



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 317**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01) **A61K 31/70** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00951509 .9**

96 Fecha de presentación : **08.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1222265**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.07.2002**

54

Título: **Nueva subunidad del receptor nicotínico de la acetilcolina, su aislamiento y su uso.**

30

Prioridad: **29.09.1999 EP 99402371**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

73

Titular/es: **SANOFI-AVENTIS**
174, avenue de France
75013 Paris, FR

72

Inventor/es: **Besnard, François;**
Charpantier, Eric y
Sgard, Frédéric

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 317 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nueva subunidad del receptor nicotínico de la acetilcolina, su aislamiento y su uso.

5 La invención se refiere a polinucleótidos identificados recientemente, a polipéptidos codificados por ellos y al uso de tales polinucleótidos y polipéptidos. La invención se refiere también a la producción de los mismos. Más particularmente, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención se refieren a un nuevo miembro de la familia de receptores nicotínicos de acetilcolina, de aquí en adelante denominado HNARA10. La invención se refiere también a la inhibición o activación de la acción de tales polinucleótidos y polipéptidos.

10 Los receptores nicotínicos de acetilcolina (los nAChR) son miembros de la familia del canal iónico dependiente de ligando que comprende también los receptores GABA_A, de glicina y 5-HT₃ (Bamard, E. (1992) TIBS 17, 368-374). Se cree que estos receptores se forman por la asociación de cinco subunidades homólogas orientadas alrededor de un canal catiónico, determinando el dominio extracelular N-terminal de cada subunidad los sitios naturales de unión al ligando (Galzi, J.-L. & Changeux, J. -P. (1995) Neuropharmacol. 34 (6), 563-582). Véase también el documento WO 96/03504 que describe ácidos nucleicos aislados que codifican la subunidad alfa9 de nAChR. Este dominio extracelular, así como otras partes del receptor, puede ser también el objetivo de muchos ligandos naturales y sintéticos capaces de modular la actividad del receptor (Williams, M. *et al.* (1994) Drugs News Perspect. 7, 205-223). Estos nAChR forman uno de los receptores neurotransmisores excitatorios predominantes sobre los músculos y nervios del sistema nervioso periférico y están expresados también en las neuronas por todo el sistema nervioso central. En adición, también se han descrito los mismos en células no excitatorias tales como linfocitos o queratinocitos. Los nAChR se asocian con un gran número de enfermedades (Lindstrom, J. (1997) Mol. Neurobiol. 15 (2), 193-222). Varias respuestas autoinmunes a los nAChR de los músculos pueden causar parálisis muscular. Se ha demostrado que mutaciones en los nAChR neuronales causan la epilepsia y se ha sugerido que defectos genéticos de algunos nAChR pueden ser responsables de la esquizofrenia. Se ha detectado también una importante pérdida de los nAChR en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Los nAChR median también en el efecto adictivo de la nicotina. Además, se ha publicado que la nicotina tiene un efecto beneficioso sobre los pacientes con la enfermedad de Tourette y varios estudios sugieren también que los agonistas nicotínicos pueden tener efectos neuroprotectores. Los agonistas nicotínicos tienen también efectos analgésicos y se ha demostrado que los anestésicos pueden actuar también sobre los nAChR. La nicotina puede modular también el ritmo cardíaco y la tensión arterial a través de los nAChR neuronales y se ha demostrado también que es un agente mitógeno que podría estimular ciertas formas de cáncer.

35 Esto indica que estos receptores tienen una historia establecida y probada como dianas terapéuticas. Existe claramente la necesidad de identificación y caracterización de otros receptores que puedan desempeñar un papel en la prevención, alivio o corrección de disfunciones o enfermedades, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la enfermedad de Alzheimer, trastornos de la memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad neuronal degenerativa, ictus y trastorno del apetito, acúfenos y disfunción auditiva, y en la producción de analgesia o anestesia.

40 En un aspecto, la descripción se refiere a polipéptidos y polinucleótidos del "Nombre del receptor" y a materiales y métodos recombinantes para su producción. Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos para utilizar tales polipéptidos y polinucleótidos HNARA10 en asociación con otras subunidades de la familia de los receptores nicotínicos de acetilcolina, por ejemplo en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de la motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad neuronal degenerativa, ictus o trastornos del apetito, acúfenos y disfunción auditiva y en la producción de analgesia o anestesia, entre otros. En otro aspecto más, la descripción se refiere a métodos para identificar agonistas y antagonistas que utilizan los materiales proporcionados por la invención, y condiciones de tratamiento asociadas con el uso de tales compuestos. Otro aspecto más de la descripción se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas con actividad o niveles inapropiados de HNARA10.

55 En particular, la invención se refiere a un método para identificar agonistas (y antagonistas respectivamente) del receptor nicotínico de acetilcolina alfa9/alfa10 que comprende poner en contacto una célula hospedante modificada con un compuesto candidato; y determinar si el compuesto candidato tiene o no algún efecto sobre una señal generada por activación del receptor alfa9/alfa10 (determinando respectivamente si la señal generada por dicho agonista disminuye o no en presencia de un compuesto candidato); en el que la célula hospedante modificada contiene un sistema de expresión que comprende una molécula de DNA o RNA que constituye un vector recombinante, que comprende un sistema de expresión que es capaz de producir un polipéptido HNARA10 y un polipéptido alfa9 cuando dicho sistema de expresión está presente en una célula hospedante compatible, y en el que el sistema de expresión que es capaz de producir un polipéptido HNARA10 comprende:

- (a) la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1;
- 65 (b) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 presentada en la SEQ ID NO: 2;
- (c) la secuencia nucleotídica que comprende la secuencia localizada entre los nucleótidos números 43 a 1392 presentada en la SEQ ID NO: 1;

ES 2 358 317 T3

(d) la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos desde aproximadamente 179 hasta aproximadamente 196 presentada en la SEQ ID NO: 2;

5 (e) la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos desde aproximadamente 357 hasta aproximadamente 374 presentada en la SEQ ID NO: 2;

(f) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 expresada por el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315;

10 (g) una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse con la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1 o con el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315;

(h) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 maduro expresada por el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315; o

15 (i) una secuencia nucleotídica complementaria de cualquiera de las secuencias nucleotídicas definidas en los puntos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) o (h) anteriores, así como fragmentos, variantes, derivados y formas mutadas de estas secuencias nucleotídicas.

20 En una realización, la secuencia nucleotídica tiene al menos un 80% de identidad con la contenida en la SEQ ID NO: 1.

25 En otra realización, la secuencia nucleotídica es el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1.

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por el cDNA de HNARA10. La escisión del péptido señal se predice entre las posiciones de aminoácidos 24 y 25 (utilizando el software de análisis SignalP versión 1,1, CBS) y la secuencia del péptido señal prevista está subrayada con una línea de puntos. Las regiones previstas que se extienden en la membrana (MSR I-IV) (utilizando el software de análisis TMHMM versión 1.0, CBS) están subrayadas con una línea sólida. Los asteriscos indican residuos de cisteína en las posiciones 154, 168, 218 y 219 conservados en todas las subunidades alfa de nAChR.

30 La Figura 2 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de HNARA10 con un nAChR conocido, la secuencia de proteína alfa 9 de rata, utilizando el software MEGALIGN (versión 3.13) de DNASTAR con el algoritmo de Jotun-Hein.

35 La Figura 3 muestra un dendrograma que ilustra la relación entre la proteína HNARA10 y las subunidades de nAChR de otros vertebrados. La longitud de cada par de ramas representa la distancia entre pares de secuencias. Se realizó el alineamiento utilizando el algoritmo CLÚSTAL de MEGALIGN (versión 3.13) de DNASTAR.

40 La Figura 4 muestra la localización cromosómica (indicada por la flecha) del gen HNARA10 humano determinada mediante hibridación fluorescente *in situ*.

45 La Figura 5 ilustra la clonación del cDNA de HNARA10 de longitud completa.

La Figura 6 (a & b) muestra la distribución del mRNA de HNARA10 en tejidos humanos determinada por un *dot blot* Master (Clontech) hibridado con una sonda de cDNA de HNARA10. En la figura 6a, la señal de hibridación fuerte corresponde a mRNA de músculo esquelético humano. En la cuantificación de la señal mostrada en la figura 6b, las señales que aparecen en negro están apenas por encima del ruido de fondo y no son significativas.

50 La Figura 7 muestra la distribución del mRNA de HNARA10 en tejidos humanos determinada por blot MTNTM hibridado con una sonda de cDNA de HNARA10. El transcrito de 6,4 kb específicamente marcado está indicado por la flecha.

55 La Figura 8 (A, B y C) muestra la respuesta inducida por acetilcolina obtenida con oocitos de *Xenopus laevis* inyectados con los cDNA humanos de las subunidades alfa 9 y HNARA10 de nAChR. La corriente registrada, como se muestra en la figura 8A, corresponde a la obtenida con la subunidad $\alpha 9$ sola mientras que la corriente mostrada en la figura 8B corresponde a la co-expresión de las subunidades $\alpha 9$ y HNARA10. Las amplitudes medias de la corriente obtenidas con acetilcolina (ACh) 30 μ M sobre los oocitos inyectados con los cDNA de $\alpha 9$, $\alpha 9$ +HNARA₁₀ y HNARA10 se muestran en la figura 8C. Las amplitudes de la corriente se expresan en nano-amperios (nA).

60 Se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de ciertos términos usados frecuentemente en esta memoria.

65 “HNARA10” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 2, o una variante alélica del mismo, así como otras variantes que se describen adicionalmente más adelante.

ES 2 358 317 T3

“Actividad de HNARA10” o “Actividad biológica de HNARA10” se refiere a la función metabólica o fisiológica de dicho HNARA10 incluyendo actividades similares o mejoradas o estas actividades con disminución de efectos secundarios indeseables. Se incluyen también las actividades antigénicas e inmunógenas de dicho HNARA10.

5 “Gen HNARA10” se refiere a un polinucleótido que comprende la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1 o variantes alélicas del mismo y/o sus complementos como se describen en la siguiente memoria descriptiva.

10 “Anticuerpos” como se usa aquí, incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, y anticuerpos humanizados, así como fragmentos Fab, incluyendo los productos de un Fab o de otro banco de expresión de inmunoglobulinas.

15 “Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” desde el estado natural. Si una composición o sustancia “aislada” se presenta en la naturaleza, ha sido cambiada o separada de su entorno original, o ambas cosas. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente naturalmente en un animal vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes en su estado natural está “aislado”, según el término empleado en esta memoria. Por ejemplo, las moléculas de DNA recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen moléculas de DNA recombinante mantenidas en células hospedantes heterólogas o moléculas de DNA purificadas en solución. Las moléculas de RNA aisladas incluyen transcritos de RNA *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de DNA de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la invención incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente.

25 “Polinucleótido” se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA sin modificar o RNA o DNA modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitación, DNA de cadena sencilla y de cadena doble, DNA que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble, RNA de cadena sencilla y de cadena doble, y RNA que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser de cadena sencilla o, más típicamente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble. En adición, “polinucleótido” se refiere a regiones de cadena triple que comprenden RNA o DNA o ambos, RNA y DNA. El término polinucleótido incluye también los DNA o RNA que contienen una o más bases modificadas y los DNA o RNA con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones como se explica en la presente solicitud. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se han realizado una variedad de modificaciones al DNA y RNA; por lo tanto, el término “polinucleótido” engloba las formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de los polinucleótidos como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células. Por lo tanto, “polinucleótido” engloba también las variantes de las moléculas de ácido nucleico de la invención que codifican porciones, análogos o derivados de los receptores HNARA10. Algunas variantes pueden aparecer naturalmente, tales como las variantes alélicas naturales. Por una “variante alélica” se entiende una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. El término “polinucleótido” engloba también los polinucleótidos relativamente cortos, denominados 40 a menudo oligonucleótidos.

45 “Polipéptido” se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos uno a otro por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, esto es isómeros peptídicos. “Polipéptido” se refiere tanto a las cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a las cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener otros aminoácidos aparte de los 20 aminoácidos codificados génicamente. Los “polipéptidos” incluyen secuencias de aminoácidos modificados o por procesos naturales, tales como un proceso post-traducción, o por métodos de modificación química que son bien conocidos en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier sitio de un polipéptido, incluyendo la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los grupos amino o carboxilo terminales. Se podrá apreciar que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diferente grado en varios sitios de un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales post-traducción o pueden ser preparados por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación del ancla GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, proceso proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfonación, adición mediada por el RNA de transferencia, de aminoácidos a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinación. Véase, por ejemplo, Proteins-Structure and molecular properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 y Wold, F, Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, p. 1-12 en Post-translational covalent modification of proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al.*, “Analysis for protein modifications and non-protein cofactors”, Meth. Enzymol. (1990) 182:626-646 y Rattan *et al.*, “Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging”, Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663:48-62.

El término “variante” como se usa en esta memoria, es un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia respectivamente, pero retiene propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia nucleotídica de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia nucleotídica de la variante pueden alterar o no la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncaciones de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se expone más adelante. Generalmente, las diferencias se limitan de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante sean estrechamente similares en su conjunto y, en muchas regiones, sean idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones o deleciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede ser o no uno codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede estar presente en la naturaleza, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no es conocida como presente en la naturaleza. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos que no están presentes en la naturaleza se pueden preparar por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

“Identidad” es una medida de la identidad de las secuencias nucleotídicas o de las secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de forma que se obtenga una coordinación del más alto orden. “Identidad” *per se* tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando métodos publicados. Véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991. Aunque existen muchos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término “identidad” es bien conocido por los expertos en la técnica (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073). Los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitarse a ellos, los descritos en Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073. Los métodos para determinar la identidad o similitud se codifican en programas de ordenador. Los métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitarse a ellos, el paquete de programa GCS (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F. *et al.*, J. Molec. Biol. (1990) 215:403).

