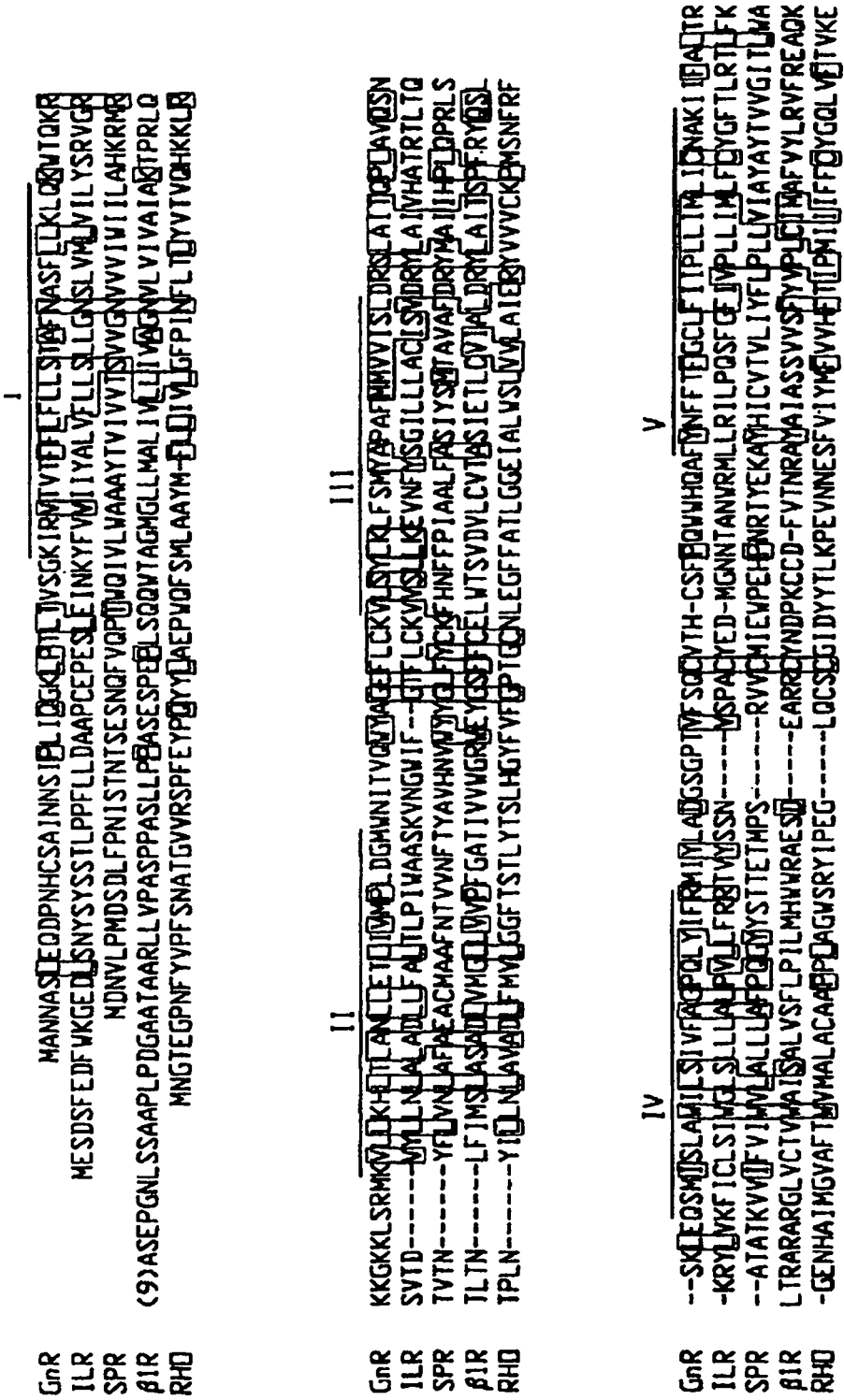


FIG.4B

