

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 417**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01924111 .6**
96 Fecha de presentación: **02.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1266003**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **KCNB: una proteína del canal de potasio**

30 Prioridad:
03.03.2000 US 186915 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2012

73 Titular/es:
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:
MU, David y
POWERS, Scott

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 378 417 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

KCNB: una proteína del canal de potasio.

Antecedentes de la invención

5 Los canales de iones de potasio (canales de K^+) son proteínas transmembrana ubicuas que son los determinantes principales del potencial de membrana, es decir, la diferencia de voltaje que está presente a través de las membranas plasmáticas de casi todas las células animales. En células excitables, los canales de K^+ definen la frecuencia y duración de potenciales de acción, y desempeñan una función fundamental en la integración neuronal, la contracción muscular y la secreción hormonal. En células no excitables, los canales de K^+ son fundamentales para el mantenimiento de los potenciales de membrana y la regulación del volumen celular. Por tanto, estos canales son
10 dianas importantes para el desarrollo de moduladores que se pueden usar para regular la electrofisiología celular fundamental, en particular para su uso en aplicaciones terapéuticas.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de detectar de la presencia de una molécula de ácido nucleico del KCNB que tiene una identidad de secuencia de ácidos nucleicos mayor de un 90 % a lo largo de su longitud con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos establecida en la SEC. ID NO: 2, en la que un incremento de 1,5 veces o más del ácido nucleico del KCNB detectado cuando se compara con el normal indica la presencia de células cancerosas.
15

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico del KCNB que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos del ácido nucleico que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2 a 5, en la que un incremento de 1,5 veces o más del ácido nucleico del KCNB detectado cuando se compara con el normal indica la presencia de células cancerosas.
20

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

25 detectar una sobreexpresión de un polipéptido del KCNB que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % a lo largo de su longitud con respecto a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 en la muestra, en la que un incremento de 1,5 veces o más del polipéptido del KCNB detectado cuando se compara con el normal indica la presencia de células cancerosas.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

30 detectar una sobreexpresión de un polipéptido del KCNB que tiene al menos 50 péptidos contiguos de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 en la muestra, en la que un incremento de 1,5 veces o más del polipéptido del KCNB detectado cuando se compara con el normal indica la presencia de células cancerosas.

35 Además, en otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del KCNB que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de un 90 % a lo largo de su longitud con respecto a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 para detectar células cancerosas en una muestra biológica de mamífero.

40 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del KCNB que comprende al menos 50 péptidos contiguos de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 para detectar células cancerosas en una muestra biológica de mamífero.

45 La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican una proteína del canal de K^+ , KCNB (canal de potasio expresado en la mama). Las secuencias dadas a conocer en el presente documento se pueden usar para cualquiera de una serie de objetivos, incluyendo para la detección específica de células que expresan el KCNB, para la identificación de moléculas que se asocian con y/o modulan la actividad del KCNB, o, y de acuerdo con la invención, para el diagnóstico de cualquiera de una serie de afecciones asociadas con la actividad del canal de K^+ o la expresión, por ejemplo, cáncer. El ácido nucleico y el receptor novedoso que lo codifica se denominan en el presente documento, entre otros, KCNB.

50 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En una realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido que se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados contra una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una actividad de canal de potasio. En otra realización, el ácido nucleico codifica una proteína que comprende una secuencia de
55 aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5 o se puede amplificar por cebadores que se hibridan específicamente bajo condiciones restrictivas a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que se hibrida específicamente bajo condiciones de hibridación restrictivas a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una identidad de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en la que el ácido nucleico se hibrida de forma selectiva bajo condiciones de hibridación moderadamente restrictivas a una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

15 En otra realización, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, el polipéptido se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados contra la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el polipéptido tiene una actividad de canal de potasio. En una realización adicional, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido que comprende una identidad de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped transfectada con el vector.

25 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de identificación de un compuesto que modula la actividad del canal de potasio, comprendiendo el procedimiento: (i) poner en contacto el compuesto con un polipéptido que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la SEQ ID NO: 1; y ii) determinar el efecto funcional del compuesto sobre el polipéptido. En una realización, el polipéptido está unido a una fase sólida, por ejemplo, unido covalentemente a una fase sólida.

30 En una realización, el efecto funcional se determina midiendo los cambios en el flujo de iones. En otra realización, el efecto funcional se determina midiendo la unión del compuesto al polipéptido. En otra realización, el polipéptido es recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o se expresa en una célula o membrana celular. La célula puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una neurona.

35 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de identificación de un modulador de actividad KCNB, comprendiendo el procedimiento: (i) poner en contacto un KCNB con un modulador candidato, y (ii) determinar si el modulador candidato tiene un efecto funcional sobre el KCNB. En una realización, el KCNB comprende un polipéptido que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el KCNB comprende un polipéptido que tiene al menos 30 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el KCNB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el KCNB tiene una actividad de canal de potasio o está unido, por ejemplo, unido covalentemente a una fase sólida.

En algunas realizaciones, el efecto funcional se determina midiendo un cambio en el flujo de iones o midiendo la unión del compuesto al KCNB.

45 En otra realización, el polipéptido se expresa en una célula o membrana celular. La célula puede ser una célula eucariota, tal como una neurona o una célula tumoral, En una realización, la célula eucariota es una célula tumoral en la que se amplifica el KCNB en la célula o membrana celular en comparación con el normal.

50 La invención proporciona un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de un mamífero, a menudo un ser humano, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) proporcionar la muestra biológica del mamífero; y (ii) detectar una molécula de ácido nucleico del KCNB en una muestra del mamífero, en la que un incremento del ácido nucleico del KCNB en la muestra en comparación con el normal indica la presencia de células cancerosas. En una realización, la molécula de ácido nucleico del KCNB comprende una identidad de secuencia de ácidos nucleicos mayor de un 70 % con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En otra realización, la molécula de ácido nucleico del KCNB comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5) En una realización alternativa, la secuencia de ácidos nucleicos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

En otra realización, la etapa de detección comprende además: a) poner en contacto el gen con una sonda que se hibrida de forma selectiva a la molécula de ácido nucleico del KCNB bajo condiciones en las que la sonda se hibrida de forma selectiva al gen para formar un complejo de hibridación estable; y (b) detectar el complejo de hibridación. En una realización, la etapa de puesta en contacto comprende además una etapa de amplificación de la molécula de ácido nucleico del KCNB en una reacción de amplificación. En alguna realización, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa.