Como una ilustración, por un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que tiene al menos, por ejemplo, 95% de “identidad” con respecto a una secuencia nucleotídica de referencia de la SEQ ID NO: 1, se entiende un polinucleótido en el que la secuencia nucleotídica es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia de la SEQ ID NO: 1. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia nucleotídica con al menos un 95% de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica de referencia, se pueden delecionar o sustituir con otro nucleótido hasta el 5% de los nucleótidos de la secuencia de referencia, o se pueden insertar en la secuencia de referencia un número de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones 5 o 3 terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas o individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Similarmente, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos, por ejemplo, 95% de “identidad” con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 2, se entiende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polipéptido puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de los aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 2. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia, se pueden delecionar o sustituir con otro aminoácido hasta el 5% de los residuos de aminoácidos de la secuencia de referencia, o se pueden insertar en la secuencia de referencia un número de aminoácidos de hasta el 5% de los residuos de aminoácidos totales de la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas o individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos HNARA10 aislados. Los polipéptidos HNARA10 incluyen el polipéptido de la SEQ ID NO: 2; así como los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 2 en toda su longitud, y aún más preferiblemente al menos el 90% de identidad, e incluso más preferiblemente al menos el 95% de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 2. Además, los que tienen al menos 97-99% de identidad son altamente preferidos. También están incluidos dentro de los polipéptidos HNARA10 los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en toda su longitud, y aún más preferiblemente al menos el 90% de identidad, e incluso más preferiblemente al menos el 95% de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 2. Además, los que tienen al menos 97-99% de identidad son altamente preferidos. Preferiblemente los polipéptidos HNARA10 presentan al menos una actividad biológica de HNARA10.

ES 2 358 317 T3

Se reconocerá que algunos aminoácidos de los polipéptidos HNARA10 pueden ser variados sin un efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína. Si se contemplan tales diferencias, se debería recordar que habrá áreas críticas de la proteína que determinan la actividad.

5 Por lo tanto, la invención proporciona además variantes de los polipéptidos HNARA10 que presentan actividad sustancial de polipéptido HNARA10 o que incluyen regiones de proteína HNARA10 tales como las porciones de proteína que se exponen más adelante. Dichos mutantes incluyen polipéptidos HNARA10 en los que han tenido lugar 10 deleciones, inserciones, sustituciones tipo, inversiones y/o repeticiones. Se puede encontrar una guía acerca de los cambios de aminoácidos que probablemente son fenotípicamente silentes en Bowie, J. U. *et al*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science 247: 1306-1310 (1990).

Por lo tanto, el fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la SEQ ID NO: 2, o que es codificado por el cDNA depositado como se expone más adelante, puede ser:

15 • uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado, preferiblemente un residuo de aminoácido conservado, y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético, o

20 • uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente, o

• uno en el que el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o

25 • uno en el que aminoácidos adicionales se fusionan con el polipéptido maduro, tal como el péptido de la región de fusión Fc de IgG o secuencia líder o secretora que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia pro-proteína. Dichos fragmentos, derivados y análogos se considera que están dentro del alcance de la invención.

30 Son de particular interés las sustituciones de aminoácidos cargados con otro aminoácido cargado y con aminoácidos neutros o cargados negativamente. Esta última sustitución da como resultado proteínas con carga positiva reducida que mejoran las características de la proteína HNARA10, por ejemplo para la prevención de la agregación.

35 Como se ha indicado, los cambios son preferiblemente de una naturaleza menor, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente a la unión ni a la actividad de la proteína, tales como los que se indican a continuación.

40	Aromáticos	Fenilalanina
		Triptófano
		Tirosina
	Hidrófobos	Leucina
45		Isoleucina
		Valina
	Polares	Glutamina
		Asparragina
50	Básicos	Arginina
		Lisina
		Histidina
55	Ácidos	Ácido aspártico
		Ácido glutámico
	Pequeños	Alanina
60		Serina
		Treonina
		Metionina
65		Glicina

Generalmente, el número de sustituciones de aminoácidos no será superior a 50.

ES 2 358 317 T3

Los aminoácidos del polipéptido HNARA10 de la presente invención que son esenciales para la función se pueden identificar por métodos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediante alanina (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones sencillas de alanina en cada residuo de la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se analizan entonces en cuanto a su actividad biológica tal como la unión al receptor o la actividad proliferativa *in vitro*. Los sitios que son críticos para la unión ligando-receptor se pueden determinar también por análisis estructural, por ejemplo, cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje por fotoafinidad (Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992); de Vos *et al.*, Science 255: 306-312 (1992)).

En cuanto a la selección de péptidos o polipéptidos que llevan un epítipo antigénico, es bien conocido que las secuencias sintéticas relativamente cortas que imitan parte de una secuencia proteínica son rutinariamente capaces de provocar un antisuero que reacciona con la proteína parcialmente mimetizada. Véanse por ejemplo, Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. and Learner, R. A., Antibodies that React with Predetermined Sites on Proteins, Science 219: 660-666 (1983). Los péptidos capaces de provocar sueros reactivos con las proteínas están representados frecuentemente en la secuencia primaria de una proteína, se pueden caracterizar por un conjunto de reglas químicas sencillas, y no están confinados ni a las regiones inmunodominantes de proteínas intactas (esto es epítopos inmunógenos) ni a los amino o carboxilo terminales.

Los péptidos y polipéptidos de la invención que llevan un epítipo antigénico son útiles por tanto para producir anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a un polipéptido de la invención. Los péptidos y polipéptidos de la invención que llevan un epítipo antigénico contienen preferiblemente una secuencia de al menos siete, más preferiblemente de al menos nueve y lo más preferiblemente entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 50 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido según la invención.

Por ejemplo, los polipéptidos o péptidos antigénicos que se pueden usar para generar anticuerpos específicos de HNARA10 comprenden: un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 84 hasta aproximadamente 101 de la SEQ ID NO: 2, un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 120 hasta aproximadamente 158 de la SEQ ID NO: 2, un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 177 hasta aproximadamente 196 de la SEQ ID NO: 2, un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 207 hasta aproximadamente 226 de la SEQ ID NO: 2, un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 348 hasta aproximadamente 395 de la SEQ ID NO: 2, un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 405 hasta aproximadamente 427 de la SEQ ID NO: 2. Como se ha indicado antes, se cree que los fragmentos de polipéptido anteriores son regiones antigénicas del polipéptido HNARA10 como se determina utilizando Protean (versión 3.16) de DNASTAR. En particular, los polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácidos de 179 a 196 y los residuos de aminoácidos de 357 a 374 de la SEQ ID NO: 2 se utilizaron satisfactoriamente para generar anticuerpos policlonales en el conejo que son capaces de reconocer la proteína HNARA10 expresada transitoriamente en células HEK 293.

Los péptidos y polipéptidos de la invención que llevan epítopos, se pueden preparar por cualquier medio convencional, por ejemplo por el método descrito en el documento Patente de Estados Unidos nº 4.631.211.

Los polipéptidos HNARA10 de la presente invención y los fragmentos de los mismos que llevan epítopos, se pueden combinar con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgG), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y generalmente presentan un aumento de la semivida *in vivo*. Véase por ejemplo, Traunecker *et al.*, Nature 331: 84-86 (1988). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimérica ligada por disulfuro debida a la parte de IgG pueden ser también más eficientes en la unión y neutralización de otras moléculas que la proteína monomérica HNARA10 o los fragmentos proteínicos de la misma (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)).

Los polipéptidos HNARA10 pueden estar en la forma de proteína "madura" o pueden ser una parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia adicional de aminoácidos que contiene secuencias secretoras o líderes, pro-secuencias, secuencias que ayudan a la purificación tales como residuos múltiples de histidina, o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción recombinante.

También se incluyen en la invención fragmentos de los polipéptidos HNARA10 o variantes, formas mutadas, derivados de los mismos como se ha mencionado antes en esta memoria. Un fragmento es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es totalmente la misma como parte, pero no toda, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos HNARA10 mencionados antes. Como con los polipéptidos HNARA10, los fragmentos pueden ser "independientes" o pueden estar comprendidos dentro de un polipéptido más grande del que forman una parte o región, lo más preferiblemente como una única región continua. Los ejemplos representativos de fragmentos de polipéptido de la invención, incluyen, por ejemplo, fragmentos desde aproximadamente el aminoácido número 1 hasta aproximadamente el número 235, desde aproximadamente el 236 hasta aproximadamente el 450, desde aproximadamente el 321 hasta aproximadamente el 428 del polipéptido HNARA10 mostrado en la SEQ ID NO: 2. En este contexto "aproximadamente" incluye los intervalos particularmente señalados más grandes o más pequeños en varios, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos en cualquier extremo o en ambos extremos.

ES 2 358 317 T3

Los fragmentos preferidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos de truncación que tienen la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos HNARA10, excepto la delección de una serie continua de residuos que incluye el amino terminal, o una serie continua de residuos que incluye el carboxilo terminal o la delección de dos series continuas de residuos, incluyendo una el amino terminal e incluyendo otra el carboxilo terminal. Se prefieren también los fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden hélice alfa y regiones que forman hélice alfa, hoja beta y regiones que forman hoja beta, giro y regiones que forman giro, espirales y regiones que forman espirales, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones flexibles, regiones que forman superficie, región de unión al sustrato, y regiones de índice antigénico alto. Otros fragmentos preferidos son los fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que median en la actividad HNARA10, incluyendo aquellos con una actividad similar o con una actividad mejorada, o con una actividad disminuida de forma indeseable. Se incluyen también aquellos que son antigénicos o inmunógenos en un animal, especialmente en un ser humano.

Preferiblemente, todos estos fragmentos de polipéptido retienen la actividad biológica de HNARA10, incluyendo la actividad antigénica.

Los polipéptidos HNARA10 de la invención se pueden preparar de cualquier manera adecuada. Dichos polipéptidos incluyen polipéptidos aislados presentes en la naturaleza, polipéptidos producidos recombinantemente, o polipéptidos producidos por una combinación de estos métodos.

En una realización, los polipéptidos HNARA10 de la invención se pueden preparar por síntesis química, por ejemplo usando aminoácidos no naturales y/o modificados. De este modo, puede ser ventajoso usar aminoácidos no naturales, por ejemplo D-aminoácidos, para mejorar el tiempo de vida de los polipéptidos, o análogos de aminoácidos, por ejemplo formas sulfuradas de aminoácidos.

Los métodos para preparar dichos polipéptidos son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, se puede realizar la síntesis química de los polipéptidos de la invención utilizando un procedimiento de fase sólida. En dicho método, el aminoácido de C-terminal se fija sobre un soporte sólido inerte y comprende grupos protectores (por ejemplo, BOC o FMOC) del resto alfa-amino. Al final de esta etapa, se separa el grupo protector y se fija un segundo aminoácido, opcionalmente protegido de manera similar. Los grupos protectores de N-terminal se separan una vez que se ha fijado cada uno de los aminoácidos, siendo conservados los grupos protectores posiblemente presentes en las cadenas laterales. Cuando se sintetiza la cadena del péptido, se escinde el péptido del soporte y se separan los grupos protectores remanentes. Se puede llevar a cabo el acoplamiento utilizando N,N'-diisopropil-carbodiimina (DIC), entre otros, en un disolvente de DMF o DCM. Esta síntesis en fase sólida está descrita por ejemplo en Stewart J. M. *et al.*, Solid Phase Peptides Synthesis. Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd Ed., (1984).

Otros polipéptidos según la invención comprenden la secuencia de aminoácidos del polinucleótido HNARA10 que posee la secuencia amino completa codificada por el clon cDNA contenido en la ATCC con el número de depósito PTA-315 como se expone más adelante, así como los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos del polinucleótido HNARA10 maduro que posee la secuencia amino completa codificada por el clon cDNA contenido en la ATCC con el número de depósito PTA-315.

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido o polipéptido que comprende una porción de un polipéptido de la invención que lleva un epítipo. El epítipo de esta porción de polipéptido es un epítipo inmunógeno o antigénico de un polipéptido descrito en la presente invención. Un epítipo inmunógeno se define como una parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos cuando la proteína completa es el inmunógeno. Por otro lado, se define como un epítipo antigénico una región de una molécula de proteína a la que se puede unir un anticuerpo.

Otro aspecto de la invención se refiere a los polinucleótidos HNARA10.

A menos que se indique otra cosa, todas las secuencias nucleotídicas determinadas por la secuenciación de una molécula de DNA fueron determinadas aquí utilizando un secuenciador automático de DNA, y todas las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las secuencias de DNA determinadas aquí fueron previstas mediante traducción de una secuencia de DNA determinada como anteriormente. Por lo tanto, como es conocido en la técnica para cualquier secuencia de DNA determinada por este método, cualquier secuencia nucleotídica puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas automáticamente son típicamente idénticas al menos en aproximadamente el 90%, más típicamente idénticas al menos en aproximadamente el 95% hasta idénticas en aproximadamente el 99,9% con respecto a la secuencia nucleotídica real de la molécula de DNA secuenciada.

Los polinucleótidos HNARA10 incluyen polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos y fragmentos HNARA10, y los polinucleótidos estrechamente relacionados con ellos, por ejemplo, variantes, derivados y formas mutadas. Más específicamente los polinucleótidos HNARA10 de la invención incluyen un polinucleótido que comprende la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1 que codifica un polipéptido HNARA10 de la SEQ ID NO: 2, y un polinucleótido que tiene la secuencia particular de la SEQ ID NO: 1. Los polinucleótidos HNARA10 incluyen además un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 de la SEQ ID NO: 2 en toda su longitud, y un

ES 2 358 317 T3

polinucleótido que es idéntico al menos en un 80% con el que tiene la SEQ ID NO: 1 en toda su longitud. A este respecto, son particularmente preferidos los polinucleótidos idénticos en al menos un 90%, y son especialmente preferidos aquellos con al menos un 95% de identidad. Además, son altamente preferidos aquellos con al menos un 97% de identidad y son los más altamente preferidos aquellos con al menos un 98-99% de identidad, siendo el más preferido el que tiene al menos 99% de identidad. También se incluyen en los polinucleótidos HNARA10 las secuencias nucleotídicas que tienen suficiente identidad con una secuencia nucleotídica contenida en la SEQ ID NO: 1 o contenida en el inserto de cDNA del plásmido depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-315 para hibridarse en condiciones útiles para la amplificación o para uso como una sonda o marcador. Por otra parte, los polinucleótidos HNARA10 incluyen una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10, ya sea en forma madura o no, expresada por el inserto de cDNA depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-315 como se expone más adelante, y una secuencia nucleotídica que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de tal inserto de cDNA. A este respecto, son particularmente preferidos los polinucleótidos con al menos un 90% de identidad, y son especialmente preferidos aquellos con al menos un 95% de identidad. Además, son altamente preferidos aquellos con al menos un 97% de identidad y son los más altamente preferidos aquellos con al menos un 98-99% de identidad, siendo el más preferido el que tiene al menos un 99% de identidad. La invención proporciona también polinucleótidos que son complementarios de todos los polinucleótidos HNARA10 según la invención.