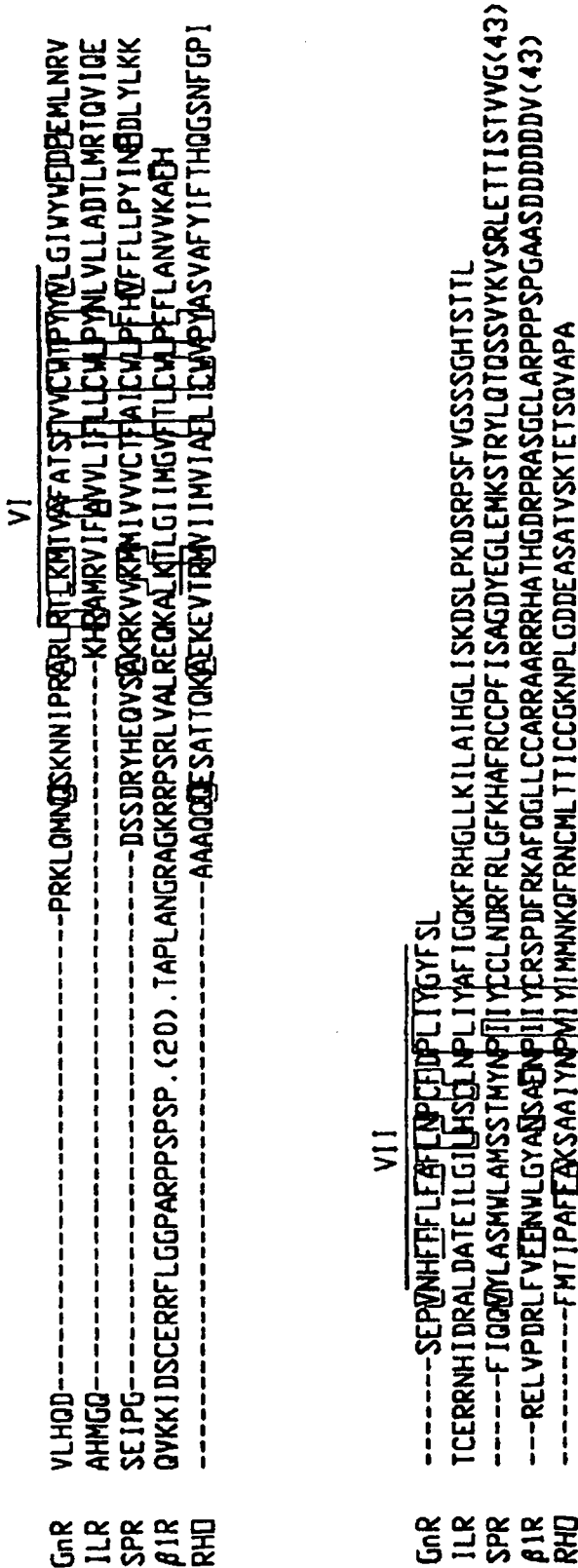
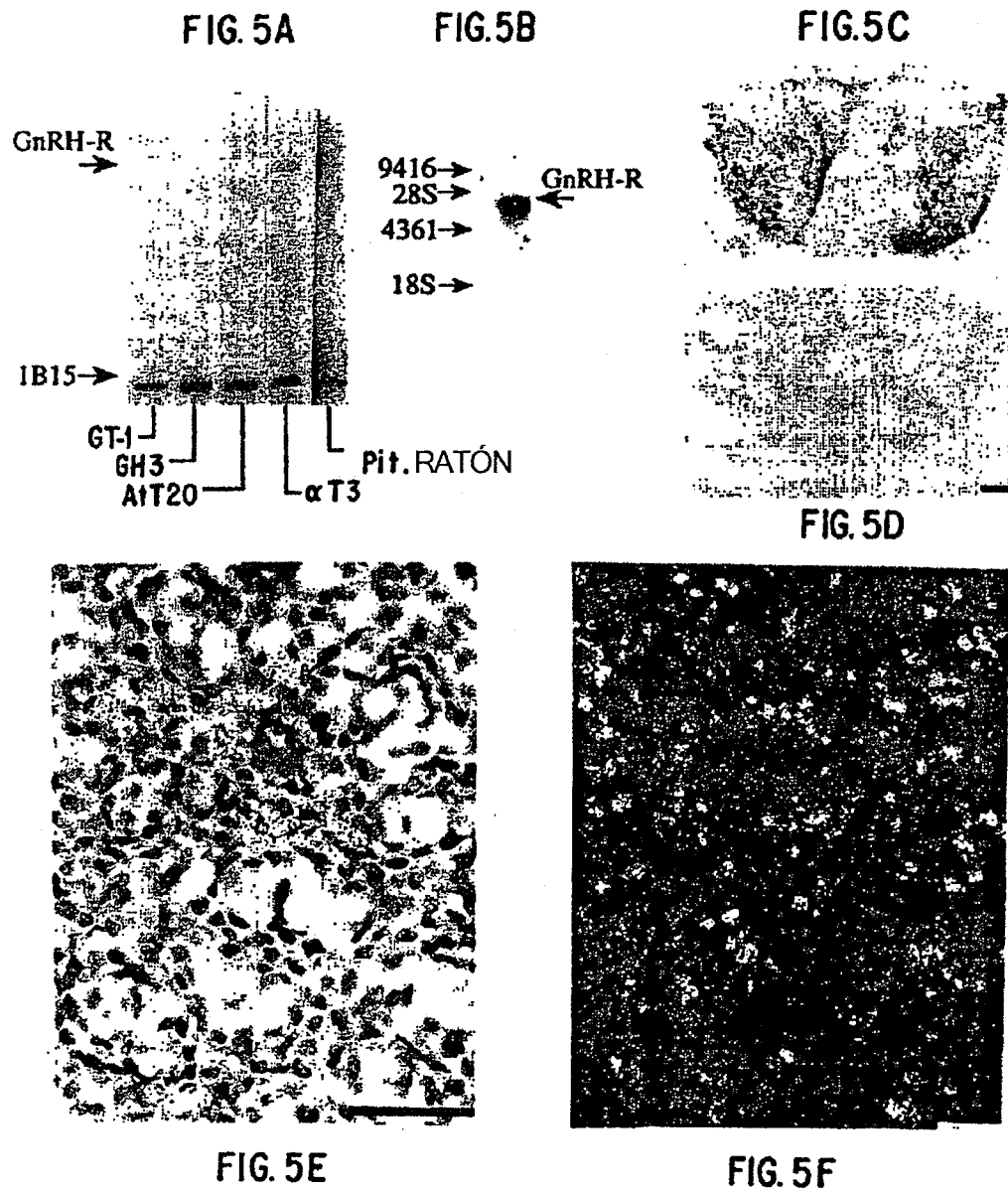