En otra realización, las células cancerosas son células seleccionadas del grupo que consiste en células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon y células de cáncer de próstata. A menudo, las células cancerosas son células de cáncer de mama o células de cáncer de pulmón,

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de un mamífero, a menudo un ser humano, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) proporcionar la muestra biológica del mamífero; y (ii) detectar una sobreexpresión de un polipéptido del KCNB, detectando de este modo la presencia de células cancerosas en la muestra biológica. En una realización, el polipéptido del KCNB comprende una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el polipéptido del KCNB comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el polipéptido se detecta usando un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido. A menudo, el polipéptido se cuantifica por inmunoensayo.

En algunas realizaciones, las células cancerosas son células seleccionadas del grupo que consiste en células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon y células de cáncer de próstata. Con frecuencia, las células cancerosas son células de cáncer de mama o de pulmón,

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición de la proliferación de una célula cancerosa que sobreexpresa un polipéptido del KCNB que comprende una identidad de aminoácidos de al menos un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la SEQ ID NO: 1, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor del polipéptido del KCNB. En algunas realizaciones, la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, de pulmón, de colon o de próstata. A menudo, la célula cancerosa es una célula de cáncer de mama o célula de cáncer de pulmón. En una realización, el polipéptido del KCNB tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo o un polinucleótido antisentido.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno asociado al KCNB, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador del KCNB.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección asociada con una proteína del canal de potasio, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido del canal de potasio aislado que comprende una identidad de aminoácidos mayor de un 70 %, a menudo una identidad de secuencia mayor de un 90 % o de un 95 %, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En un aspecto de la realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido, en el que el ácido nucleico se hibrida específicamente bajo condiciones de hibridación restrictivas a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

40 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios del KCNB (SEQ ID NO: 1). También se muestra la homología con la secuencia de aminoácidos de KCNK3 (SEQ ID NO: 15).

La figura 2 es un dibujo esquemático del epicentro de amplificación de ADN genómico y mapa físico en el locus del KCNB. El eje x muestra 10 marcadores en una región del cromosoma humano 8q24.3. El eje y representa el número de copias de ADN para cada marcador definido en el eje x. El gen del KCNB se indica por una flecha. Los clones de ADN genómico humano no están a la escala de los tamaños de clones reales. Los 10 marcadores están colocados en intervalos iguales, no a la escala de la distancia real, por propósitos de visualización.

La figura 3 ilustra la expresión del KCNB funcional en células COS-7. Los cuadrados representan la curva I-V de las células transfectadas con KCNB. Los círculos cerrados representan la señal generada a partir de las células transfectadas con un control de plásmido que carece de la inserción del KCNB.

La figura 4 ilustra la sensibilidad de transfectantes de KCNB, BCL2 y KCNB/BCL2 con respecto a la muerte celular inducida por TNF- α .

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

I. Introducción

La presente invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos aislados que codifican el KCNB y procedimientos de producción del KCNB. Los tejidos o tipos de células que expresan el KCNB incluyen, pero no se limitan a, cerebro, páncreas, riñón, mama, pulmón y la SEQ ID NO: 5) codifica un polipéptido de 374 aminoácidos de longitud (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos se puede alinear con una identidad de secuencia de un 62 % con la secuencia de aminoácidos de la proteína del canal de potasio KCHO o TASK, que es un miembro de la familia TWIK-1 de canales de potasio (véase, por ejemplo, Duprat *et al.*, *EMBOJ.* 16:5464- 5471,1997; patente de los EE.UU. n.º 6.013.470; y WO99/37762) definida por la presencia de 2 dominios de poro (P) y 4 regiones de extensión de transmembrana. La conservación de los 2 dominios de poro y los 4 dominios transmembrana de la familia TWIK de canales de K⁺ no está necesariamente asociada con una conservación de las propiedades funcionales: se ha identificado un miembro de la familia TWIK que da lugar a corrientes de K⁺ rectificadoras débilmente interiores; otro produce corrientes de K⁺ rectificadoras exteriores. Ambos canales están abiertos en el potencial de reposo y pueden conducir el potencial de membrana de reposo cerca del potencial de equilibrio de K⁺. KCNK3 (o TASK) produce corrientes de K⁺ que poseen la característica de conductancias de fondo y es muy sensible a la variación de pH extracelular en un intervalo fisiológico limitado (véase, por ejemplo, Duprat *et al.*, *supra*). A diferencia del KCNB, no se ha observado que TASK se sobreexpresa en cáncer.

La divulgación también proporciona procedimientos de cribado de moduladores, por ejemplo, activadores, inhibidores, estimuladores, potenciadores, *etc.*, de proteínas y ácidos nucleicos del KCNB. Estos moduladores pueden afectar la actividad del KCNB, por ejemplo, modulando la transcripción, traducción, ARNm o estabilidad de proteína del KCNB; alterando la interacción del KCNB con la membrana plasmática, u otras moléculas; o afectando la actividad de proteína del KCNB. En una realización, se criban los compuestos, por ejemplo, usando cribado ultrarrápido (HTS), para identificar los compuestos que se pueden unir y/o modular la actividad de un polipéptido del KCNB aislado o fragmento del mismo. En otra realización, las proteínas del KCNB se expresan de forma recombinante en células y la modulación del KCNB se ensaya usando cualquier medida de la función del canal de iones de potasio, tal como la medida del potencial de membrana. Los procedimientos para medir el potencial de membrana incluyen, por ejemplo, técnicas de pinzamiento zonal de membrana, medida de corrientes de la célula completa, ensayos de flujo de rubidio radiomarcado, y análisis de fluorescencia usando colorantes sensibles al voltaje.