Un depósito que contiene un cDNA de HNARA10 humano ha sido depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209, USA, el 7 de julio de 1999, y ha recibido de la ATCC el número de depósito PTA-315. El material depositado (clon) es pCDNA3 que contiene además el cDNA de HNARA10 de longitud completa, denominado HNARA10 plásmido humano después del depósito. El inserto de cDNA está dentro de los sitios BamHI y XbaI del vector. La secuencia nucleotídica del polinucleótido contenido en el material depositado, así como la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado de ese modo, se controlan en el caso de cualquier conflicto con alguna descripción de secuencias en esta memoria.

El depósito se ha realizado en los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de micro-organismos con fines de procedimiento de patente.

El HNARA10 de la invención está relacionado estructuralmente con otras proteínas de la familia de receptores nicotínicos de acetilcolina, como se muestra por los resultados de la secuenciación del cDNA de la SEQ ID NO: 1 que codifica el HNARA10 humano. La secuencia de cDNA de la SEQ ID NO: 1 contiene un marco de lectura abierto (números de nucleótidos 43 a 1392) que codifica un polipéptido de aproximadamente 450 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, con una secuencia líder prevista de aproximadamente 24 residuos de aminoácidos y un peso molecular deducido de aproximadamente 49,7 kDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos (utilizando SignalP versión 1.1 y software de predicción TMHMM versión 1.0, Centre for Biological Sequence analysis) muestra que la secuencia proteínica prevista de HNARA10 comprende todas las características típicas de las subunidades alfa de los receptores nicotínicos de acetilcolina: un péptido señal previsto, cuatro dominios transmembranales potenciales, dos residuos de cisteína separados por 13 aminoácidos y un par de residuos de cisteína adyacentes en la región extracelular del N-terminal prevista (Figura 1). La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 tiene aproximadamente un 57% de identidad (usando MEGALIGN versión 3.13 con el algoritmo de Jotun-Hein procedente de DNASTAR) en los residuos de aminoácidos 1-450 con la subunidad alfa 9 de receptor nicotínico de acetilcolina de rata (Swissprot número de acceso P43144) (Figura 2). La secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 1 tiene aproximadamente un 62% de identidad (usando MEGALIGN versión 3.13 con el algoritmo de Jotun-Hein procedente de DNASTAR) en los residuos de nucleótidos 43-1392 con la secuencia codificadora de la subunidad alfa 9 de receptor nicotínico de acetilcolina de rata (Genbank número de acceso U12336). Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos HNARA10 con la de otras subunidades conocidas de receptores nicotínicos de acetilcolina de vertebrados (usando MEGALIGN versión 3.13 con el algoritmo CLUSTAL procedente de DNASTAR) demuestra que la proteína HNARA10 es la más relacionada con el subgrupo de subunidades de receptor nicotínico homomérico que incluye las subunidades alfa 7, alfa 8 y alfa 9 (Figura 3).

Los polinucleótidos de la presente invención que codifican el polipéptido HNARA10 se pueden obtener utilizando clonación y cribado convencionales, a partir de una genoteca de cDNA derivada de mRNA en células de músculo esquelético, hipófisis o cóclea humanas usando el análisis del marcador de secuencia expresada (EST) (Adams, M.D., *et al.* Science (1991) 252:1651-1656; Adams, M. D. *et al.*, Nature, (1992) 355:632-634; Adams, M. D., *et al.*, Nature (1995) 377 Supp: 3-174). Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener también de fuentes naturales tales como genotecas de DNA genómico o se pueden sintetizar usando técnicas bien conocidas y comercialmente disponibles.

La secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 de la SEQ ID NO: 2 puede ser idéntica al polipéptido que codifica la secuencia contenida en la SEQ ID NO: 1 (números de nucleótido 43 a 1392), o puede ser una secuencia diferente, la cual como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, codifica también el polipéptido de la SEQ ID NO: 2.

Como se ha indicado, la invención proporciona también la forma madura del receptor HNARA10 de la presente invención. Según la hipótesis de la señal, las proteínas segregadas por células de mamíferos tienen una secuencia líder señal o secretora que es escindida de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a lo largo del retículo endoplásmico rugoso. La mayor parte de las células de mamíferos e

incluso de las células de insectos escinden las proteínas segregadas con la misma especificidad. Sin embargo, en algunos casos, la escisión de una proteína segregada no es enteramente uniforme, lo que da como resultado dos o más especies maduras de la proteína. Además, se ha conocido desde hace tiempo que la especificidad de la escisión de una proteína segregada se determina en última instancia por la estructura primaria de la proteína completa, esto es su secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la invención proporciona una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 maduro que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el clon cDNA contenido en el hospedante identificado como depósito PTA-315 de la ATCC. Por polipéptido HNARA10 maduro que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el clon cDNA contenido en el hospedante identificado como depósito PTA-315 de la ATCC, se indica la forma madura del polipéptido HNARA10 producida por expresión en una célula de mamífero del marco de lectura abierto completo codificado por la secuencia de DNA humano del clon contenido en el vector del hospedante depositado. Como se ha indicado, el polipéptido HNARA10 maduro que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el clon cDNA contenido en la ATCC con número de depósito PTA-315 puede diferir o no de la forma prevista de proteína HNARA10 "madura" representada en la SEQ ID NO: 2, dependiendo de la exactitud del sitio de escisión pronosticado basado en análisis por ordenador.

Hay disponibles métodos para predecir si una proteína tiene o no una secuencia líder secretora así como el sitio de escisión de esta secuencia líder. Por ejemplo, se pueden usar los métodos de McGeoch (Virus Res. 3:271-286 (1985)) y von Heinje (Nucleic Acids Res. 14:4683-4690 (1986)).

Cuando se usan los polinucleótidos de la invención para la producción recombinante del polipéptido HNARA10, el polinucleótido puede incluir, por sí solo, la secuencia codificadora del polipéptido maduro o un fragmento del mismo; la secuencia codificadora del polipéptido maduro o fragmento en el marco de lectura con otras secuencias codificadoras, tales como las que codifican una secuencia líder o secretora, una secuencia pre-, o pro- o prepro-proteína, u otras porciones de péptido de fusión. Por ejemplo, se puede codificar una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.) o en el vector pTracer™ (Invitrogen, Inc) y se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824, o es una marca del epítipo HA o V5. El polinucleótido puede contener también secuencias 5' y 3' no codificadoras, tales como secuencias transcritas, no traducidas, señales de corte y empalme y de poliadenilación, sitios de unión de ribosomas y secuencias que estabilizan el mRNA.

Otras realizaciones preferidas son polinucleótidos que codifican variantes HNARA10 que comprenden la secuencia de aminoácidos del polipéptido HNARA10 de la SEQ ID NO: 2 en la que varios residuos de aminoácidos, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 han sido sustituidos, eliminados o añadidos, en cualquier combinación.

La invención se dirige además a fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aislado descritas en esta memoria. Por fragmento de una molécula de ácido nucleico aislado que tiene la secuencia nucleotídica del cDNA depositado o la molécula de nucleótido que tiene la secuencia nucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 1, se entienden fragmentos de al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y preferiblemente de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, que son útiles como sondas de diagnóstico y cebadores. Naturalmente, fragmentos más grandes de aproximadamente 50-1500 nucleótidos de longitud son también útiles según la presente invención, como son los fragmentos que corresponden a la mayor parte, si no a toda, la secuencia nucleotídica del cDNA depositado o como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Por un fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud, por ejemplo, se entienden fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de la secuencia nucleotídica del cDNA depositado o de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En un primer aspecto, los fragmentos de ácido nucleico preferidos según la invención comprenden aquellos que se pueden usar como sondas de ácido nucleico.

Por ejemplo, una sonda nucleica según la invención comprende la secuencia nucleotídica localizada entre el nucleótido número 998 y el nucleótido número 1366 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1.

Otra sonda nucleica según la invención comprende la secuencia nucleotídica localizada entre el nucleótido número 1396 y el nucleótido número 1914 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1.

En un segundo aspecto, los fragmentos de ácido nucleico preferidos según la invención comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una región antigénica de HNARA10.

Por ejemplo, los fragmentos de ácido nucleico preferidos según la invención comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 84 hasta aproximadamente 101 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 120 hasta aproximadamente 158 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 177 hasta aproximadamente 196 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 207 hasta aproximadamente 226 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos

ES 2 358 317 T3

de aminoácidos desde aproximadamente 348 hasta aproximadamente 395 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 405 hasta aproximadamente 427 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 179 hasta aproximadamente 196 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde aproximadamente 357 hasta aproximadamente 374 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

La invención se refiere además a los polinucleótidos que se hibridan con las secuencias descritas anteriormente en esta memoria. A este respecto, la presente invención se refiere especialmente a polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos descritos aquí antes. Como se usa aquí, el término "condiciones rigurosas" significa que la hibridación tendrá lugar solamente si hay al menos el 95% y preferiblemente al menos el 97% de identidad entre las secuencias.

Los polinucleótidos de la invención, que son idénticos o suficientemente idénticos a una secuencia nucleotídica contenida en la SEQ ID NO: 1 o a uno de sus fragmentos, o al inserto de cDNA del plásmido depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-315 o a uno de sus fragmentos, se pueden usar como sondas de hibridación para el cDNA y el DNA genómico, para aislar los cDNA de longitud completa y los clones genómicos que codifican HNARA10 y para aislar el cDNA y los clones genómicos de otros genes que tienen una alta similitud de secuencia con el gen HNARA10. Tales métodos de hibridación son bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente estas secuencias nucleotídicas son idénticas en un 80%, preferiblemente idénticas en un 90%, más preferiblemente idénticas en un 95% con la de referencia. Las sondas generalmente comprenderán al menos 15 nucleótidos. Preferiblemente, tales sondas tendrán al menos 30 nucleótidos y pueden tener al menos 50 nucleótidos. Las sondas particularmente preferidas tendrán entre 30 y 50 nucleótidos.

En una realización, la obtención de un polinucleótido que codifica un polipéptido HNARA10 comprende las etapas de cribado de una genoteca apropiada en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma; y el aislamiento de cDNA de longitud completa y de clones genómicos que contienen la secuencia de dicho polinucleótido. Tales métodos de hibridación son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las condiciones rigurosas de hibridación son como se han definido antes o alternativamente condiciones de incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución 5x de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 microgramos/ml de DNA de esperma de salmón batido y desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención se pueden emplear como reactivos y materiales de investigación para descubrir tratamientos y diagnósticos para enfermedades de animales y de seres humanos.

La presente invención se refiere también a vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos según la invención y un sistema de expresión capaz de producir el polipéptido HNARA10 cuando dicho sistema de expresión está presente en una célula hospedante compatible, células hospedantes que se preparan genéticamente con vectores de la invención, y a la producción de polipéptidos de la invención por técnicas recombinantes. Se pueden emplear también los sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando los RNA derivados de las construcciones de DNA de la presente invención.

Para la producción recombinante, se pueden tratar las células hospedantes genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos para los polinucleótidos de la presente invención. La introducción de polinucleótidos en las células hospedantes se puede efectuar por métodos descritos en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986) y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) tales como transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección, microinyección, transfección catiónica mediada por lípidos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección.

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen los genes de la dihidrofolato-reductasa o de resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas y de resistencia a la tetraciclina o la ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias.

El inserto de DNA debería ser preferiblemente ligado a un promotor apropiado, tales como los promotores del fago bacteriano lambda pL y RP, T3 y T7, los promotores de *E. coli* lac, trp y tac, los promotores tempranos y tardíos eucariotas SV40, los promotores tempranos inmediatos CMV, los promotores eucariotas de los LTR retrovirales, tales como los del Virus del Sarcoma de Rous (RSV) por nombrar algunos. Otros promotores adecuados están disponibles para los expertos en la técnica.

Las construcciones de expresión contendrán además sitios para la iniciación y terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La región codificadora de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirán preferiblemente una iniciación de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, AGA o UAG) apropiadamente situado en el extremo del polipéptido a ser traducido.

ES 2 358 317 T3

Los ejemplos representativos de hospedantes apropiados comprenden células bacterianas, tales como células de estreptococos, estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células de animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y células de melanoma de Bowes; y células de plantas.

Se pueden usar una gran variedad de sistemas de expresión. Tales sistemas incluyen, entre otros, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levaduras, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, vaccinia virus, adenovirus, fowlpox virus, pseudorabies virus y retrovirus, y vectores derivados de las combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. En general, se puede usar cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos para producir un polipéptido en un hospedante.

Entre los vectores preferidos para uso en bacterias están los pGE70, pGE60 y pG-9, disponibles de Qiagen, vectores Phagescript, vectores pBS, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene, ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia.

Entre los vectores eucariotas preferidos están los pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia, pcDNA3, pcDNA3.1 y pTracerTM disponibles de Invitrogene. Otros vectores serán fácilmente identificables por los expertos en la técnica.

Se puede insertar la secuencia nucleotídica apropiada en un sistema de expresión por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y rutinarias, tales como, por ejemplo, las presentadas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (*cita anterior*).

Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se pueden incorporar en el polipéptido deseado las señales de secreción apropiadas. Estas señales pueden ser endógenas con respecto al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Si se va a expresar el polipéptido HNARA10 para uso en ensayos de cribado, generalmente, se prefiere que el polipéptido sea producido en la superficie de la célula. En este caso, se pueden recoger las células antes del uso en el ensayo de cribado. Si el polipéptido HNARA10 se segrega en el medio, se puede recoger el medio con el fin de recuperar y purificar el polipéptido; si se produce intracelularmente, las células deben ser lisadas en primer lugar antes de que sea recuperado el polipéptido.

Se pueden recuperar y purificar los polipéptidos HNARA10 a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución para la purificación. Se pueden emplear técnicas bien conocidas para el repliegamiento de las proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o purificación.

El polipéptido se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones heterólogas funcionales adicionales. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula hospedante, durante la purificación o durante la posterior manipulación y almacenaje. También, se pueden añadir restos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación. Tales regiones pueden ser separadas antes de la preparación final del polipéptido. La adición de restos peptídicos a los polipéptidos para provocar secreción o excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otros, son métodos familiares y rutinarios en la técnica. Una proteína de fusión preferida comprende una inmunoglobulina en forma de región heteróloga que es útil para solubilizar proteínas. Por ejemplo, el documento EP-A-0.464.533 describe proteínas de fusión que comprenden varias porciones de región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc de una proteína de fusión es ventajosa para uso en terapia y diagnóstico. Por otro lado, para algunos usos, sería deseable eliminar la parte Fc una vez que la proteína de fusión haya sido expresada, detectada y purificada. Por ejemplo, este es el caso cuando la porción Fc demuestra ser un obstáculo para uso en terapia y diagnóstico, por ejemplo cuando la proteína de fusión se va a usar como antígeno para inmunizaciones.