FIG.4C



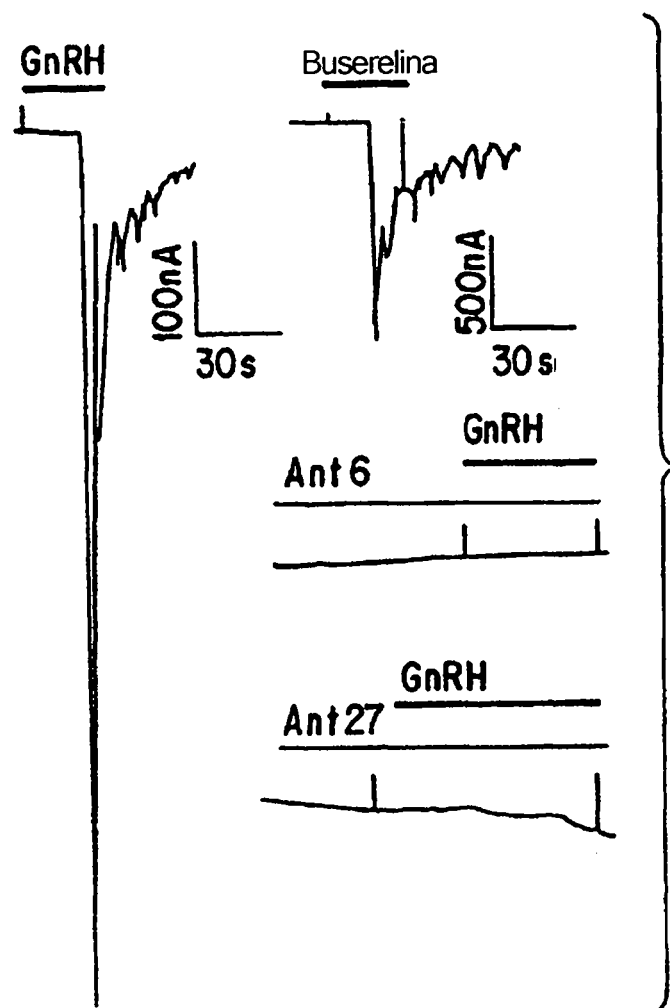


FIG. 6

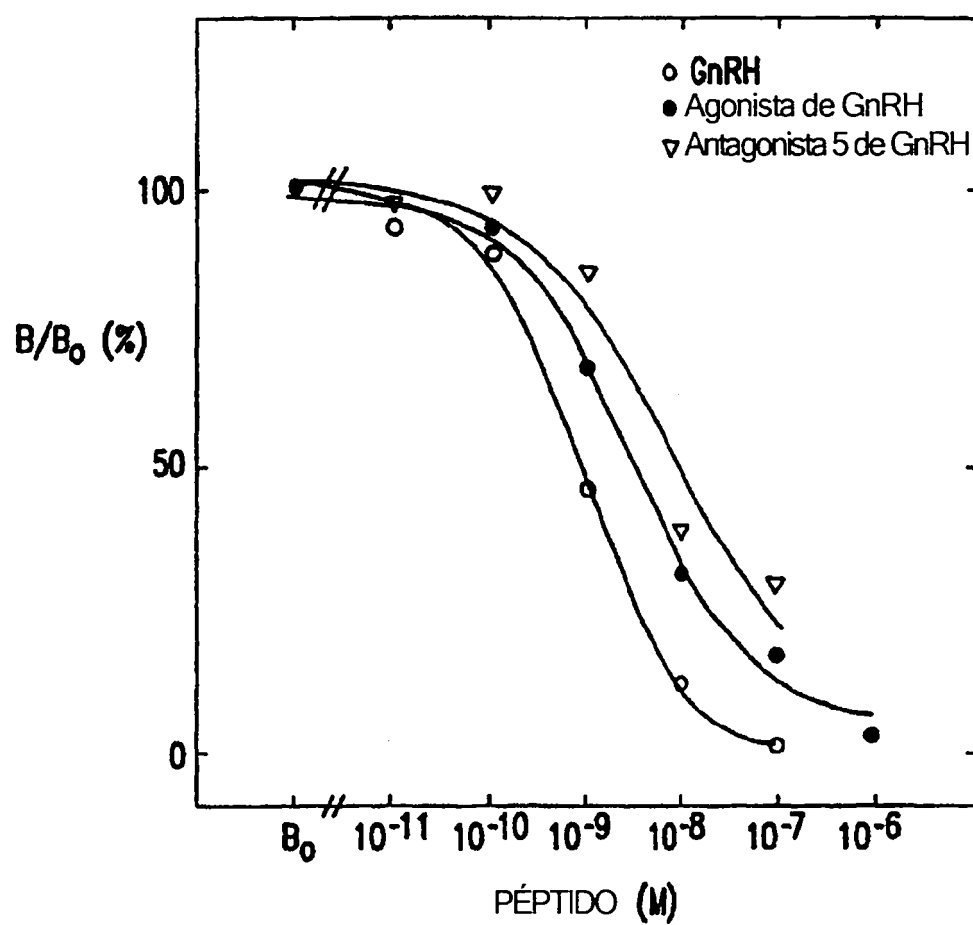


FIG.7

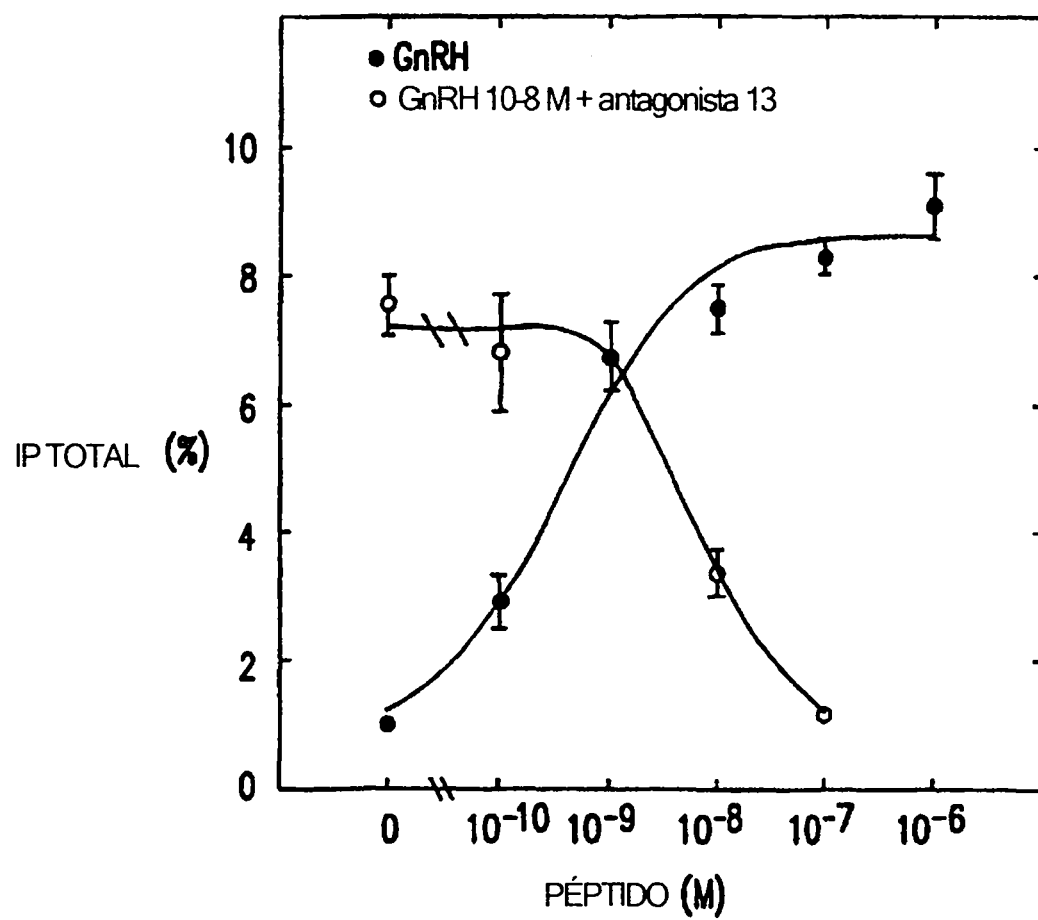


FIG.8

CGGAGCCTTGTCCTGGGAAAT -1
 ATGGCAAACAGTGCCTCTCCTGAACAGAATCAAAATCACTGTTCAAGCATCAACAACAGC 60
 M A N S A S P E Q N Q N H C S A I N N S 20
 ATCCCACTGATGCAGGGCAACCTCCCCACTCTGACCTTGCTGGAAGATCCGAGTGAAG 120
 I P L M Q G N L P T L T L S G K I R V T 40
 GTTACTTTCTTCCTTTTCTGCTCTCTGGACCTTTAATGCTTCTTTCTTGTGAAACTT 180
 V T F F L F L L S A T F N A S F L L K L 60
 CAGAAGTGGACACAGAAGAAAGAGAAAGGAAAAAGCTCTCAAGAATGAAGCTCCTCTTA 240
 Q K W T Q K K E K G K K L S R M K L L L 80
 AAACATCTGACCTTAGCCAACCTGTTGGAGACTCTGATTGTATGCCACTGGATGGGATG 300
 K H L T L A N L L E T L I V M P L D G M 100
 TGGAACATTACAGTCCAATGGTATGCTGGAGAGTTACTCTGCAAAGTTCTCAGTTATCTA 360
 W N I T V Q W Y A G E L L C K V L S Y L 120
 AAGCTTTTCTCCATGTATGCCCCAGCCTTCATGATGGTGGTGATCAGCCTGGACCGCTCC 420
 K L F S M Y A P A F M M V V I S L D R S 140
 CTGGCTATCAGGAGCCCCCTAGCTTTGAAAAGCAACAGCAAAGTGGACAGTCCATGGTT 480
 L A I T R P L A L K S N S K V G Q S M V 160
 GGCCTGGCCTGGATCCTCAGTAGTGCTTTGTCAGGACCACAGTTATACATCTTCAGGATG 540
 G L A W I L S S V F A G P Q L Y I F R M 180
 ATTCACTAGCAGACAGCTCTGGACAGACAAAAGTTTTCTCTCAATGTGTAACACACTGC 600
 I H L A D S S G Q T K V F S Q C V T H C 200
 AGTTTTTCACAAATGGTGGCATCAAGCATTTTATAACTTTTTACCTTCAGCTGCCTCTTC 660
 S F S Q W W H Q A F Y N F F T F S C L F 220
 ATCATCCCTCTTTTCATCATGCTGATCTGCAATGCAAAAATCATCTTCACCTGACACGG 720
 I I P L F I M L I C N A K I I F T L T R 240
 GTCCTTCATCAGGACCCCCACGAACCTACAACGAATCAGTCCAAGAACAATATACCAAGA 780
 V L H Q D P H E L Q L N Q S K N N I P R 260