En varias realizaciones, un polinucleótido o polipéptido del KCNB se introduce en una célula, *in vivo* o *ex vivo*, y de este modo se modula la actividad del KCNB en la célula. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido del KCNB de longitud completa, se puede introducir dentro de una población de células, modulando de este modo las propiedades electrofisiológicas de las células.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos al KCNB, preferentemente un dominio N-terminal, dominio C-terminal, dominio transmembrana, o bucle extracelular del KCNB, se administrarán a un mamífero para inhibir la actividad del KCNB en células. Estas realizaciones son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con una actividad del KCNB, por ejemplo, cáncer.

La presente invención también proporciona procedimientos para detectar la expresión de ácidos nucleicos y proteínas del KCNB. También se pueden usar polipéptidos del KCNB para generar anticuerpos monoclonales y policlonales útiles para la detección de células que expresan el KCNB o para la mejora de la actividad del KCNB. También se pueden identificar las células que expresan el KCNB usando técnicas tales como transcripción inversa y amplificación de ARNm, aislamiento de ARN total o de ARN poli A⁺, transferencia de tipo Northern, transferencia en mancha, hibridación *in situ*, protección RNasa, digestión S1, conjuntos con microchips de ADN de sondeo, transferencia de tipo Western, y similares.

Desde el punto de vista funcional, los ácidos nucleicos del KCNB codifican una proteína del canal de iones de potasio. Se pueden usar regiones específicas del nucleótido del KCNB y secuencias de aminoácidos para identificar las variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de genes del *KCNB*. Se puede realizar la identificación usando técnicas *in vitro*, por ejemplo, usando PCR bajo condiciones de hibridación restrictivas o moderadas, o usando la información de la secuencia en un sistema informático para la comparación con otras secuencias de nucleótidos. Se puede realizar la comparación de secuencias usando cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias analizados a continuación en el presente documento. Los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos del KCNB o una región conservada de los mismos, por ejemplo, la región C-terminal del KCNB, también se pueden usar para identificar alelos, homólogos interespecies, y variantes polimórficas.

Las variantes polimórficas, los homólogos interespecies y alelos del KCNB se confirman normalmente comparando un polipéptido del KCNB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con la supuesta proteína del KCNB para demostrar la identificación de una variante polimórfica o alelo del gen o proteína del KCNB. Se puede confirmar que estas variantes u homólogos tienen las mismas características funcionales expresando la variante y analizando la actividad, por ejemplo, determinando las propiedades electrofisiológicas, tal como se describe en el presente documento.

La información de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos para el KCNB también se usa para construir modelos de proteínas del KCNB. Estos modelos se usan posteriormente para identificar compuestos que pueden activar o inhibir proteínas del KCNB. Estos compuestos que modulan la actividad de genes o proteínas del KCNB se pueden usar para investigar la función fisiológica de los genes del *KCNB*.

- 5 La presente divulgación también proporciona ensayos, preferentemente ensayos de cribado ultrarrápido (HTS) para identificar compuestos u otras moléculas que interactúan con y/o modulan el KCNB. En determinados ensayos, se usa un determinado dominio del KCNB, se pueden usar por ejemplo, un dominio N-terminal, transmembrana, de poro o C-terminal.

- 10 La presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la actividad del KCNB. Por ejemplo, los presentes procedimientos se pueden usar para diagnosticar, determinar el pronóstico para, o tratar, cualquiera de una serie de tipos de cáncer. En realizaciones preferidas, el cáncer es un cáncer epitelial, por ejemplo, cáncer de mama, pulmón, próstata, riñón, estómago, vejiga o de ovario, o cualquier cáncer del tubo digestivo.

- 15 Los procedimientos de diagnóstico de esta invención se pueden usar en animales, incluyendo, por ejemplo, primates, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos, ovinos, porcinos, lagomorfos, *etc.*, así como en seres humanos.

También se proporcionan kits para llevar a cabo los procedimientos diagnósticos y terapéuticos dados a conocer en el presente documento.

II. Definiciones

- 20 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados atribuido a ellos, a menos que se especifique de otro modo.

- Por lo tanto, el término "KCNB" se refiere a variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos interespecies de polipéptidos y ácidos nucleicos del KCNB que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de aproximadamente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor, preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, para una secuencia del KCNB de SEQ ID NO: 1; (2) se unen a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, obtenidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y sus variantes conservadoramente modificadas; (3) se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación restrictivas a una secuencia de ácidos nucleicos del KCNB de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5 y sus variantes conservadoramente modificadas; (4) tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos mayor de aproximadamente un 95 %, preferentemente mayor de aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior, preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 50, 100, 200, 500, 1000, o más nucleótidos, para la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5; o (5) se amplifican por cebadores que se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación restrictivas a la misma secuencia que un conjunto de cebadores seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y 4; SEQ ID NO: 6 y 7, y SEQ ID NO: 9 y 10. Normalmente, una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos del KCNB es de un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, ser humano, rata, ratón, hámster, vaca, cerdo, caballo, oveja, o cualquier mamífero. Un "polinucleótido del KCNB" y un "polipéptido del KCNB", son ambos naturales o bien recombinantes. El gen del KCNB humano está situado en el cromosoma 8q24.3.

- 40 Una proteína o ácido nucleico del KCNB "de longitud completa" se refiere a una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos del KCNB, o una variante de la misma, que contiene todos los elementos contenidos normalmente en una o más secuencias de polipéptidos o polinucleótidos del KCNB naturales, de origen natural. Sin embargo, se reconocerá que los derivados, homólogos y fragmentos del KCNB se pueden usar fácilmente en la presente invención. Estas variantes del KCNB pueden comprender uno cualquiera o más de los dominios del polipéptido mostrado como SEQ ID NO: 1, o múltiples copias de uno cualquiera o más dominios, o cualquier número de dominio en combinaciones novedosas entre sí o con otras proteínas o dominios proteicos.

- 50 Topológicamente, se considera que los polipéptidos del KCNB de longitud completa, tal como se define en el presente documento, tienen un dominio amino terminal, dos dominios de poro, cuatro dominios transmembrana y un dominio C-terminal (figura 1). Estos dominios se pueden identificar estructuralmente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como programas de análisis de secuencia que identifican dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, por ejemplo, Shyer, *Biochemistry* (3^a ed. 1988); véase también cualquiera de una serie de programas de análisis de secuencia basados en Internet, tales como los encontrados en dot.imgen.bcm.tmc.edu).