Los mamíferos con ciertas enfermedades o con susceptibilidad para ciertas enfermedades, se considera que expresan niveles significativamente alterados, mejorados o disminuidos de la proteína HNARA10 y de mRNA que codifica la proteína HNARA10, cuando se comparan con un mamífero "estándar" correspondiente, esto es, un mamífero de la misma especie que no tiene la enfermedad ni presenta una susceptibilidad para la misma. Además, se cree que se pueden detectar niveles significativamente alterados, mejorados o disminuidos de la proteína HNARA10 en ciertos tejidos corporales (por ejemplo, tejidos de médula ósea, cerebelo, cerebro, mesencéfalo, médula espinal, terminaciones nerviosas, retina, mama, hipófisis, corazón, pulmón, músculo esquelético, riñón, páncreas, intestino, estómago, cóclea, epitelio) de mamíferos con la enfermedad o que presentan una susceptibilidad para la enfermedad cuando se comparan

con los tejidos de mamíferos de la misma especie que no tienen la enfermedad ni presentan una susceptibilidad para la misma. Por lo tanto, la invención proporciona un método de diagnóstico que incluye ensayar el nivel de expresión del gen que codifica un polipéptido HNARA10 de la presente invención en células o fluidos corporales de mamíferos y comparar el nivel de expresión génica con el nivel de expresión de un polipéptido HNARA10 estándar, por lo cual, un nivel de expresión alterado, mejorado o disminuido del gen con respecto al estándar es indicativo de la enfermedad o de una susceptibilidad para la enfermedad. Los mamíferos preferidos incluyen monos, simios, gatos, perros, vacas, cerdos, caballos, conejos y seres humanos.

Las enfermedades que se pueden diagnosticar incluyen pero sin limitarse a ellas, la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus o trastorno del apetito, acúfenos o disfunción auditiva.

Por “ensayar el nivel de expresión del gen que codifica un polipéptido HNARA10”, se entiende medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de una proteína HNARA10 o el nivel del mRNA que codifica un receptor HNARA10 en una primera muestra biológica bien sea directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel absoluto de proteína o el nivel absoluto de mRNA) o bien relativamente (por ejemplo comparando con el nivel de proteína HNARA10 o con el nivel de mRNA en una segunda muestra biológica).

Preferiblemente, el nivel de proteína HNARA10 o el nivel de mRNA en la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con el nivel de una proteína HNARA10 estándar o con el nivel de mRNA estándar, siendo tomado el estándar de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene la enfermedad (ni presenta una susceptibilidad para la misma). Como se podrá apreciar, una vez que se conoce el nivel de una proteína HNARA10 estándar o el nivel de mRNA estándar, se puede usar repetidamente como un estándar de comparación.

Por “muestra biológica” se entiende cualquier muestra biológica, ya sea muestra de tejido o de fluido corporal, obtenida de un individuo, línea de células, cultivo de tejido, u otra fuente que pueda contener la proteína HNARA10 o mRNA.

Se puede aislar el RNA celular total a partir de una muestra biológica utilizando el método de guanidinio-tiocianato-fenol-cloroformo de una sola etapa descrito en Chomczynski and Sacchi, *Anal. Biochem.* 162: 156-159 (1987). Se valoran entonces los niveles de mRNA que codifica el receptor HNARA10 usando cualquier método apropiado. Estos métodos incluyen análisis por transferencia Northern (Harada *et al.*, *Cell* 63: 303-312 (1990)), cartografía de S1 nucleasa (Fujita *et al.*, *Cell* 49: 357-367 (1987)), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcripción inversa en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Fujita *et al.*, *Cell* 49: 357-367 (1987)), y transcripción inversa en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR).

La valoración de los niveles de proteína HNARA10 en una muestra biológica puede tener lugar usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, se puede estudiar la expresión de la proteína HNARA10 en tejidos con los métodos inmunohistológicos clásicos (Jalkanen, M., *et al.*, *J. Cell Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M., *et al.*, *J. Cell Biol.* 105: 3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica del receptor HNARA10 incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA).

Se conocen en la técnica marcas adecuadas e incluyen marcas enzimáticas, tales como glucosa-oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina y biotina.

En adición, la invención proporciona ensayos de diagnóstico para diagnosticar o determinar la susceptibilidad para, entre otros, la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus, acúfenos y disfunción auditiva, trastorno del apetito, mediante la detección de mutaciones en el gen HNARA10 por los métodos descritos más adelante.

Los ácidos nucleicos para diagnóstico se pueden obtener a partir de células de un sujeto, tales como las procedentes de la sangre, orina, saliva, material de biopsia de tejidos o material de autopsia. El DNA genómico se puede usar directamente para la detección o se puede amplificar enzimáticamente mediante el uso de la PCR u otras técnicas de amplificación antes del análisis. Los RNA o cDNA se pueden usar también de manera similar. Las deleciones e inserciones se pueden detectar por un cambio de tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales se pueden identificar mediante la hibridación del DNA amplificado con las secuencias nucleotídicas marcadas de HNARA10. Las secuencias perfectamente concordantes se pueden distinguir de los dúplex no concordantes mediante digestión por RNasa o por diferencias en las temperaturas de fusión. Las diferencias en la secuencia de DNA se pueden detectar también por alteraciones en la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA en geles, con o sin agentes desnaturizantes, o por secuenciación directa del DNA. Véase, por ejemplo, Myers *et al.*, *Science* (1985) 230:1242. Los cambios de la secuencia en localizaciones específicas se pueden revelar también mediante ensayos de protección por nucleasa, tales como protección por RNasa y S1 o el método de escisión química.

ca. Véase Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401. En otra realización, se puede construir un montaje de sondas de oligonucleótidos que comprende la secuencia nucleotídica HNARA10 o fragmentos de la misma para realizar un cribado eficiente, por ejemplo, de mutaciones genéticas. Los métodos de la tecnología de montaje son bien conocidos y tienen aplicabilidad general. Se pueden utilizar para resolver una variedad de cuestiones en genética molecular incluyendo la expresión génica, nexos genéticos, y variabilidad genética. Véase, por ejemplo: M.Chee *et al.*, Science, Vol 274, pp 610-613 (1996).

Las secuencias nucleotídicas de la presente invención son valiosas también para la identificación de cromosomas. La secuencia se marca específicamente y se puede hibridar con una localización particular sobre un cromosoma individual humano. La cartografía de secuencias relevantes para los cromosomas según la presente invención es una primera etapa importante en la correlación de estas secuencias con la enfermedad asociada a los genes. En este caso, se localizó el gen HNARA10 por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) sobre el cromosoma 12 en una posición inmediatamente adyacente al centrómero sobre la rama larga del cromosoma, que corresponde a la banda 12q12 (Figura 4). Una vez que ha sido cartografiada una secuencia en cuanto a una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia sobre el cromosoma se puede correlacionar con los datos del mapa genético. Tales datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en Internet a través de la Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades que han sido cartografiadas en cuanto a la misma región cromosómica se identifican entonces mediante análisis de correlación (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes).

Se pueden determinar también las diferencias en el cDNA o en la secuencia genómica entre los individuos afectados y los no afectados. Si se observa una mutación en alguno o en todos los individuos afectados pero no en ningún individuo normal, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad.

Los polipéptidos de la invención o sus fragmentos o los análogos de los mismos, o las células que los expresan se pueden usar también como inmunógenos para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos inmunoespecíficos para los polipéptidos HNARA10. El término "inmunoespecífico" significa que los anticuerpos tienen una afinidad sustancial para los polipéptidos de la invención mayor que su afinidad para otros polipéptidos relacionados de la técnica anterior.

Los anticuerpos generados frente a los polipéptidos HNARA10 se pueden obtener administrando los polipéptidos o los fragmentos, análogos o células que llevan epítopos, a un animal, preferiblemente no a un ser humano, utilizando protocolos de rutina. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas de células. Los ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma humano de células B (Kozbor *et al.*, Immunology Today (1983) 4:72) y la técnica del hibridoma EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos No. 4.946.778) se pueden adaptar también para producir anticuerpos de cadena sencilla frente a los polipéptidos de esta invención. También, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos descritos antes se pueden utilizar para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos por cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos frente a los polipéptidos HNARA10 se pueden emplear también para tratar o para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus, trastorno del apetito, acúfenos y disfunción auditiva, entre otras.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero el polipéptido HNARA10, o un fragmento del mismo, adecuado para producir una respuesta inmunitaria de anticuerpos y/o de células T para proteger a dicho animal de la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus, trastorno del apetito, acúfenos y disfunción auditiva, entre otras. Otro aspecto más de la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende, administrar el polipéptido HNARA10 mediante un vector que dirige la expresión del polinucleótido HNARA10 *in vivo* con el fin de inducir dicha respuesta inmunológica para producir anticuerpos para proteger a dicho animal de enfermedades.

Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación (composición) inmunológica/de vacuna que, cuando se introduce en un hospedante mamífero, induce una respuesta inmunológica en dicho mamífero frente a un polipéptido HNARA10, donde la composición comprende un polipéptido HNARA10 o gen HNARA10. La formulación de vacuna puede comprender además un vehículo adecuado. Puesto que el polipéptido HNARA10 se puede descomponer en el estómago, se administra preferiblemente parenteralmente (incluyendo inyección subcutánea, intramuscular, intrave-

nosa, intradérmica etc.). Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases uni-dosis o multi-
 5 dosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales y se pueden conservar en un estado liofilizado que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso. La formulación de la vacuna puede incluir también sistemas adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de la formulación, tales como sistemas aceite en agua y otros sistemas conocidos en la técnica. La dosis dependerá de la actividad específica de la vacuna y se puede determinar fácilmente por experimentación rutinaria.

10 Como se ha demostrado en la presente invención (véase el ejemplo 3), se obtiene una actividad funcional cuando se usa un receptor (receptor alfa9/alfa10) formado por la asociación de las dos subunidades alfa9 y HNARA10 de la familia de receptores nicotínicos de acetilcolina. Por lo tanto, se pueden emplear estas dos subunidades en un procedimiento de selección de compuestos candidatos que se unen con el receptor y que, directa o indirectamente,
 15 activan (agonistas) o inhiben la activación (antagonistas) del receptor. De este modo, se pueden utilizar también los polipéptidos de la invención y los polipéptidos codificados por la subunidad $\alpha 9$ para evaluar la unión de sustratos de moléculas pequeñas y ligandos, por ejemplo, en células, en preparaciones libres de células, en bancos químicos, y en mezclas de productos naturales. Estos sustratos y ligandos pueden ser sustratos y ligandos naturales o pueden ser miméticos estructurales o funcionales. Véase Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1 (2): Chapter 5 (1991).

20 La elección de los compuestos candidatos se puede basar en la similitud con agonistas o antagonistas conocidos de la familia del receptor. En particular, se pueden usar los antagonistas o agonistas conocidos de la familia de receptores nicotínicos para determinar los compuestos candidatos a ser seleccionados.

25 Tales compuestos conocidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, acetilcolina, (S)-nicotina, y sus homólogos anabasina y anabaseína, además de citisina, epibatidina, anatoxina-a, lobelina, y otros productos naturales de los que se sabe que activan los subtipos de receptores nicotínicos.

30 En adición se han descrito en la bibliografía análogos sintéticos que tienen propiedades agonistas en los subtipos nicotínicos. Estos incluyen ABT-418, SIB-1508Y, SIB1563, RJ-2403 o trans-metanicotina, A-85390, ABT-594, y muchos otros.

35 Los antagonistas conocidos de subtipos nicotínicos incluyen mecamilamina, dihidro-beta-eritroidina, alfa-conotoxinas. Son de particular interés los compuestos que son conocidos por interactuar con receptores nicotínicos que se sabe que están compuestos de una combinación homomérica de subunidades alfa de receptor nicotínico tales como alfa 7. Los agonistas conocidos para este subtipo son GTS-21, AR-R1777, mientras que los antagonistas conocidos son alfa-bungarotoxina, metilcaconitina y alfa-conotoxina lml. También son de particular interés los compuestos que se sabe que interactúan con el receptor nicotínico que contiene la subunidad alfa 9, tales como los que se encuentran en las células ciliadas externas de la cóclea de vertebrados. Los agonistas conocidos de este subtipo son acetilcolina,
 40 colina y carbacol mientras que los antagonistas conocidos son nicotina, alfa-bungarotoxina, estricnina, ICS-205,930, bicuculina, d-tubocurarina y atropina.

45 La similitud de los compuestos candidatos con compuestos que se sabe que activan o inhiben la activación de la familia de receptores nicotínicos de acetilcolina puede ser estructural o funcional, o ambas. Por ejemplo, los compuestos candidatos a seleccionar se pueden elegir partiendo de su semejanza química con compuestos conocidos. Otros compuestos candidatos se pueden elegir teniendo en cuenta su relación funcional con la familia de receptores nicotínicos de acetilcolina.

50 Otros compuestos candidatos se pueden elegir entre los compuestos que se sabe que están implicados en un gran número de procesos biológicos y se pueden seleccionar para cribado solamente con esta base.

55 Los polipéptidos HNARA10 se considera que son responsables de muchas funciones biológicas, incluyendo muchas patologías. Por consiguiente, es deseable encontrar compuestos y fármacos que estimulen al receptor alfa9/alfa10 por un lado o que puedan inhibir la función del receptor alfa9/alfa10. En general, los agonistas se emplean con fines terapéuticos y profilácticos para afecciones tales como la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus, trastorno del apetito, acúfenos y disfunción auditiva. Los antagonistas se pueden emplear para una variedad de fines terapéuticos y profilácticos para afecciones tales como la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus o trastorno del apetito, acúfenos y disfunción auditiva.

65 En general, tales procedimientos de selección incluyen producir células apropiadas que expresan los polipéptidos del receptor de la presente invención en la superficie de las mismas. Tales células incluyen células procedentes de mamíferos, de levaduras, de *Drosophila* o de *E. coli*. Las células que expresan un receptor formado por la asociación de las subunidades (HNARA10 y $\alpha 9$) (o la membrana celular que contiene el receptor expresado) se ponen entonces en contacto con un compuesto de ensayo para observar la unión, estimulación o inhibición de una respuesta funcional.