 GCAOCCCTGAAGACTCTAAAAATGACGGTTGCATTGGCACTTCATTACTGTCTGCTGG 840
 A R L K T L K M T V A F A T S F T V C W 280
 ACTCCCTACTATGCTCTAGGAATTTGGTATTGGTTTGATCCTGAAATGTTAAACAGGTTG 900
 T P Y Y V L G I W Y W F D P E M L N R L 300
 TCAGACCCAGTAAATCACTTCTTTCTTTTGCCTTTTTAAACCATGCTTTGATCCA 960
 S D P V N H F F F L F A F L N P C F D P 320
 CTTATCTATGGATATTTTCTCTGTGATTGATAGACTACACAAGAAGTCATATGAAGAAG 1020
 L I Y G Y F S L * 328
 GGTAAGGTAATGAATCTCTCCATCTGGGAATGATTAACACAAATGTTGGAGCATGTTTAC 1080
 ATACAAACAAAGTAGGATTTACACTTAAGTTATCATTCTTTTAAAGTCACTCTTCAGA 1140
 GCCTCAATTATTAAGGAAAAGTCTTCAGGAAAAATACTAAAATATTTTCTCTTCCTCATA 1200
 AGCTTCTAAATTAATCTCTGCCTTTTCTGACCTCATATAACACATTATGTAGGTTTCTTA 1260

FIG.9A

TCACTTTCTCTTTCATAATAATGTACTAATATTTAAAATACCTTCAGCCTAAGGCACAA	1320
GGATGCCAAAAAACAAGGTGAGAACCACACACAGGTCTAACTCAGCATGCTTGGT	1380
GAGTTTTCTCCAAAGGGGCATATTAGCAATTAGAGTTGTATGCTATATAATACATAGAG	1440
CACAGAGCCCTTTGCCATAATATCAACTTTCCTCCTATAGTTAAAAGAAAAAAAAT	1500
GAATCTATTTTTCTCTTTGGCTTCAAAGCATTCTGACATTTGGAGGAGTCAGTAACCAA	1560
TCCACCAACCACTCCAGCAACCTGACAAGACTATGAGTAGTTCTCCTTCATCCTATTTA	1620
TGTGGTACAGGTTGTGAAGTATCTCTATATAAAGGGAAATTTAGAGGGGTTAGGATTTG	1680
GACAGGGGTTTAGAACATTCCCTTAAGCTATCTAGTCTGTGGAGTTTGTGGCAATTAATT	1740
GCCATAAAATAACATGTTTCCAAATGCAACTAAGAAAATACTCATAGTGAGTAGGCTCTA	1800
TGCATAGTATGACTTCTATTTAATGTGAAGAATTTTTGTCTCTCCTGATCTTACTAA	1860
ATCCATATTTCATAAATGAAGTGAATAATTAACAAAATTAAGCAATGCACAAGCAAA	1920
AGATGCTTGATACACAAAAGGAAGTCTGGAGAGAAAAGTACAGCTTCAGTCTGTACAGAT	1980
CAAAGAAGACAGAACATGTCAGGGGAAGGAGGAAAGATCTTGATGCAGGGTTTCTTAACC	2040
TGCAGTCTATGCCAACACTATATTTCCATGTAATGTTTTATTTACGCCCTATTTGTAT	2100
TATTTGTGCATTTAAAAACACAATCTTAAGGCCG	2136