- 55 El "dominio C-terminal", que, por ejemplo, corresponde a los aminoácidos de desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 374 de la SEQ ID NO: 1, se refiere a la región de la proteína que se extiende desde aproximadamente el cuarto dominio transmembrana al extremo C-terminal de la proteína. Este dominio es un rasgo característico del KCNB y sus homólogos, y tiene una secuencia de identidad de menos de aproximadamente un 30 %, opcionalmente menos de aproximadamente un 50 %, 40 %, o un 35 %, con KCNK3.

El dominio "P" se refiere a una región estructural de la proteína que codifica un dominio de poro, que es un rasgo característico de los canales de iones de potasio (véase, por ejemplo, Heginbotham *et al.*, *Biophys. J.* 66:1061-1067, 1994). El KCNB tiene dos dominios de poro, es decir, dos dominios P.

5 El "dominio transmembrana" se refiere a un dominio de proteína hidrófobo que se encuentra dentro y que cruza la membrana plasmática, y también puede incluir los correspondientes bucles citoplásmicos (intracelulares) y extracelulares. Los dominios transmembrana del KCNB se pueden identificar usando procedimientos estándar, tal como se describe en Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982)), o en Stryer, *supra*. KCNB tiene cuatro dominios transmembrana.

10 Las "variantes conservadoramente modificadas" se aplican tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes conservadoramente modificadas se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos el aminoácido arginina. Por tanto, en cada posición en la que se especifique una arginina por un codón, el codón se puede alterar para cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son "sustituciones silenciosas" o "variaciones silenciosas", que son una especie de "variaciones conservadoramente modificadas". Cada secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa, excepto donde se indique de otro modo. Por tanto, las sustituciones silenciosas son una característica implícita de cada secuencia de ácidos nucleicos que codifica un aminoácido. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el codón para metionina) se puede modificar para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica por técnicas estándar. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas se optimizan preferentemente para la expresión en una célula huésped particular (por ejemplo, de levadura, mamífero, vegetal, 25 fúngica, y similares) usada para producir las enzimas.

30 Como para las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales para una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínas que altera, añade o suprime un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservadoramente modificada" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Estas variantes conservadoramente modificadas son, además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la invención.

Los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A); Glicina (G);
- 35 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- 40 7) Serina (S), treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

Las estructuras macromoleculares tales como las estructuras polipeptídicas se pueden describir en términos de diferentes niveles de organización. Para un análisis general de esta organización, véase, por ejemplo, Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell* (3^a ed., 1994) y Cantor y Schimmel, *Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules* (1980). "Estructura primaria" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido particular. "Estructura secundaria" se refiere a estructuras tridimensionales, localmente ordenadas, dentro de un polipéptido. Estas estructuras se conocen comúnmente como dominios. Los dominios son porciones de un polipéptido que forman una unidad compacta del polipéptido y normalmente son de 50 a 350 aminoácidos de longitud. Los dominios típicos se componen de secciones de menor organización, tales como tiras de hélices α . "Estructura terciaria" se refiere a la estructura tridimensional completa de un monómero de polipéptido. "Estructura cuaternaria" se refiere a la estructura tridimensional formado por la asociación no covalente de unidades terciarias independientes. Los términos anisótropos también se conocen como términos de energía.

Un "cáncer" en un animal se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de células que provocan cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y tasa de proliferación y determinados rasgos morfológicos característicos y marcadores celulares. En algunas circunstancias, las células de cáncer estarán en forma de un tumor, pero estas células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden circular en el torrente circulatorio como células independientes, tales como las células leucémicas.

"Muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de tejido biológico o fluido que contiene uno o más ácidos nucleicos del *KCNB* que codifican una o más proteínas del *KCNB*. Estas muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido aislado de seres humanos, ratones y ratas, en particular, tejido de mama y pulmón, así como sangre, tejido linfático, hígado, cerebro, corazón, bazo, testículos, ovario, timo, riñón y tejidos embrionarios. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas para propósitos histológicos. Una muestra biológica se obtiene normalmente a partir de un organismo eucariota, tal como insectos, protozoos, aves, peces, reptiles, y preferentemente un mamífero, tal como rata, ratón, vaca, perro, conejillo de indias, o conejo, y lo más preferentemente un primate, tal como un chimpancé o un ser humano.

Por "determinar el efecto funcional" se quiere decir ensayar el efecto de un compuesto que incrementa o disminuye un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia de un polipéptido del *KCNB*, por ejemplo, efectos funcionales, físicos y químicos. Estos efectos funcionales incluyen, pero no se limitan a, cambios en el flujo de iones, potencial de membrana, amplitud de corriente, bloqueo de voltaje y sensibilidad del pH, así como otros efectos biológicos tales como cambios en la expresión génica del *KCNB* o de cualquiera de los genes marcadores, y similares. El flujo de iones puede incluir cualquier ión que pase a través del canal, por ejemplo, potasio o rubidio, y análogos de los mismos, tales como radioisótopos. Estos efectos funcionales se pueden medir por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, pinzamiento zonal de membrana, usando colorantes sensibles al voltaje, o midiendo los cambios en parámetros tales como características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), propiedades hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o de solubilidad,.

"Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de genes o proteínas del *KCNB* se usan de forma intercambiable para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la actividad o el número de *KCNB*. Estas moléculas moduladoras, también denominadas en el presente documento como compuestos incluyen polipéptidos, anticuerpos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, carbohidratos, o cualquier molécula orgánica o inorgánica. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, retrasan o bloquean parcial o totalmente la actividad del *KCNB*, desensibilizan el *KCNB* o regulan a la baja la expresión del *KCNB* o su estabilidad. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, abren los canales *KCNB*, sensibilizan el *KCNB* o estimulan la actividad del *KCNB*, o incrementan la expresión de *KCNB* o su estabilidad. Los ensayos para inhibidores y activadores se describen a continuación e incluyen, por ejemplo, expresión de proteínas del *KCNB* en células o membranas celulares, aplicación de supuestos moduladores y, después la determinación de los efectos funcionales sobre las propiedades electrofisiológicas de las células. Las medidas de los efectos funcionales incluyen, por ejemplo, la determinación de cambios en el potencial de membrana. Los procedimientos para medir el potencial de membrana incluyen, pero no se limitan a, técnicas de pinzamiento zonal de membrana, determinación de corrientes de la célula completa, ensayos de flujo de rubidio radiomarcado, y análisis de fluorescencia usando colorantes sensibles al voltaje.