ES 2 358 317 T3

Los ensayos pueden analizar simplemente la unión de un compuesto candidato, en el que la adherencia a las células que llevan un receptor formado por la asociación de las dos subunidades se detecta por medio de una marca asociada directa o indirectamente con el compuesto candidato, o en un ensayo que implica la competición con un competidor marcado. Además, estos ensayos pueden analizar si el compuesto candidato produce o no una señal generada por la activación de un receptor formado por la asociación de las dos subunidades, usando sistemas de detección apropiados para las células que llevan las subunidades en su superficie. Los inhibidores de la activación se ensayan generalmente en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación por el agonista debido a la presencia de un compuesto candidato. Los métodos estándar para realizar tales ensayos de selección son bien entendidos en la técnica.

Los ejemplos de antagonistas potenciales de un receptor formado por la asociación de subunidades HNARA10 y α 9 incluyen anticuerpos o, en algunos casos, oligonucleótidos o proteínas que están estrechamente relacionados con el ligando de las subunidades HNARA10 y α 9, por ejemplo, un fragmento del ligando, o moléculas pequeñas que se unen al receptor pero que no provocan una respuesta, de forma que se evita la actividad del receptor.

La invención proporciona métodos para tratar condiciones anormales relacionadas tanto con una sobre-actividad como con una actividad insuficiente de un receptor formado por la asociación de las subunidades HNARA10 y α 9.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un individuo que necesite un nivel alterado, disminuido o inhibido de la expresión de las subunidades HNARA10 y/o alfa 9 o de la actividad del receptor alfa9/alfa10, que comprende administrar a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un ingrediente activo capaz de alterar o disminuir la expresión de HNARA10 y/o de alfa 9 o la actividad del receptor alfa9/alfa10.

En ese caso, hay disponibles varios métodos. Un método comprende administrar como ingrediente activo un compuesto inhibidor (antagonista) como se ha descrito antes, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz para inhibir la activación mediante el bloqueo de la unión de los ligandos a un receptor formado por la asociación de las subunidades HNARA10 y α 9, o mediante la inhibición de una segunda señal, y aliviar de este modo la condición anormal.

En otro método, se pueden administrar como ingrediente activo las formas solubles de los polipéptidos de subunidades HNARA10 y/o alfa9 todavía capaces de unirse al ligando en competición con las subunidades endógenas HNARA10 y/o alfa9. Las realizaciones típicas de tales competidores comprenden fragmentos de los polipéptidos HNARA10 y/o alfa9.

En otro método más, la expresión del gen que codifica las subunidades endógenas HNARA10 y/o alfa9 se puede inhibir usando técnicas de bloqueo de la expresión. Tales técnicas conocidas incluyen el uso de secuencias antisentido, ya sean generadas internamente o administradas por separado. Véase, por ejemplo, O'Connor, *J Neurochem* (1991) 56:560 en *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Alternativamente, se pueden proporcionar oligonucleótidos que forman hélices triples con el gen. Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (1979) 6:3073; Cooney *et al.*, *Science* (1988) 241:456; Dervan *et al.*, *Science* (1991) 251:1360. Estos oligómeros se pueden administrar *per se* o los oligómeros relevantes se pueden expresar *in vivo*.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un individuo que necesita un aumento del nivel de expresión de HNARA10 y/o alfa9 o de la actividad de alfa9/alfa10, que comprende administrar a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un ingrediente activo capaz de aumentar la expresión de HNARA10 y/o de alfa9 o la actividad del receptor alfa9/alfa10.

En ese caso, también hay disponibles varios métodos. Un método comprende administrar como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que activa el receptor alfa9/alfa10, esto es, un agonista como se ha descrito antes, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para aliviar de este modo la condición anormal.

Alternativamente, se puede emplear terapia génica para efectuar la producción endógena de un receptor alfa9/alfa10 por las células relevantes del sujeto. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención o un polinucleótido alfa 9 o ambos, se pueden preparar para expresión en un vector retroviral defectuoso en replicación, como se ha expuesto antes. Los polinucleótidos constituyen en este caso el ingrediente activo. Se puede aislar entonces la construcción de expresión retroviral y se puede introducir en una célula de empaquetado transducida con un vector plásmido retroviral que contiene RNA que codifica los polipéptidos de la presente invención de tal modo que la célula empaquetadora produce ahora partículas víricas infecciosas que contienen los genes de interés. Estas células productoras se pueden administrar a un sujeto para generar células *in vivo* y la expresión del polipéptido *in vivo*. Para revisión de la terapia génica, véase Chapter 20, *Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches*, (y las referencias citadas allí) en *Human Molecular Genetics*, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para prevenir y/o tratar en un sujeto una enfermedad o la susceptibilidad para una enfermedad relacionada con la actividad de un receptor alfa9/alfa10.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se destinan, pero sin limitarse a ello, al tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer, trastornos de memoria, epilepsia, esquizofrenia, corea, síndrome de Tourette, depresión, dependencia de la nicotina, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson, dolor, cáncer, úlcera gastrointestinal, trastorno de motilidad gastrointestinal, disfunción endocrina, enfermedad degenerativa neuronal, ictus, trastorno del apetito, acúfenos y disfunción auditiva, entre otras.

En un primer aspecto, las composiciones farmacéuticas de la invención para prevenir y/o tratar en un sujeto una enfermedad o la susceptibilidad para una enfermedad relacionada con la sobre-actividad del receptor alfa9/alfa10 o con la sobre-expresión de las subunidades HNARA10 y/o alfa9, pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un antagonista como se ha definido antes, y/o al menos una molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica dichas subunidades (secuencia antisentido) y/o al menos péptidos que compiten con dicho receptor, como se ha expuesto antes.

En un segundo aspecto, las composiciones farmacéuticas de la invención para prevenir y/o tratar en un sujeto una enfermedad o la susceptibilidad para una enfermedad relacionada con la sub-actividad del receptor alfa9/alfa10 o con la sub-expresión de las subunidades HNARA10 y/o alfa9, pueden comprender una cantidad terapéuticamente de al menos un agonista como se ha definido antes, al menos un polinucleótido según la invención y/o un polinucleótido alfa 9 y/o al menos una secuencia nucleotídica según la invención capaz de expresar *in vivo* polipéptidos de las subunidades HNARA10 y/o $\alpha 9$ de la invención.

Las composiciones farmacéuticas en las que al menos se utiliza un polipéptido según la invención pueden comprender los vectores recombinantes de la invención, capaces de expresar *in vivo* un polipéptido según la invención. Los polipéptidos según la invención se pueden usar también “desnudos”, esto es, sin ser insertados en un vector. Se ha demostrado, en efecto, que algunas secuencias de DNA o RNA se pueden expresar en algunos tejidos sin la ayuda de un vector de expresión.

Las composiciones farmacéuticas según la invención, por ejemplo las que comprenden polipéptidos de la invención, tales como la forma soluble de polipéptidos de las subunidades HNARA10 y $\alpha 9$, agonistas y antagonistas o moléculas pequeñas, se pueden formular en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Tales formulaciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o compuesto, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos incluyen, pero sin limitarse a ellos, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y sus combinaciones. La formulación se debe acomodar al modo de administración, y está dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. La invención se refiere además a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas antes.

Los polipéptidos y otros compuestos de la presente invención se pueden emplear solos o conjuntamente con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

Las formas preferidas de administración sistémica de las composiciones farmacéuticas incluyen inyección, típicamente por inyección intravenosa. Se pueden usar otras vías de inyección, tales como subcutánea, intramuscular, intraesternal, intraarterial o intraperitoneal. Los medios alternativos para administración sistémica incluyen administración transmucosal y transdérmica utilizando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. En adición, si se formulan apropiadamente en formulaciones entéricas o encapsuladas, también puede ser posible la administración oral, rectal, intravaginal. La administración de estos compuestos puede ser también tópica y/o local, en forma de bálsamos, pastas, geles y similares.

El intervalo de dosificación requerido depende de la elección de los péptidos, de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la afección del sujeto, y del criterio del médico que le atiende. Las dosis adecuadas, sin embargo, están en el intervalo de $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a $10 \text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ del sujeto. Más preferiblemente, esta dosis está al menos entre $0,01 \text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ y $1 \text{mg}/\text{kg}/\text{día}$. Se pueden esperar variaciones en la dosis necesaria a la vista de la naturaleza de los compuestos utilizados y de las eficiencias variables de las diferentes vías de administración. Por ejemplo, se podría esperar que la administración oral requiera dosis más altas que la administración por inyección intravenosa. Se pueden ajustar las variaciones en estos niveles de dosis usando rutinas empíricas estándar para optimización, como es bien conocido en la técnica.

Los polipéptidos usados en el tratamiento se pueden generar también endógenamente en el sujeto, en modalidades de tratamiento denominadas a menudo como “terapia génica” como se ha descrito antes. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden preparar células de un sujeto con un polinucleótido de la invención y/o con un polinucleótido que codifica el polipéptido alfa9, tal como un DNA o RNA, para codificar un polipéptido *ex vivo*, y por ejemplo, mediante el uso de un vector plásmido retroviral. Se introducen entonces las células en el sujeto.

Los ejemplos que siguen se llevan a cabo utilizando métodos estándar, que son bien conocidos y rutinarios para los expertos en la técnica, excepto cuando se describa otra cosa en detalle. Los ejemplos ilustran, pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Clonación de cDNA de HNARA10

5 Se identificó en primer lugar una secuencia parcial de cDNA de HNARA10 mediante investigación de la homología usando la secuencia proteínica de la subunidad alfa 9 del receptor de acetilcolina de rata (Swissprot número de acceso P43144) frente a la base de datos EST de GeneBank usando el algoritmo tblastn. Se encontró un EST (AA243627) procedente de una genoteca de cDNA de células B de un centro germinal con aproximadamente 50% de homología, que había sido anotado como un precursor putativo de la cadena alfa 9 del receptor neuronal de acetilcolina. La secuenciación completa de este clon demostró que estaba truncado en su extremo 5' y contenía parte (aproximadamente 55%) de la secuencia codificadora de una subunidad de receptor de acetilcolina aparentemente nueva y una región 3' no traducida. La secuencia codificadora 5' que faltaba, se obtuvo por RACE 5' y a partir del DNA genómico humano como se describe en la Figura 5. Los experimentos RACE 5' se llevaron a cabo a partir del clon cDNA AA243627 parcial utilizando cDNA de músculo esquelético humano Marathon-ready™ (Clontech Laboratories, Inc). Sin embargo, todos los productos obtenidos mostraron la presencia de un intrón sin corte ni empalme que no pudo ser pasado por alto por los experimentos RACE. Se obtuvo por tanto la secuencia codificadora situada en 5' de este intrón a partir del DNA genómico humano usando el sistema Genome Walker (Clontech). Se realizaron entonces amplificaciones adicionales por 5' RACE a partir de la secuencia codificadora obtenida de los clones genómicos usando cDNA Marathon-ready™ de músculo esquelético humano que permitió la clonación de la secuencia codificadora completa, aunque se encontró en estos clones otro intrón parcialmente empalmado. Se ensambló entonces una secuencia de HNARA10 codificadora de longitud completa mediante el ligamiento conjunto de los productos de la PCR generados a partir de los clones RACE y clones genómicos, y el clon original AA243627 (Figura 5) en los sitios BamHI-XhoI del vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen Inc). Esta construcción se denominó ha10pcm7. La secuencia del gen se confirmó por la secuenciación de doble cadena de al menos 3 clones de cada uno de los clones RACE o genómicos descritos antes y por la secuenciación del clon cDNA completo después del ensamblaje. Una investigación de ataque de esta secuencia sobre GenBank release 98 demostró que este gen era realmente completamente nuevo. Una investigación similar sobre la base de datos EST de GenBank demostró la presencia de otros 15 EST que contienen una secuencia parcial altamente similar a HNARA10 (GenBank números de acceso AA005001, AA491394, AA937958, AA968615, AI002645, AA262389, AI146549, AI139700, AI359800, AI939323, AI673104, AI660069, AW207378, AW135678, AW149737). Ninguno de ellos contenía la secuencia codificadora 5' del gen HNARA10 que corresponde a los primeros 66 aminoácidos. Además, todas las secuencias EST que corresponden a la región codificadora de los aminoácidos 67 a 130 de la proteína HNARA10 demostraron la presencia de intrones sin corte ni empalme.

Ejemplo 2

Distribución en los tejidos del mRNA de HNARA10

40 Los análisis de mRNA por transferencia de puntos (*dot blot*) y transferencia Northern se llevaron a cabo para examinar la expresión del gen HNARA10 en tejidos humanos, utilizando los métodos descritos, entre otros, por Sambrook *et al.*, citado antes. Una sonda de cDNA producida por digestión de la construcción ha10pcm7 con las enzimas de restricción SacI y XhoI y que contiene parte del extremo 3' no codificador del cDNA de HNARA10 fue marcada con ³²P utilizando el sistema de marcaje Megaprime™ (Amersham Pharmacia Biotech), según las instrucciones del fabricante. Después del marcaje, se purificó la sonda utilizando una columna Chroma Spin-100™ (Clontech Laboratories, Inc), según el protocolo del fabricante. Se utilizó entonces la sonda marcada purificada para examinar diferentes tejidos humanos en cuanto al mRNA de HNARA10.

50 Se examinó un RNA Master blot™ (Clontech Laboratories, Inc) humano que contenía mRNA de 50 tejidos humanos diferentes, con la sonda marcada utilizando la solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Después de hibridación y lavado, se expuso la transferencia a un cribado con fósforo durante 48 horas antes de un barrido con un procesador de imágenes de fósforo STORM (Molecular Dynamics) según los procedimientos recomendados por el fabricante. Los resultados (Figura 6) muestran principalmente una expresión específica fuerte de mRNA de HNARA10 en el músculo esquelético. A un nivel bajo de expresión, apenas por encima del ruido de fondo, se detectó también en algunos otros tejidos.

60 Se examinó también una transferencia Northern de tejido múltiple (MTN) humano (Clontech) que contenía mRNA de 8 tejidos humanos diferentes, con la sonda marcada utilizando la solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Después de hibridación y lavado, se expuso la transferencia a un cribado con fósforo durante 96 horas antes de un barrido con un procesador de imágenes de fósforo STORM (Molecular Dynamics) según los procedimientos recomendados por el fabricante. Los resultados (Figura 7) confirman la fuerte expresión de mRNA de HNARA10 en el músculo esquelético en el que estaba marcado un mRNA de 6,4 kb. Se detectó también un mRNA de tamaño similar en el tejido cardíaco, aunque a un nivel de expresión mucho más bajo.