FIG.9B

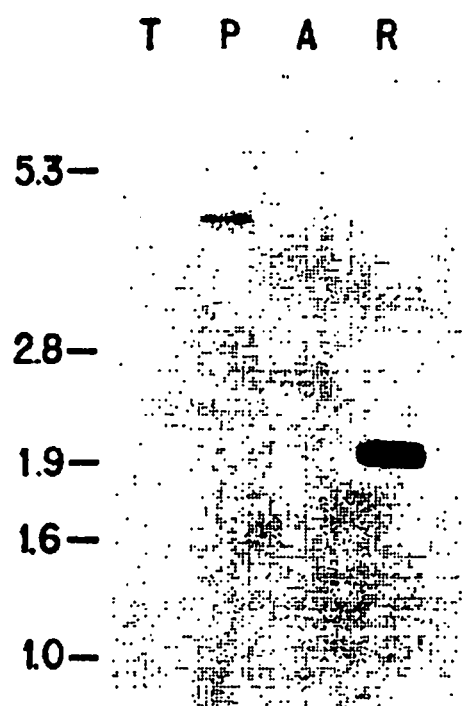
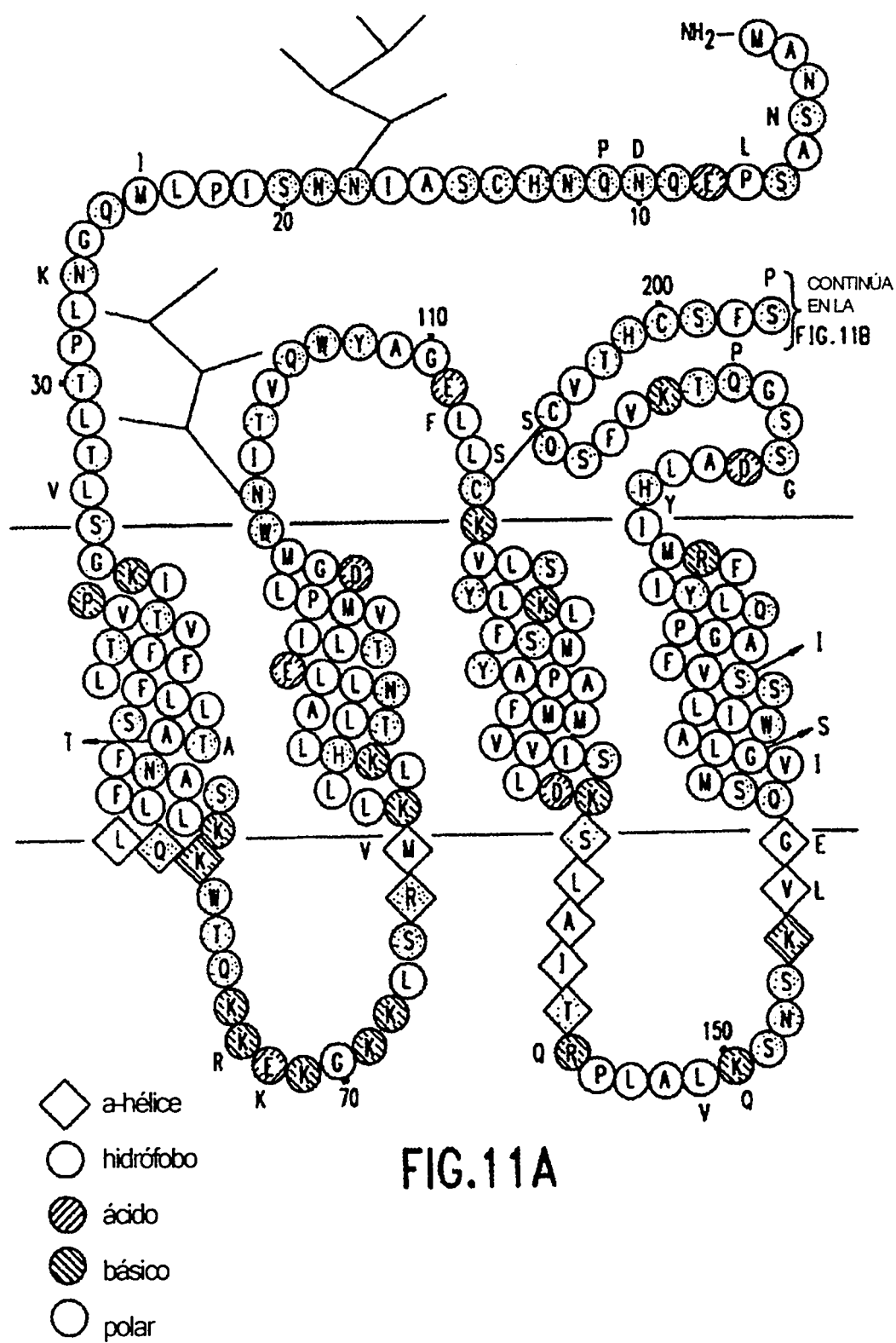
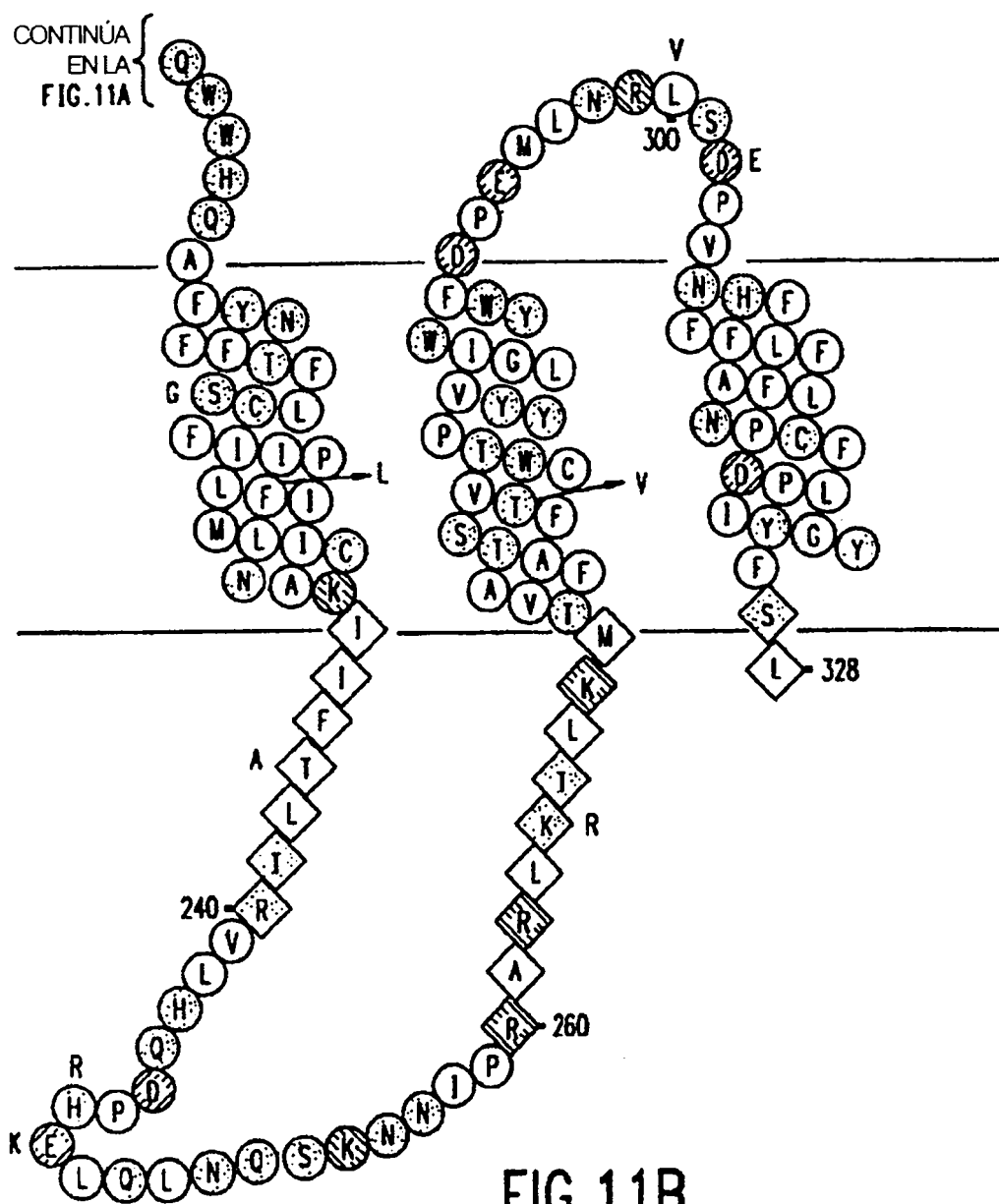