Las muestras o ensayos que comprenden polipéptidos del *KCNB* que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con las muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el efecto del compuesto candidato. Las muestras de control (no tratadas con el compuesto) se asignan con un valor de actividad del *KCNB* relativo de un 100 %. La inhibición de un polipéptido del *KCNB* se logra cuando el valor de actividad con relación al control es de aproximadamente un 80 %, de forma opcional aproximadamente un 50 % o un 25-0 %. La activación de un polipéptido del *KCNB* se logra cuando el valor de actividad con relación al control es de aproximadamente un 110 %, de forma opcional aproximadamente un 150 %, de forma opcional aproximadamente un 200-500 %, o aproximadamente 1000-3000 % o superior.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente los acompañan, como se encuentra en su estado natural. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico del *KCNB* aislado se separa de los marcos de lectura abierta que flanquean el gen del *KCNB* y que codifican proteínas distintas del *KCNB*. El término "purificado" denota que un ácido nucleico o una proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. En particular, esto significa que el ácido nucleico o la proteína es puro al menos en un 85 %, opcionalmente puro al menos en un 95 % y opcionalmente puro al menos en un 99 %.

"Ácido Nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bien bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de esqueleto modificado o enlaces, que son sintéticos, naturales, y no naturales, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos

de referencia. Ejemplos de estos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metil-fosfonatos quirales, 2-O-metil-ribonucleótidos, péptidos de ácidos nucleicos (PNA).

- A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular también abarca implícitamente variantes conservadoramente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol Cell Probes* 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.
- 10 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético de químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y a polímero de aminoácidos no naturales.
- 15 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a un aminoácido natural.
- 20 Los aminoácidos se pueden denominar en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, se pueden denominar por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.
- 25 Una "marca" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos o químicos. Por ejemplo, las marcas útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa normalmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que se pueden hacer detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador dentro del péptido o usado para detectar anticuerpos reactivos específicamente con el péptido.
- 30 Un "oligonucleótido o sonda de ácido nucleico marcado" es uno que se une, covalentemente, a través de un engarce o un enlace químico, o bien no covalentemente, a través de enlaces iónicos, van der Waals, electrostáticos, o de hidrógeno a una marca de modo que se pueda detectar la presencia de la sonda detectando la presencia de la marca unida a la sonda.
- 35 Como se usa en el presente documento, un "oligonucleótido o sonda de ácido nucleico" se define como un ácido nucleico que se puede unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente a través de emparejamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en el presente documento, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T), o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, *etc.*). Además, las bases en una sonda se pueden unir mediante un engarce distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos pueden en las que las bases constituyentes se unen por enlaces peptídicos, mejor que enlaces fosfodiéster. Se entenderá por un experto en la técnica que las sondas se pueden unir a secuencias diana carentes de complementariedad completa con la secuencia de sonda dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Las sondas se marcan de forma opcional directamente como con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o se marcan indirectamente tal como con biotina a la que se une posteriormente un complejo de estreptavidina. Mediante el ensayo para determinar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.
- 40 El término "recombinante", cuando se usa, por ejemplo, con referencia a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o por la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de ese modo. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otro modo, se subexpresan o no se expresan.
- 45 El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a partes de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, normalmente el ácido nucleico se producen de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para preparar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y
- 50
- 55

una región codificante de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

5 Un "promotor" se define como un conjunto de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores y represores distales, que se pueden ubicar hasta varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un
10 promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación medioambiental o de desarrollo. El término "unido de forma operable" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácidos nucleicos (tal como un promotor, o conjunto de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos, en la que la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

15 Un "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácidos nucleicos específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se va a transcribir unido de forma operable a un promotor.

20 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o de nucleótidos que son los mismos (es decir, una identidad de aproximadamente un 70 %, preferentemente una identidad de un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior sobre una región especificada (por ejemplo, SEQ ID NO: 1,2 ó 5), cuando se comparan y se alinean para su correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada)
25 como se mide usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto descritos a continuación, o por alineación manual e inspección visual. Entonces, se dice que estas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. La definición también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones.
30 Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden justificar huecos y similares. Preferentemente, la identidad existe sobre una región que es al menos de aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud o, más preferentemente sobre una región que es de 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias
35 de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar parámetros de programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencia calcula las identidades de secuencia en porcentaje para las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa.

40 Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionado del grupo que consiste en desde 20 hasta 600, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que la dos secuencias estén óptimamente alineadas. Los procedimientos
45 de alineación de secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de las secuencias para su comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por el procedimiento de búsqueda por semejanza de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FAST A y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por
50 alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, ed. 1995 suplemento)).

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia en porcentaje y la semejanza de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.*
55 25:3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST está públicamente disponible por el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que pueden coincidir o satisfacer alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una
60 secuencia de base de datos. T se denomina como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HPS más largas que

las contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que se pueda incrementar la alineación acumulable. Las puntuaciones acumulables se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos mal emparejados; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulable. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulable baja a la cantidad X desde su máximo valor logrado; la puntuación acumulable baja hasta cero o inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros de algoritmo de BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo de BLAST también realiza un análisis estadístico de la semejanza entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de semejanza proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es de menos de aproximadamente 0,2, más preferentemente de menos de aproximadamente 0,01 y más preferentemente de menos de aproximadamente 0,001.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con los anticuerpos obtenidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por tanto, normalmente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, en el que los dos péptidos sólo difieren por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que se pueden usar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

La frase "se hibrida selectivamente (o específicamente) a" se refiere a la unión, duplicación, o hibridación de una molécula sólo para una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones de hibridación restrictivas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja, (por ejemplo, ARN o ADN de colección o celular total).