65 Debido a su similitud con la subunidad $\alpha 9$ que se expresa en la hipófisis de la rata, se estudió también la presencia de mRNA $\alpha 9$ y HNARA10 en la hipófisis humana por RT-PCR. Los cebadores específicos de $\alpha 9$ y HNARA10 fueron diseñados para detectar la presencia de transcritos $\alpha 9$ y HNARA10 con cortes y empalmes correctos. Se llevó a cabo la transcripción inversa sobre el mRNA de la hipófisis humana y se realizaron 45 ciclos de amplificación por PCR sobre

el cDNA resultante. Se obtuvieron los productos de la PCR correspondientes al cDNA $\alpha 9$ y HNARA10 amplificado, lo que indica que ambas subunidades estaban expresadas en la hipófisis humana.

5 Ejemplo 3

Caracterización funcional de nAChR que contiene HNARA10

En oocitos de *Xenopus laevis* se analizó si la subunidad HNARA10 era o no capaz de formar receptores funcionales de acetilcolina. La inyección de cDNA de HNARA10 en los núcleos de los oocitos de *Xenopus* falló en la generación de receptores funcionales activados por acetilcolina (ACh). La aplicación de concentraciones de ACh hasta 1 mM no provocó corrientes en las células inyectadas con esta subunidad sola. Además, no se observaron corrientes provocadas por ACh en los oocitos co-inyectados con los cDNA de las subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$ de HNARA10 y humanas. Por contraste, se registraron corrientes fuertes provocadas por ACh en los oocitos inyectados con los cDNA humanos de $\alpha 9$ (GenBank número de acceso AJ243342) y de HNARA10. La comparación de la amplitud de las corrientes provocadas por acetilcolina en los oocitos inyectados con $\alpha 9$ sola (Fig. 8A) o con la mezcla de $\alpha 9$ -HNARA10 reveló un notable aumento (aproximadamente cien veces) en la respuesta al agonista cuando estaba presente HNARA10 (Fig. 8B). Para examinar además el papel funcional de HNARA10, se compararon el perfil fisiológico y farmacológico de los receptores reconstituidos en los oocitos inyectados con $\alpha 9$ sola o con la mezcla de $\alpha 9$ -HNARA10. Aunque es sabido que la acetilcolina es el agonista natural de los receptores que contienen $\alpha 9$ y que éstos son inhibidos por la nicotina (Elgoyhen *et al.*, Cell 79: 705-715 (1994)) hay poca información disponible con respecto a otros agonistas. Recientemente se ha demostrado que la colina en el intervalo milimolar es un potente agonista de los receptores homoméricos $\alpha 7$ (Alkondon *et al.*, Eur. J. Neurosci. 9: 2734-2742 (1997)). La comparación de las curvas dosis-respuesta de las corrientes provocadas o por ACh o por colina no revela diferencias significativas entre los oocitos inyectados con $\alpha 9$ sola o con la mezcla de $\alpha 9$ -HNARA10 mientras que la amplitud de las corrientes provocadas fue notablemente más alta en los oocitos que expresan la mezcla de las dos subunidades. Las curvas dosis-respuesta obtenidas con carbacol ilustran además que, como se espera de $\alpha 9$, este compuesto es un agonista parcial que provoca aproximadamente el 72% en los oocitos que expresan la mezcla de $\alpha 9$ -HNARA10. No se observó una modificación significativa de la duración de las corrientes provocadas por estos agonistas entre los oocitos que expresan $\alpha 9$ y $\alpha 9$ -HNARA10.

Otros agonistas típicos de los receptores nicotínicos tales como nicotina, epibatidina o DMPP no provocaron ninguna respuesta ni en los oocitos que expresan $\alpha 9$ ni en los que expresan $\alpha 9$ +HNARA10.

Se ensayó también el efecto de la alfa-bungarotoxina (α -bgt) del veneno de serpiente. Esta toxina bloquea de una manera casi irreversible los nAChR $\alpha 7$ homoméricos (Palma *et al.* J. physiol 491: 151-161 (1996)) pero se ha descrito una unión reversible α -bgt sobre los receptores nicotínicos de las células ciliadas externas de la cóclea del conejillo de Indias sin embargo, que expresa la subunidad $\alpha 9$ (Lawoko *et al.* Neurosci. Lett. 195:64-68 (1995)). Los receptores heteroméricos $\alpha 9$ -HNARA10 fueron bloqueados por α -bgt a una concentración aproximadamente 10 veces más alta (concentración semi-inhibidora (IC_{50}) de 18 nM) que la requerida para los receptores $\alpha 9$ ($IC_{50} = 2,1$ nM) pero, de forma interesante, este bloqueo fue invertido totalmente después de un minuto de lavado, una propiedad compartida también con los receptores $\alpha 9$ homoméricos. El antagonista no competitivo d-tubocurarina también antagonizó completamente las respuestas a ACh de los receptores $\alpha 9$ +HNARA10 así como las de los receptores $\alpha 9$, aunque las curvas de inhibición dependiente de la concentración no fueron idénticas. Por contraste, el antagonista competitivo dihidro- β -eritroidina, que bloquea los nAChR neuronales heteroméricos, no tuvo ningún efecto.

Estos resultados demuestran que HNARA10, a pesar de su semejanza con las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ de nAChR, no es capaz de formar un receptor homomérico funcional pero es esencial para hacer completamente funcionales los nAChR que contienen alfa9. Esto da a entender que las dos subunidades $\alpha 9$ y HNARA10 están probablemente asociadas *in vivo*.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina alfa9/alfa10, que comprende:

(a) poner en contacto una célula hospedante modificada con un compuesto candidato; y

(b) determinar si el compuesto candidato tiene o no algún efecto sobre una señal generada por activación del receptor alfa9/alfa10;

en el que la célula hospedante modificada contiene un sistema de expresión que comprende una molécula de DNA o RNA que constituye un vector recombinante, que comprende un sistema de expresión que es capaz de producir un polipéptido HNARA10 y un polipéptido alfa9 cuando dicho sistema de expresión está presente en una célula hospedante compatible,

y en el que el sistema de expresión que es capaz de producir un polipéptido HNARA10 comprende:

(a) la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1;

(b) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 presentada en la SEQ ID NO: 2;

(c) la secuencia nucleotídica que comprende la secuencia localizada entre los nucleótidos números 43 a 1392 presentada en la SEQ ID NO: 1;

(d) la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos desde aproximadamente 179 hasta aproximadamente 196 presentada en la SEQ ID NO: 2;

(e) la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos desde aproximadamente 357 hasta aproximadamente 374 presentada en la SEQ ID NO: 2;

(f) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 expresada por el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315;

(g) una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse con la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1 o con el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315;

(h) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 maduro expresada por el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315; o

(i) una secuencia nucleotídica complementaria de cualquiera de las secuencias nucleotídicas definidas en los puntos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) o (h) anteriores, así como fragmentos, variantes, derivados y formas mutadas de estas secuencias nucleotídicas.

2. Un método para identificar antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina alfa9/alfa10, que comprende:

(a) poner en contacto una célula hospedante modificada con un agonista; y

(b) determinar si la señal generada por dicho agonista disminuye o no en presencia de un compuesto candidato;

en el que la célula hospedante modificada contiene un sistema de expresión que comprende una molécula de DNA o RNA que constituye un vector recombinante, que comprende un sistema de expresión que es capaz de producir un polipéptido HNARA10 y un polipéptido alfa9 cuando dicho sistema de expresión está presente en una célula hospedante compatible,

y en el que el sistema de expresión que es capaz de producir un polipéptido HNARA10 comprende:

(a) la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1;

(b) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 presentada en la SEQ ID NO: 2;

(c) la secuencia nucleotídica que comprende la secuencia localizada entre los nucleótidos números 43 a 1392 presentada en la SEQ ID NO: 1;

(d) la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos desde aproximadamente 179 hasta aproximadamente 196 presentada en la SEQ ID NO: 2;

ES 2 358 317 T3

(e) la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos desde aproximadamente 357 hasta aproximadamente 374 presentada en la SEQ ID NO: 2;

5 (f) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 expresada por el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315;

(g) una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse con la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID NO: 1 o con el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315;

10 (h) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido HNARA10 maduro expresada por el clon cDNA contenido en la ATCC número de depósito PTA-315; o

15 (i) una secuencia nucleotídica complementaria a cualquiera de las secuencias nucleotídicas definidas en los puntos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) o (h) anteriores, así como fragmentos, variantes, derivados y formas mutadas de estas secuencias nucleotídicas.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el polinucleótido es DNA o RNA.

20 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia nucleotídica tiene al menos un 80% de identidad con la contenida en la SEQ ID NO: 1.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el polinucleótido es el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

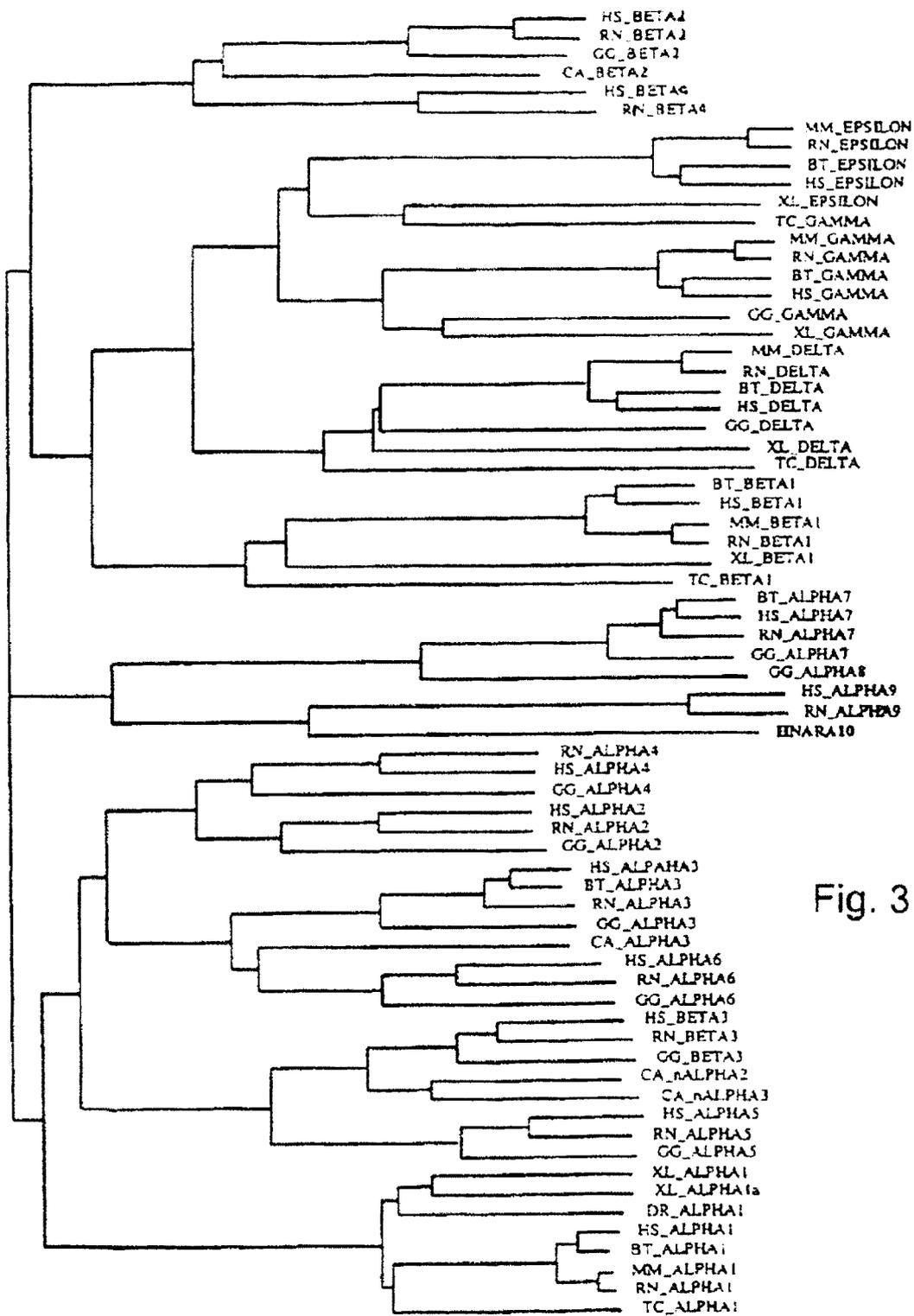
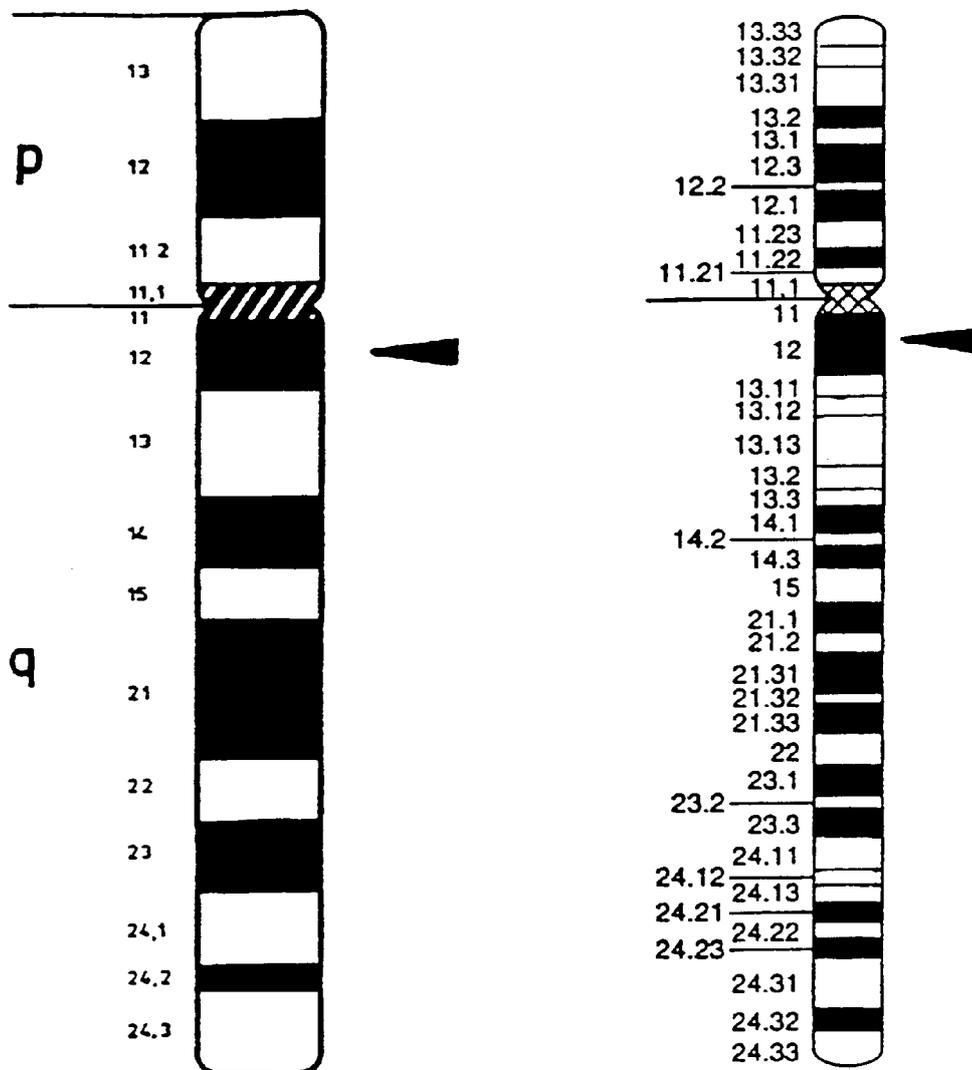