FIG. 10





LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Sealfon, Stuart C.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Clonación y expresión del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- (A) DESTINATARIO: Pennie y Edmons
- (B) CALLE: 1155 Avenue of Americas
- 15 (C) CIUDAD: Nueva York
- (D) ESTADO: Nueva York
- (E) PAÍS: EE.UU.
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 10036-2711
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- 25 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1, versión nº 1,25.
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: pendiente de asignación
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 21 de junio de 1993
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN ABOGADO/AGENTE
- (A) NOMBRE: Misrock, S. Leslie
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 18.872
- 40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 6923-035
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: 212 790-9090
- 45 (B) TELEFAX: 212 869-8864/9741
- (C) TÉLEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº 1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1227 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 55 (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 60 (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 43..1023
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 1:

ES 2 229 208 T3

	CACGAGAGGG ACTCCACTCT TGARGCCTGT CCTTGGAGAA AT ATG GCT AAC AAT Met Ala Asn Asn 1	54
5	GCA TCT CTT GAG CAG GAC CCA AAT CAC TGC TCG GCC ATC AAC AAC AGC Ala Ser Leu Glu Gln Asp Pro Asn His Cys Ser Ala Ile Asn Asn Ser 5 10 15 20	102
10	ATC CCC TTG ATA CAG GGC AAG CTC CCG ACT CTA ACC GTA TCT GGA AAG Ile Pro Leu Ile Gln Gly Lys Leu Pro Thr Leu Thr Val Ser Gly Lys 25 30 35	150
	ATC CGA GTG ACC GTG ACT TTC TTC CTT TTC CTA CTC TCT ACT GCC TTC Ile Arg Val Thr Val Thr Phe Phe Leu Phe Leu Leu Ser Thr Ala Phe 40 45 50	198
15	AAT GCT TCC TTC TTG TTG AAG CTG CAG AAG TGG ACT CAG AAG AGG AAG Asn Ala Ser Phe Leu Leu Lys Leu Gln Lys Trp Thr Gln Lys Arg Lys 55 60 65	246
20	AAA GGA AAA AAG CTC TCA AGG ATG AAG GTG CTT TTA AAG CAT TTG ACC Lys Gly Lys Lys Leu Ser Arg Met Lys Val Leu Leu Lys His Leu Thr 70 75 80	294
	TTA GCC AAC CTG CTG GAG ACT CTG ATC GTC ATC CCA CTG GAT GGG ATG Leu Ala Asn Leu Leu Glu Thr Leu Ile Val Met Pro Leu Asp Gly Met 85 90 95 100	342
25	TGG AAT ATT ACT CTT CAG TGG TAT GCT GGG GAG TTC CTC TGC AAA GTT Trp Asn Ile Thr Val Gln Trp Tyr Ala Gly Glu Phe Leu Cys Lys Val 105 110 115	390
30	CTC AGC TAT CTG AAG CTC TTC TCT ATG TAT GCC CCA GCT TTC ATG ATG Leu Ser Tyr Leu Lys Leu Phe Ser Met Tyr Ala Pro Ala Phe Met Met 120 125 130	438
	GTG GTG ATT AGC CTG GAC CGC TCC CTG GCC ATC ACT CAG CCC CTT GCT Val Val Ile Ser Leu Asp Arg Ser Leu Ala Ile Thr Gln Pro Leu Ala 135 140 145	486
35	GTA CAA AGC AAC AGC AAG CTT GAA CAG TCT ATG ATC AGC CTG GCC TGG Val Gln Ser Asn Ser Lys Leu Glu Gln Ser Met Ile Ser Leu Ala Trp 150 155 160	534
40	ATT CTC AGC ATT GTC TTT GCA GGA CCA CAG TTA TAT ATC TTC AGG ATG Ile Leu Ser Ile Val Phe Ala Gly Pro Gln Leu Tyr Ile Phe Arg Met 165 170 175 180	582
	ATC TAC CTA GCA GAC GGC TCT GGG CCC ACA CTC TTC TCG CAA TGT GTG Ile Tyr Leu Ala Asp Gly Ser Gly Pro Thr Val Phe Ser Gln Cys Val 185 190 195	630
45	ACC CAC TGC AGC TTT CCA CAG TGG TGG CAT CAG GCC TTC TAC AAC TTT Thr His Cys Ser Phe Pro Gln Trp Trp His Gln Ala Phe Tyr Asn Phe 200 205 210	678
50	TTC ACC TTC GGC TGC CTC TTC ATC ATC CCC CTC CTC ATC ATG CTA ATC Phe Thr Phe Gly Cys Leu Phe Ile Ile Pro Leu Leu Ile Met Leu Ile 215 220 225	726
	TGC AAT GCC AAA ATC ATC TTT GCT CTC ACG CGA GTC CTT CAT CAA GAC Cys Asn Ala Lys Ile Ile Phe Ala Leu Thr Arg Val Leu His Gln Asp 230 235 240	774
55	CCA CGC AAA CTA CAG ATG AAT CAG TCC AAG AAT AAT ATC CCA AGA GCT Pro Arg Lys Leu Gln Met Asn Gln Ser Lys Asn Asn Ile Pro Arg Ala 245 250 255 260	822
60	CGG CTG AGA ACG CTA AAG ATG ACA GTC GCA TTC GCT ACC TCC TTT GTC Arg Leu Arg Thr Leu Lys Met Thr Val Ala Phe Ala Thr Ser Phe Val 265 270 275	870
65	GTC TGC TGC ACT CCC TAC TAT GTC CTA GGC ATT TGG TAC TGG TTT CAT Val Cys Trp Thr Pro Tyr Tyr Val Leu Gly Ile Trp Tyr Trp Phe Asp 280 285 290	918