La frase "condiciones de hibridación restrictivas" se refiere a las condiciones bajo las que una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, normalmente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más grandes hibridan específicamente a temperaturas altas. Una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones restrictivas se seleccionan para ser aproximadamente 5-10 °C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m, un 50 % de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de una concentración de iones de sodio de aproximadamente 1,0 M, normalmente una concentración de iones de sodio de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos de aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación específica o selectiva, una señal positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación restrictivas ejemplares pueden ser como sigue: 50 % de formamida, 5x SSC, y 1 % de SDS, incubando a 42 °C, o, 5x SSC, 1 % de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y 0,1 % de SDS a 65 °C. Estos lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos. Para la PGR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para una amplificación de rigurosidad baja, aunque las temperaturas de apareamiento pueden variar entre aproximadamente 32 °C y 48 °C, dependiendo de la longitud del cebador. Para una amplificación de PCR de rigurosidad alta, una temperatura de aproximadamente 62 °C es típica, aunque las temperaturas de apareamiento de rigurosidad alta pueden variar de desde aproximadamente 50 °C hasta aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Las condiciones de ciclo típicas para ambas amplificaciones de rigurosidad alta y baja incluyen una fase de desnaturalización de 90 °C - 95 °C durante 30 segundos - 2 minutos, una fase de apareamiento que dura 30 segundos - 2 minutos, y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C durante 1-2 minutos.

- Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos normalmente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente restrictivas. Las
- 5 "condiciones de hibridación moderadamente restrictivas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de un 40 %, NaCl 1 M, 1 % de SDS a 37 °C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Estos lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos. Una hibridación positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo. Los expertos reconocerán fácilmente que las condiciones de hibridación y lavado alternativas se pueden utilizar para proporcionar condiciones de rigurosidad similares.
- 10 "Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región estructural de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de las regiones variables de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como o kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de
- 15 inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.
- Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada
- 20 cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.
- Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un
- 25 anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro de la región bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que en sí es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ se puede reducir bajo condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque los diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo
- 30 intacto, un experto apreciará que estos fragmentos se pueden sintetizar *de novo* químicamente o bien usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos, o bien los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena simple) o los identificados usando colecciones de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)).
- 35 Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, se puede usar cualquier técnica conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, p. 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de los EE.UU. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos para
- 40 polipéptidos de esta invención. Además, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. De forma alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos para identificar anticuerpos y fragmentos de Fab heteromérico que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992)).
- Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) esté unido a una región
- 45 constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, *etc.*; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.
- 50 Un anticuerpo "anti-KCNB" es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido codificado por un gen KCNB, ADNc, o una subsecuencia del mismo, por ejemplo, el dominio C-terminal.
- El término "inmunoensayo" es un ensayo que usa un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno.
- 55 La frase "se une específicamente (o selectivamente) a" un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas

presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo estas condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales obtenidos para un polipéptido de KCNB a partir de especies específicas, tales como rata, ratón, o ser humano se pueden seleccionar para obtener sólo los anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con la proteína del KCNB y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas y alelos de la proteína del KCNB. Esta selección se puede lograr sustrayendo anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con moléculas del KCNB de otras especies. Se puede usar una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan habitualmente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica). Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o el ruido de fondo y más normalmente más de 10 a 100 veces el fondo.

La frase "se asocia selectivamente con" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para "hibridarse selectivamente" con otro, tal como se define anteriormente, o la capacidad de un anticuerpo de "unirse selectiva (o específicamente)" a una proteína, tal como se define anteriormente.

Por "célula huésped" se quiere decir una célula que contiene un vector de expresión y apoya la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como *E. coli* o células eucariotas, tales como células de levadura, insecto, anfibio o mamífero, tales como CHO, HeLa y similares, por ejemplo, células cultivadas, explantes y células *in vivo*. La frase "detectar un cáncer" o "diagnosticar un cáncer" se refiere a determinar la presencia o ausencia de cáncer o una afección precancerosa en un animal. "Detectar un cáncer" también se puede referir a obtener una prueba indirecta sobre la probabilidad de la presencia de células cancerosas en el animal. La detección de un cáncer se puede llevar a cabo usando sólo los procedimientos de esta invención, en combinación con otros procedimientos, o en vista de otras informaciones respecto al estado de salud del animal.

III. Manipulación y detección de ácidos nucleicos del KCNB

En varias realizaciones de la presente invención, se usarán ácidos nucleicos que codifican un polipéptido del KCNB, incluyendo una proteína del KCNB de longitud total o cualquier derivado, variante, homólogo, o fragmento del mismo. Estos ácidos nucleicos son útiles para cualquiera de una serie de aplicaciones, incluso para la producción de proteína del KCNB, para ensayos de diagnóstico, para aplicaciones terapéuticas, sondas específicas del KCNB, para ensayos para compuestos de unión y/o modulación del KCNB, para identificar y/o aislar homólogos del KCNB de otras especies o de ratones, y otras aplicaciones.

A. Procedimientos de ADN recombinante generales

Numerosas aplicaciones de la presente invención implican la clonación, síntesis, mantenimiento, mutagénesis y otras manipulaciones de las secuencias de ácidos nucleicos que se pueden realizar usando técnicas de rutina en el ámbito de la genética recombinante. Los textos básicos que dan a conocer los procedimientos generales de su uso en la presente invención incluyen Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (*Ausubel et al, eds., 1994*).

Para ácidos nucleicos, los tamaños se dan en kilobases (kb) o bien en pares de bases (pb). Estas son estimaciones derivadas de electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, a partir de ácidos nucleicos secuenciados, o de secuencias de ADN publicadas. Para proteínas, los tamaños se dan en kilodalton (kDa) o números de residuos de aminoácidos. Los tamaños de proteínas se estiman por electroforesis en gel, a partir de proteínas secuenciadas, a partir de secuencias de aminoácidos derivadas, o de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles comercialmente se pueden sintetizar químicamente de acuerdo con el procedimiento de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22:1859-1862 (1981), usando un sintetizador automatizado, tal como se describe en Van Devanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos es por electroforesis en gel de acrilamida nativa o bien por HPLC de intercambio aniónico, tal como se describe en Pearson y Reamer, *J. Chrom.* 255:137-149 (1983).