Fig. 3

HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)



12

Fig. 4

HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)

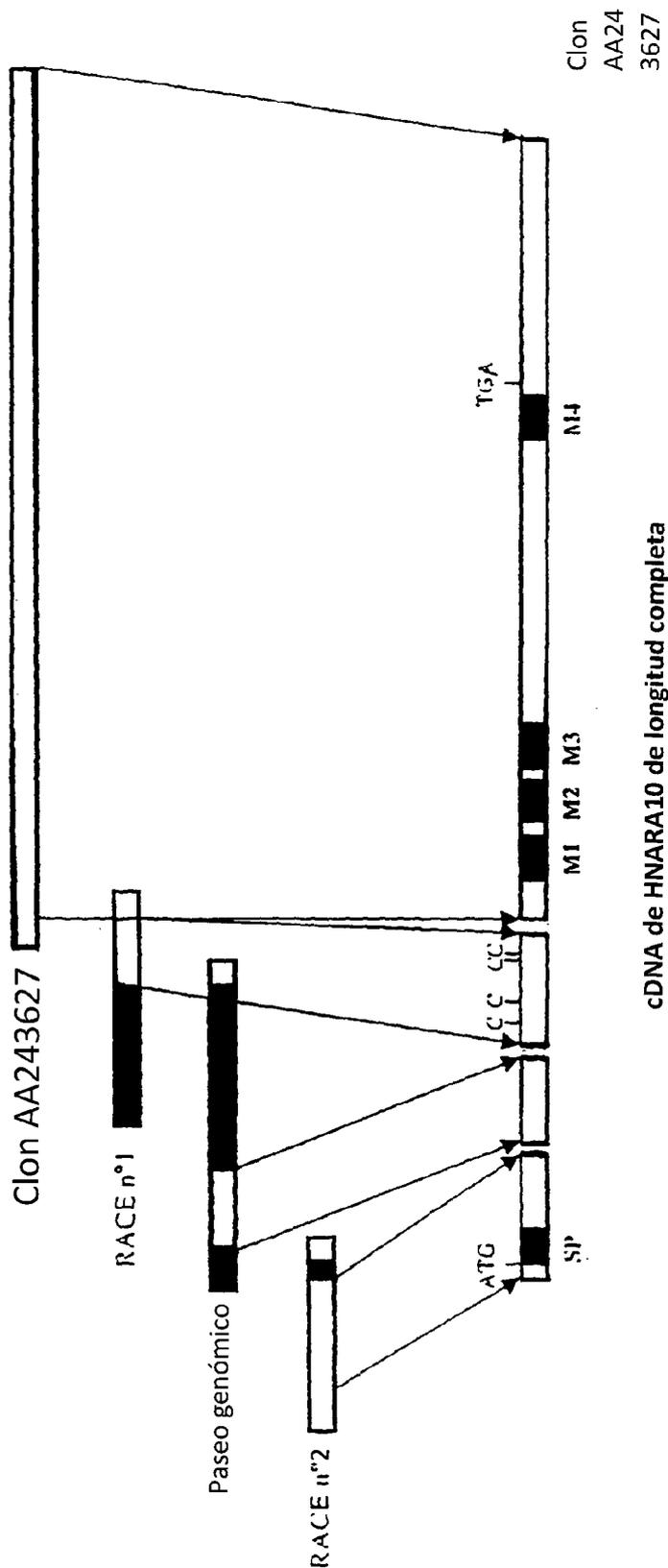


Fig. 5

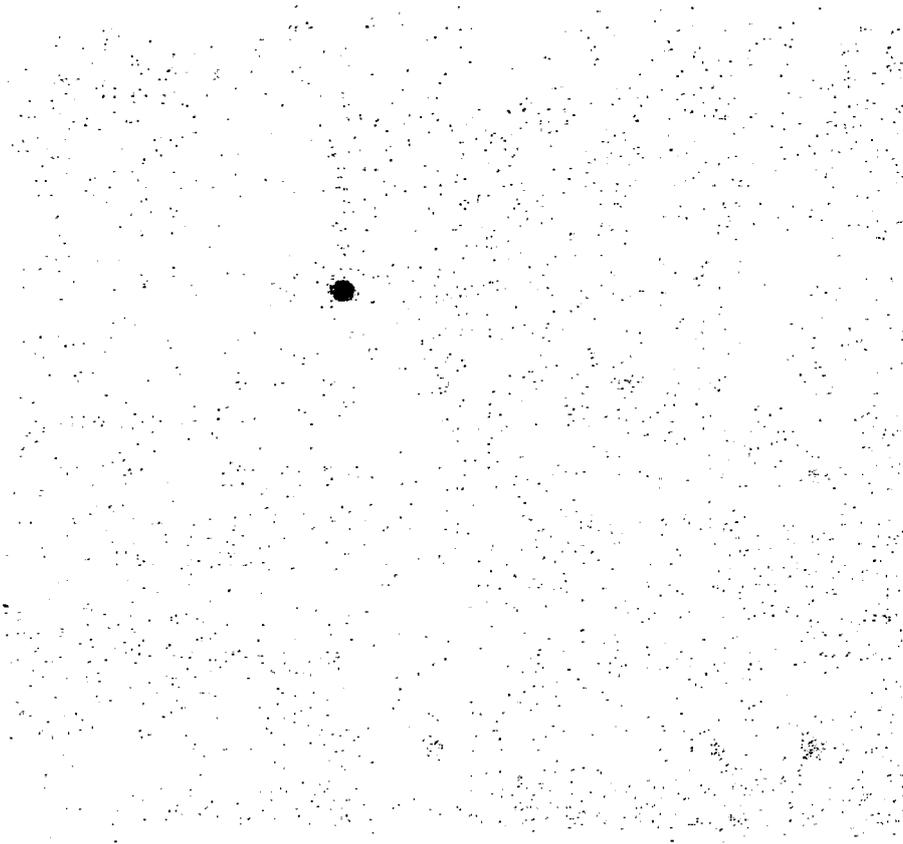


Fig 6a

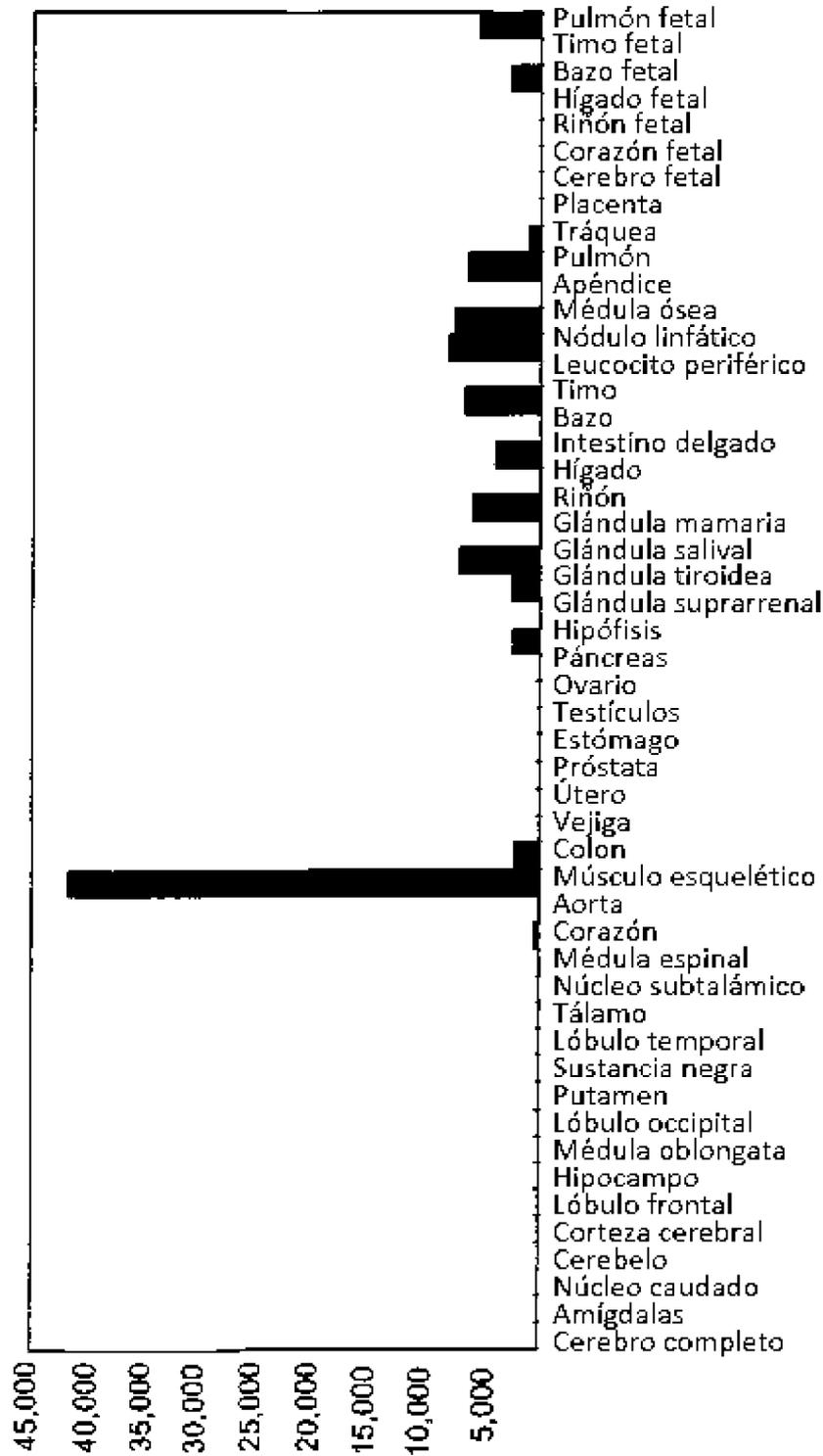


Fig. 6b

HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)

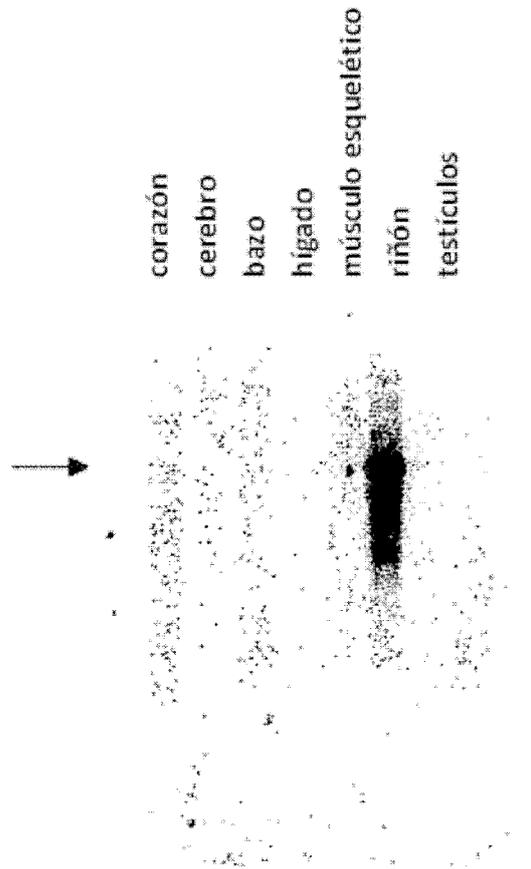
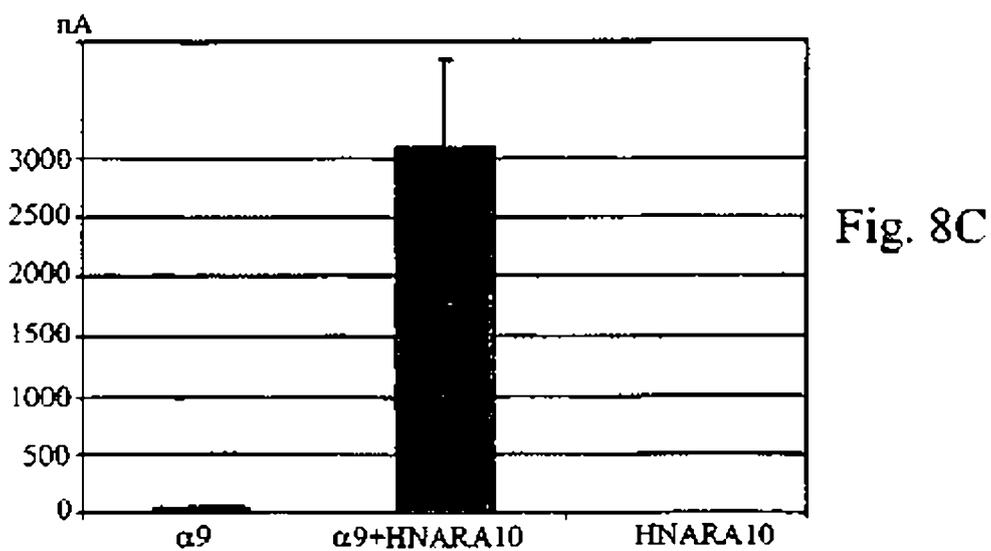
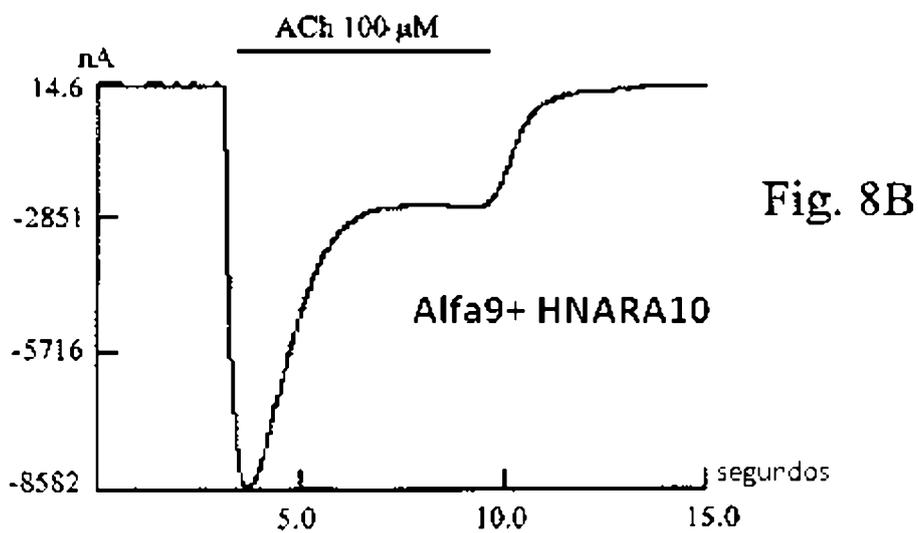
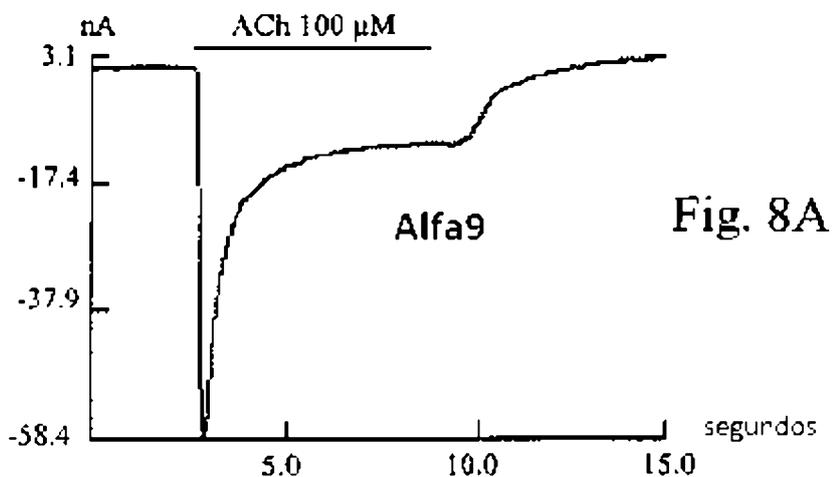