ES 2 229 208 T3

	CCA GAA ATG TTG AAC AGG GTG TCA GAG CCA GTG AAT CAC TTT TTC TTT	966
	Pro Glu Met Leu Asn Arg Val Ser Glu Pro Val Asn His Phe Phe Phe	
	295 300 305	
5	CTC TTT GCT TTC CTA AAC CCG TGC TTC GAC CCA CTC ATA TAT GGG TAT	1014
	Leu Phe Ala Phe Leu Asn Pro Cys Phe Asp Pro Leu Ile Tyr Gly Tyr	
	310 315 320	
10	TTC TCT TTG TAGTTGGGAG ACTACACAAG AACTCAGATA GAAATAAGGT	1063
	Phe Ser Leu	
	325	
	AACTAATTGC ACCAATTGAG AATAAACTCA AAGCTTTTGA CACACTTATA TACAAGGCAG	1123
	GGTTTAAGGT TAGATTATCA ACCTTGTTTT TGTACAGAGT TTGTTGTTAG AGCTTCAGAA	1183
15	GACCTTCAAA AACAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAA	1227

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 2:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 327 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 2:

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

ES 2 229 208 T3

[illegible]

²⁵ (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2160 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: doble
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 25..1008

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 3:

45	CGGAGCCTTG	TGCTCTGGGA	AAAT	ATG	GCA	AAC	AGT	GCC	TCT	CCT	GAA	CAG	51				
				Met	Ala	Asn	Ser	Ala	Ser	Pro	Glu	Gln					
				1				5									
	AAT	CAA	AAT	CAC	TGT	TCA	GCC	ATC	AAC	AAC	AGC	ATC	CCA	CTG	ATG	CAG	99
	Asn	Gln	Asn	His	Cys	Ser	Ala	Ile	Asn	Asn	Ser	Ile	Pro	Leu	Met	Gln	
50	10					15					20					25	
	GGC	AAC	CTC	CCC	ACT	CTG	ACC	TTG	TCT	GGA	AAG	ATC	GGA	GTG	ACG	GTT	147
	Gly	Asn	Leu	Pro	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Lys	Ile	Arg	Val	Thr	Val	
					30					35					40		
	ACT	TTC	TTC	CTT	TTT	CTG	CTC	TCT	GCG	ACC	TTT	AAT	GCT	TCT	TTC	TTG	195
55	Thr	Phe	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Thr	Phe	Asn	Ala	Ser	Phe	Leu	
				45					50					55			
	TTG	AAA	CTT	CAG	AAG	TGG	ACA	CAG	AAG	AAA	GAG	AAA	GCG	AAA	AAG	CTC	243
	Leu	Lys	Leu	Gln	Lys	Trp	Thr	Gln	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	
60			60					65					70				
	TCA	AGA	ATG	AAG	CTG	CTC	TTA	AAA	CAT	CTG	ACC	TTA	GCC	AAC	CTG	TTG	291
	Ser	Arg	Met	Lys	Leu	Leu	Leu	Lys	His	Leu	Thr	Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	
		75					80					85					