La secuencia de genes clonados y oligonucleótidos sintéticos se puede verificar después de la clonación usando, por ejemplo, el procedimiento de terminación de la cadena para la secuenciación de moldes bicatenarios de Wallace *et al.*, *Gene* 16:21-26 (1981).

B. Aislamiento y detección de secuencias de nucleótidos del KCNB

En varias realizaciones de la presente invención, se aislarán y se clonarán ácidos nucleicos del KCNB usando procedimientos recombinantes. Estas realizaciones se usan, por ejemplo, para aislar polinucleótidos del KCNB para la expresión de proteínas o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión, u otras secuencias derivadas del KCNB, para monitorizar la expresión del gen del KCNB, para la determinación de secuencias del KCNB

en determinadas especies, para propósitos de diagnóstico en un paciente, es decir, para detectar mutaciones en el *KCNB* o para aplicaciones de genotipado y/o forenses.

5 A menudo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas del *KCNB* y homólogos de secuencias de ácidos nucleicos se clonan a partir de colecciones de ADNc y ADN genómico por hibridación con sondas, o se aíslan usando técnicas de amplificación con cebadores de oligonucleótidos. Por ejemplo, las secuencias del *KCNB* normalmente se aíslan a partir de colecciones de ácidos nucleicos de mamífero (genómicos, ADNc) o hibridando con una sonda de ácidos nucleicos, cuya secuencia se puede derivar de SEQ ID NO: 2, o se puede amplificar usando cebadores que comprenden, por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 y 4, ó 6 y 7, ó 9 y 10. Un material biológico adecuado a partir del que se puede aislar ARN y ADNc para el *KCNB* incluye tejidos tales como de mama y pulmón, así como
10 sangre, linfa, cerebro, hígado, corazón, bazo, testículo, ovario, timo, riñón, embrionario, u otros tejidos.

También se pueden usar técnicas de amplificación usando cebadores para amplificar y aislar secuencias del *KCNB* a partir de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (1995)). Se pueden usar cebadores, por ejemplo, para amplificar la secuencia de longitud completa o bien a una sonda de uno a varios cientos de nucleótidos (usando, por ejemplo, cebadores mostrados como las SEQ ID NO: 3 y 4), que después
15 se usa para cribar una colección de mamífero para clones del *KCNB* de longitud completa.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos del *KCNB* también se puede aislar de colecciones de expresión usando anticuerpos como sondas. Estos anticuerpos policlonales o monoclonales se pueden obtener usando la secuencia de SEQ ID NO: 1, o derivados o fragmentos de la misma.

20 Las variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecies que son sustancialmente idénticos a un gen del *KCNB* se pueden aislar usando sondas de ácidos nucleicos del *KCNB*, y oligonucleótidos cribando colecciones bajo condiciones de hibridación restrictivas. De forma alternativa, se pueden usar colecciones de expresión para clonar variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecies del *KCNB*, detectando homólogos expresados inmunológicamente con antisuero o anticuerpos purificados preparados contra un polipéptido del *KCNB*, que también reconoce y se une selectivamente al homólogo del *KCNB*.

25 Se pueden identificar homólogos del *KCNB* relacionados de forma más distante usando cualquiera de una serie de técnicas muy conocidas, incluyendo por hibridación de una sonda del *KCNB* con una colección genómica o de ADNc usando condiciones moderadamente restrictivas, o bajo condiciones de rigurosidad baja usando sondas de regiones que son selectivas para el *KCNB*, por ejemplo, sondas específicas generadas para el dominio C-terminal. Además, se puede amplificar un homólogo distante a partir de una colección de ácidos nucleicos usando cebadores degenerados, es decir, cebadores que incorporan todos los posibles codones que codifican una secuencia de aminoácidos dada, en particular basado en un tramo de aminoácidos altamente conservado. Estos cebadores son muy conocidos por los expertos, y están disponibles numerosos programas por ejemplo, en Internet, para el diseño de cebadores degenerados.
30

Para preparar una colección de ADNc, se debe elegir una fuente que sea rica en ARNm del *KCNB*, por ejemplo, células aisladas del cerebro, o células de cáncer de mama o de pulmón. Después, se convierte el ARNm en ADNc usando la transcriptasa inversa, se liga dentro de un vector recombinante, y se transfecta en un huésped recombinante para su propagación, cribado y clonación. Los procedimientos para preparar y cribar colecciones de ADNc son muy conocidos (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman, *Gene* 25:263-269 (1983); Sambrook *et al*, *supra*, Ausubel *et al*, *supra*).
35

40 Para una colección genómica, se extrae el ADN del tejido o de las células y se cizalla mecánicamente o bien se digiere enzimáticamente para proporcionar fragmentos de aproximadamente 12-20 kb. Después, se separan los fragmentos por centrifugación en gradiente de los tamaños no deseados y se construyen en vectores lambda bacteriófagos. Estos vectores y fagos se envasan *in vitro*. Los fagos recombinantes se analizan por hibridación en placa, tal como se describe en Benton y Davis, *Science* 196:180-182 (1977). La hibridación de colonias se lleva a cabo como se describe en general en Grunstein *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 72:3961-3965 (1975).
45

Un procedimiento alternativo de aislamiento del ácido nucleico del *KCNB* y sus homólogos combina el uso de cebadores de oligonucleótidos sintéticos y la amplificación de una plantilla de ARN o ADN (véase, la patente de los EE.UU. NO 4.683.195 y 4.683.202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al*, eds, 1990)). Se pueden usar procedimientos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de ligasa (LCR) para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos de genes del *KCNB* directamente de ARNm, de ADNc, de colecciones genómicas o de colecciones de ADNc. Se pueden diseñar oligonucleótidos degenerados para amplificar homólogos de *KCNB* usando las secuencias proporcionadas en el presente documento. Se pueden incorporar sitios de endonucleasa de restricción en los cebadores. La reacción en cadena de la polimerasa u otros procedimientos de amplificación *in vitro* también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas que se vana a expresar, para preparar ácidos nucleicos para usar como sondas para detectar la presencia de ARNm que codifica el *KCNB* en muestras fisiológicas, para secuenciación de ácidos nucleicos, o para otros propósitos. Los genes amplificados por la reacción de PCR se pueden purificar a partir de geles de agarosa y clonarse en un vector apropiado.
50
55