Fig 7



HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)

ES 2 358 317 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SANOFI-SYNTHELABO

<120> Nueva subunidad de receptor nicotínico de acetilcolina, su aislamiento y su uso

<130> HNARA10t

<140>

<141>

<160>2

<170> PatentIn Ver. 2,1

<210> 1

<211> 1932

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1392)

<400> 1

25	tcacatccag agacctgccc ccgctcttgc agtgccaggg cc atg ggg ctc cgg	54
	Met Gly Leu Arg	
	1	
30	agc cac cac ctc agc ctg ggc ctt ctg ctt ctg ttt cta ctc cct gca	102
	Ser His His Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ala	
	5 10 15 20	
35	gag tgc ctg gga gct gag ggc cgg ctg gct ctc aag ctg ttc cgt gac	150
	Glu Cys Leu Gly Ala Glu Gly Arg Leu Ala Leu Lys Leu Phe Arg Asp	
	25 30 35	
40	ctc ttt gcc aac tac aca agt gcc ctg aga cct gtg gca gac aca gac	198
	Leu Phe Ala Asn Tyr Thr Ser Ala Leu Arg Pro Val Ala Asp Thr Asp	
	40 45 50	
45	cag act ctg aat gtg acc ctg gag gtg aca ctg tcc cag atc atc gat	246
	Gln Thr Leu Asn Val Thr Leu Glu Val Thr Leu Ser Gln Ile Ile Asp	
	55 60 65	
50	atg gat gaa cgg aac cag gtg ctg acc ctg tat ctg tgg ata cgg cag	294
	Met Asp Glu Arg Asn Gln Val Leu Thr Leu Tyr Leu Trp Ile Arg Gln	
	70 75 80	
55	gag tgg aca gat gcc tac cta cga tgg gac ccc aat gcc tat ggt ggc	342
	Glu Trp Thr Asp Ala Tyr Leu Arg Trp Asp Pro Asn Ala Tyr Gly Gly	
	85 90 95 100	
60	ctg gat gcc atc cgc atc ccc agc agt ctt gtg tgg cgg cca gac atc	390
	Leu Asp Ala Ile Arg Ile Pro Ser Ser Leu Val Trp Arg Pro Asp Ile	
	105 110 115	
65	gta ctc tat aac aag gcc gac gcg cag cct cca ggt tcc gcc agc acc	438
	Val Leu Tyr Asn Lys Ala Asp Ala Gln Pro Pro Gly Ser Ala Ser Thr	
	120 125 130	
70	aac ctg gtc ctg cgc cac gat ggc gcc gtg cgc tgg gac gcg ccg gcc	486

65

ES 2 358 317 T3

	Asn Val Val Leu Arg His Asp Gly Ala Val Arg Trp Asp Ala Pro Ala	
	135 140 145	
5	atc acg cgc agc tcg tgc cgc gtg gat gta gca gcc ttc ccg ttc gac Ile Thr Arg Ser Ser Cys Arg Val Asp Val Ala Ala Phe Pro Phe Asp	534
	150 155 160	
10	gcc cag cac tgc ggc ctg acg ttc ggc tcc tgg act cac ggc ggg cac Ala Gln His Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ser Trp Thr His Gly Gly His	582
	165 170 175 180	
15	caa ctg gat gtg cgg ccg cgc ggc gct gca gcc agc ctg gcg gac ttc Gln Leu Asp Val Arg Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Leu Ala Asp Phe	630
	185 190 195	
20	gtg gag aac gtg gag tgg cgc gtg ctg ggc atg ccg gcg cgg cgg cgc Val Glu Asn Val Glu Trp Arg Val Leu Gly Met Pro Ala Arg Arg Arg	678
	200 205 210	
25	gtg ctc acc tac ggc tgc tgc tcc gag ccc tac ccc gac gtc acc ttc Val Leu Thr Tyr Gly Cys Cys Ser Glu Pro Tyr Pro Asp Val Thr Phe	726
	215 220 225	
30	acg ctg ctg ctg cgc cgc cgc gcc gcc gcc tac gtg tgc aac ctg ctg Thr Leu Leu Leu Arg Arg Arg Ala Ala Ala Tyr Val Cys Asn Leu Leu	774
	230 235 240	
35	ctg ccc tgc gtg ctc atc tcg ctg ctt gcg ccg ctc gcc ttc cac ctg Leu Pro Cys Val Leu Ile Ser Leu Leu Ala Pro Leu Ala Phe His Leu	822
	245 250 255 260	
40	cct gcc gac tca ggc gag aag gtg tcg ctg ggc gtc acc gtg ctg ctg Pro Ala Asp Ser Gly Glu Lys Val Ser Leu Gly Val Thr Val Leu Leu	870
	265 270 275	
45	gcg ctc acc gtc ttc cag ttg ctg ctg gcc gag agc atg cca ccg gcc Ala Leu Thr Val Phe Gln Leu Leu Leu Ala Glu Ser Met Pro Pro Ala	918
	280 285 290	
50	gag agc gtg ccg ctc atc ggg aag tat tac atg gcc act atg acc atg Glu Ser Val Pro Leu Ile Gly Lys Tyr Tyr Met Ala Thr Met Thr Met	966
	295 300 305	
55	gtc aca ttc tca aca gca ctc acc atc ctt atc atg aac ctg cat tac Val Thr Phe Ser Thr Ala Leu Thr Ile Leu Ile Met Asn Leu His Tyr	1014
	310 315 320	
60	tgt ggt ccc agt gtc cgc cca gtg cca gcc tgg gct agg gcc ctc ctg Cys Gly Pro Ser Val Arg Pro Val Pro Ala Trp Ala Arg Ala Leu Leu	1062
	325 330 335 340	
65	ctg gga cac ctg gca cgg ggc ctg tgc gtg cgg gaa aga ggg gag ccc Leu Gly His Leu Ala Arg Gly Leu Cys Val Arg Glu Arg Gly Glu Pro	1110
	345 350 355	
70	tgt ggg cag tcc agg cca cct gag tta tct cct agc ccc cag tcg cct Cys Gly Gln Ser Arg Pro Pro Glu Leu Ser Pro Ser Pro Gln Ser Pro	1158
	360 365 370	
75	gaa gga ggg gct ggc ccc cca gcg ggc cct tgc cac gag cca cga tgt Glu Gly Gly Ala Gly Pro Pro Ala Gly Pro Cys His Glu Pro Arg Cys	1206
	375 380 385	
80	ctg tgc cgc cag gaa gcc cta ctg cac cac gta gcc acc att gcc aat	1254

ES 2 358 317 T3

Leu Cys Arg Gln Glu Ala Leu Leu His His Val Ala Thr Ile Ala Asn
 390 395 400

5 acc ttc cgc agc cac cga gct gcc cag cgc tgc cat gag gac tgg aag 1302
 Thr Phe Arg Ser His Arg Ala Ala Gln Arg Cys His Glu Asp Trp Lys
 405 410 415 420

10 cgc ctg gcc cgt gtg atg gac cgc ttc ttc ctg gcc atc ttc ttc tcc 1350
 Arg Leu Ala Arg Val Met Asp Arg Phe Phe Leu Ala Ile Phe Phe Ser
 425 430 435

15 atg gcc ctg gtc atg agc ctc ctg gtg ctg gtg cag gcc ctg 1392
 Met Ala Leu Val Met Ser Leu Leu Val Leu Val Gln Ala Leu
 440 445 450

20 tgagggtctg gactaaqtca cagggatctg ctgcagccac agctctcca gaaagggaca 1452
 gccacggcca agtggttgct ggtctttggg ccagccagtc tctccccact gtccttaaga 1512
 tcttgagaca cttgacttca caatccacaa gggagcactc attgtctaca caccctaact 1572

25 aaaggaagtc cagagcctgc cactccccta attccaaaaa aaagaggaac tctacaaagg 1632
 ccaagatcac agagtacagt cttggagggg cagaattggt tgtgctgggt attggagctc 1692
 tcagtgggga gcacatgggt tataatgaga aactgaactg tactgctgca tttcctgtct 1752

30 tcttctctag gtggctgctt tgcagggctt tggctgttac cttccctgc tgaggggctc 1812
 agggaaaagg gtgggggatt ctcagtcag tttccagagc aggaggccct acagacattt 1872
 cgccccaaat ccctgactca ataaagtaag cgtgtacctg gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1932

<210> 2

<211> 450

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

40 Met Gly Leu Arg Ser His His Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

45 Leu Leu Pro Ala Glu Cys Leu Gly Ala Glu Gly Arg Leu Ala Leu Lys
 20 25 30

50 Leu Phe Arg Asp Leu Phe Ala Asn Tyr Thr Ser Ala Leu Arg Pro Val
 35 40 45

55 Ala Asp Thr Asp Gln Thr Leu Asn Val Thr Leu Glu Val Thr Leu Ser
 50 55 60

60 Gln Ile Ile Asp Met Asp Glu Arg Asn Gln Val Leu Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

65 Trp Ile Arg Gln Glu Trp Thr Asp Ala Tyr Leu Arg Trp Asp Pro Asn
 85 90 95

70 Ala Tyr Gly Gly Leu Asp Ala Ile Arg Ile Pro Ser Ser Leu Val Trp
 100 105 110

75 Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Lys Ala Asp Ala Gln Pro Pro Gly
 115 120 125

ES 2 358 317 T3

Ser Ala Ser Thr Asn Val Val Leu Arg His Asp Gly Ala Val Arg Trp
 130 135 140
 5 Asp Ala Pro Ala Ile Thr Arg Ser Ser Cys Arg Val Asp Val Ala Ala
 145 150 155 160
 Phe Pro Phe Asp Ala Gln His Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ser Trp Thr
 165 170 175
 10 His Gly Gly His Gln Leu Asp Val Arg Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser
 180 185 190
 Leu Ala Asp Phe Val Glu Asn Val Glu Trp Arg Val Leu Gly Met Pro
 195 200 205
 15 Ala Arg Arg Arg Val Leu Thr Tyr Gly Cys Cys Ser Glu Pro Tyr Pro
 210 215 220
 20 Asp Val Thr Phe Thr Leu Leu Leu Arg Arg Arg Ala Ala Ala Tyr Val
 225 230 235 240
 Cys Asn Leu Leu Leu Pro Cys Val Leu Ile Ser Leu Leu Ala Pro Leu
 245 250 255
 25 Ala Phe His Leu Pro Ala Asp Ser Gly Glu Lys Val Ser Leu Gly Val
 260 265 270
 Thr Val Leu Leu Ala Leu Thr Val Phe Gln Leu Leu Leu Ala Glu Ser
 275 280 285
 30 Met Pro Pro Ala Glu Ser Val Pro Leu Ile Gly Lys Tyr Tyr Met Ala
 290 295 300
 35 Thr Met Thr Met Val Thr Phe Ser Thr Ala Leu Thr Ile Leu Ile Met
 305 310 315 320
 Asn Leu His Tyr Cys Gly Pro Ser Val Arg Pro Val Pro Ala Trp Ala
 325 330 335
 40 Arg Ala Leu Leu Leu Gly His Leu Ala Arg Gly Leu Cys Val Arg Glu
 340 345 350
 Arg Gly Glu Pro Cys Gly Gln Ser Arg Pro Pro Glu Leu Ser Pro Ser
 355 360 365
 45 Pro Gln Ser Pro Glu Gly Gly Ala Gly Pro Pro Ala Gly Pro Cys His
 370 375 380
 50 Glu Pro Arg Cys Leu Cys Arg Gln Glu Ala Leu Leu His His Val Ala
 385 390 395 400
 Thr Ile Ala Asn Thr Phe Arg Ser His Arg Ala Ala Gln Arg Cys His
 405 410 415
 55 Glu Asp Trp Lys Arg Leu Ala Arg Val Met Asp Arg Phe Phe Leu Ala
 420 425 430
 60 Ile Phe Phe Ser Met Ala Leu Val Met Ser Leu Leu Val Leu Val Gln
 435 440 445
 Ala Leu
 450
 65