ES 2 229 208 T3

	GAG ACT CTG ATT GTC ATG CCA CTG GAT GGG ATG TGG AAC ATT ACA GTC	339
	Glu Thr Leu Ile Val Met Pro Leu Asp Gly Met Trp Asn Ile Thr Val	
	90 95 100 105	
5	CAA TGG TAT GCT GGA GAG TTA CTC TGC AAA GTT CTC AGT TAT CTA AAG	387
	Gln Trp Tyr Ala Gly Glu Leu Leu Cys Lys Val Leu Ser Tyr Leu Lys	
	110 115 120	
10	CTT TTC TCC ATG TAT GCC CCA GCC TTC ATG ATG GTG GTG ATC AGC CTG	435
	Leu Phe Ser Met Tyr Ala Pro Ala Phe Met Met Val Val Ile Ser Leu	
	125 130 135	
	GAC CGC TCC CTG GCT ATC ACG AGG CCC CTA GCT TTG AAA ACC AAC ACC	483
	Asp Arg Ser Leu Ala Ile Thr Arg Pro Leu Ala Leu Lys Ser Asn Ser	
	140 145 150	
15	AAA GTC GGA CAG TCC ATG GTT GGC CTG GCC TGG ATC CTC AGT AGT GTC	531
	Lys Val Gly Gln Ser Met Val Gly Leu Ala Trp Ile Leu Ser Ser Val	
	155 160 165	
20	TTT GCA GGA CCA CAG TTA TAC ATC TTC AGG ATG ATT CAT CTA GCA GAC	579
	Phe Ala Gly Pro Gln Leu Tyr Ile Phe Arg Met Ile His Leu Ala Asp	
	170 175 180 185	
	AGC TCT GGA CAG ACA AAA GTT TTC TCT CAA TGT GTA ACA CAC TGC AGT	627
	Ser Ser Gly Gln Thr Lys Val Phe Ser Gln Cys Val Thr His Cys Ser	
	190 195 200	
25	TTT TCA CAA TGG TGG CAT CAA GCA TTT TAT AAC TTT TTC ACC TTC AGC	675
	Phe Ser Gln Trp Trp His Gln Ala Phe Tyr Asn Phe Phe Thr Phe Ser	
	205 210 215	
30	TGC CTC TTC ATC ATC CCT CTT TTC ATC ATG CTG ATC TGC AAT GCA AAA	723
	Cys Leu Phe Ile Ile Pro Leu Phe Ile Met Leu Ile Cys Asn Ala Lys	
	220 225 230	
	ATC ATC TTC ACC CTG ACA CGG GTC CTT CAT CAG GAC CCC CAC GAA CTA	771
	Ile Ile Phe Thr Leu Thr Arg Val Leu His Gln Asp Pro His Glu Leu	
	235 240 245	
35	CAA CTG AAT CAG TCC AAG AAC AAT ATA CCA AGA GCA CGG CTG AAG ACT	819
	Gln Leu Asn Gln Ser Lys Asn Asn Ile Pro Arg Ala Arg Leu Lys Thr	
	250 255 260 265	
40	CTA AAA ATG ACG GTT GCA TTT GCC ACT TCA TTT ACT GTC TGC TGG ACT	867
	Leu Lys Met Thr Val Ala Phe Ala Thr Ser Phe Thr Val Cys Trp Thr	
	270 275 280	
	CCC TAC TAT GTC CTA GGA ATT TGG TAT TGG TTT GAT CCT GAA ATG TTA	915
	Pro Tyr Tyr Val Leu Gly Ile Trp Tyr Trp Phe Asp Pro Glu Met Leu	
	285 290 295	
45	AAC AGG TTG TCA GAC CCA GTA AAT CAC TTC TTC TTT CTC TTT GCC TTT	963
	Asn Arg Leu Ser Asp Pro Val Asn His Phe Phe Phe Leu Phe Ala Phe	
	300 305 310	
50	TTA AAC CCA TGC TTT GAT CCA CTT ATC TAT GGA TAT TTT TCT CTG	1008
	Leu Asn Pro Cys Phe Asp Pro Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Ser Leu	
	315 320 325	
55	TGATTGATAG ACTACACAAG AAGTCATATG AAGAAGGGTA AGGTAAATGAA TCTCTCCATC	1068
	TGGGAATGAT TAACACAAAT GTTGGAGCAT GTTTACATAC AAACAAAGTA GGATTTACAC	1128
	TTAAGTTATC ATTCTTTTATG AAACCTCAGTC TTCAGAGCCT CAATTATTAA GGAAAAGTCT	1188
60	TCAGGAAAAA TACTAAAAATA TTTTCTCTTC CTCATAAGCT TCTAAATTAA TCTCTGCCTT	1248
65		

ES 2 229 208 T3

TTCTGACCTC ATATAACACA TTATGTAGGT TTCTTATCAC TTTCTCTTTG CATAATAATG 1308
 TACTAATATT TAAATACCT TCAGCCTAAG GCACAAGGAT GCCAAAAAA CAAAGGTCAG 1368
 5 AACCACAAAC ACAGGTCTAA ACTCAGCATG CTTGGTGAGT TTTTCTCCAA AGGGGCATAT 1428
 TAGCAATTAG AGTTGTATGC TATATAATAC ATAGAGCACA GAGCCCTTTG CCCATAATAT 1488
 CAACTTTCCC TCCTATAGTT AAAAAGAAAA AAAAATGAAT CTATTTTCTT CTTTGGCTTC 1548
 10 AAAAGCATTG TGACATTTGG AGGAGTCAGT AACCAATCCC ACCAACCACT CCAGCAACCT 1608
 GACAAGACTA TGAGTAGTTC TCCTTCATCC TATTTATGTG GTACAGGTTG TGAAGTATCT 1668
 CTATATAAAG GGAATTTTA GAGGGGTTAG GATTGGACA GGGGTTTGA ACATTCCTCT 1728
 15 AAGCTATCTA GTCTGTGGAG TTTGTGGCAA TTAATTGCCA TAAATAACA TGTTCCTCAA 1788
 TGCAACTAAG AAAATACTCA TAGTGAGTAC GCTCTATGCA TAGTATGACT TCTATTTAAT 1848
 GTGAAGAATT TTTTGTCTCT CTCTGATCT TACTAAATCC ATATTTTATA AATGAAGTGA 1908
 GAATAATTAA CAAATTAAG CAAATGCACA AGCAAAAGAT GCTTGATACA CAAAGGAAC 1968
 TCTGGAGAGA AAATACAGC TTCAGTCTGT ACAGATCAAA GAGACAGAA CATGTCAGGG 2028
 20 GAAGGAGGAA AGATCTTGAT GCAGGGTTTC TTAACCTGCA GTCTATGCAC AACACTATAT 2088
 TTCCATGTAA TGTTTTATT TCAGCCCTAT TTGTATTATT TTGTGCATT AAAAACACA 2148
 ATCTTAAGGC CG 2160
 30

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N° 4:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 328 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 40 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 4:
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 229 208 T3

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