Se pueden usar oligonucleótidos sintéticos para construir genes del *KCNB* recombinante para su uso como sondas o para la expresión de proteínas. Este procedimiento se realiza usando una serie de oligonucleótidos superpuestos normalmente de 40-120 pb de longitud, representando tanto las hebras sentido como antisentido del gen. Después, estos fragmentos de ADN se emparejan, se ligan y se clonan. De forma alternativa, se pueden usar técnicas de
 5 amplificación con cebadores precisos para amplificar una subsecuencia específica del ácido nucleico del *KCNB*. Después, la subsecuencia específica se liga en un vector de expresión.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido del *KCNB* se clona normalmente en vectores intermedios antes de la transformación en células procariontas o eucariotas para replicación y/o expresión. Estos vectores intermedios normalmente son vectores procariontas, por ejemplo, plásmidos, o vectores transportadores. Los vectores, células y
 10 procedimientos de transfección son muy conocidos por los expertos y se describen, por ejemplo, en Ausubel o en Sambrook, ambos *supra*.

La actividad del canal de potasio de un polipéptido codificado por un ácido nucleico del *KCNB* se puede evaluar usando una variedad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, pinzamiento zonal de membrana, usando colorantes sensibles al voltaje, o midiendo los cambios en parámetros tales como características
 15 espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), propiedades hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o de solubilidad. A menudo, la actividad del *KCNB* se evalúa usando un sistema de ensayo de expresión en el que se transfecta un vector de expresión que codifica el *KCNB* en una célula. Después, las propiedades electrofisiológicas para la célula se pueden evaluar en comparación con las células de control. Por ejemplo, se puede cotransfectar un vector de expresión del *KCNB* con un plásmido, tal como un plásmido de expresión
 20 de proteína fluorescente verde, que permite la identificación de las células transfectadas. Después, se puede medir la electrofisiología celular en los transfectantes que expresan el *KCNB* en comparación con los transfectantes que se cotransfectaron con el vector de expresión carente de la inserción del *KCNB* y el plásmido identificador. La actividad de la proteína del *KCNB* expresada se puede evaluar usando una variedad de ensayos para medir cambios en flujos de iones incluyendo las técnicas de pinzamiento zonal de membrana, medida de corrientes de la célula completa,
 25 ensayos de flujo de rubidio radiomarcado, y ensayos de fluorescencia usando colorantes sensibles al voltaje (véase, por ejemplo, Vestergarrd-Bogind *et al*, *J. Membrane Biol.* 88:67-75 (1988); Daniel *et al.*, *J. Pharmacol. Meth.* 25:185-193 (1991); Hoevinsky *et al*, *J. Membrane Biol.* 137:59-70 (1994)).

Opcionalmente, se usarán ácidos nucleicos que codifican proteínas quiméricas que comprenden un polipéptido del *KCNB* o dominios del mismo, en combinación con un polipéptido o polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, un dominio tal como un dominio N-terminal o C-terminal, un bucle extracelular, o un dominio transmembrana del *KCNB* se puede unir covalentemente a una proteína heteróloga tal como un dominio transmembrana heterólogo o un dominio
 30 extracelular heterólogo. Otras proteínas heterólogas de elección incluyen, por ejemplo luciferasa, GFP y β -gal.

En ciertas realizaciones, se detectarán polinucleótidos del *KCNB* usando procedimientos basados en hibridación para determinar, por ejemplo, niveles de ARN del *KCNB* o para detectar secuencias de ADN particulares, es decir,
 35 aplicaciones de diagnóstico o pronóstico. Se puede detectar un nivel de polinucleótidos del *KCNB* detectando cualquier ADN o ARN del *KCNB*, incluyendo ADN genómico, ARNm y ADNc. La detección puede implicar la cuantificación del nivel de polinucleótidos (por ejemplo, ADN genómico, ADNc o ARNm) o, de forma alternativa, puede ser una evaluación cualitativa del nivel, o de la presencia o ausencia, del *KCNB*, en particular, en comparación con un nivel de control. Se puede usar cualquiera de una serie de procedimientos para detectar cualquiera de los anteriores,
 40 como se indica *infra*. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, hibridación, amplificación y otros ensayos.

En determinadas realizaciones, se usa la capacidad para detectar un incremento en el nivel o la presencia de diagnóstico, en una célula como un marcador para células cancerosas, es decir, para monitorizar el número o la localización de las células cancerosas en un paciente, como se detecta *in vivo* o *in vitro*.

Se puede analizar la expresión génica del *KCNB* por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, transferencia de
 45 tipo Northern, amplificación de PCR y transcripción inversa de ARNm, incluyendo análisis de PCR cuantitativa de los niveles de ARNm con procedimientos de PCR en tiempo real (por ejemplo, amplificación transcriptasa inversa TAQMAN™), transferencia en mancha, hibridación *in situ*, protección de ARNasa, conjuntos con microchips de ADN de sondeo, y similares. En una realización, se usa la tecnología de análisis de oligonucleótidos de densidad alta (por ejemplo, GeneChip™) para identificar homólogos y variantes polimórficas del *KCNB*, o para monitorizar niveles de
 50 ARNm del *KCNB*. En el caso en el que se el *KCNB* está unido a una enfermedad conocida, por ejemplo, cáncer, se puede usar con GeneChip™ como una herramienta de diagnóstico en la detección de la enfermedad en una muestra biológica, véase, por ejemplo, Gunthand *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 869-876 (1998); Kozal *et al*, *Nat. Med.* 2:753-759 (1996); Matson *et al*, *Anal Biochem.* 224:110-106 (1995); Lockhart *et al.*, *Nat. Biotechnol* 14:1675-1680 (1996); Gingeras *et al*, *Genome Res.* 8:435-448 (1998); Hacia *et al*, *Nucleic Acids Res.* 26:3865-3866
 55 (1998).

En una realización, por ejemplo, para el diagnóstico de cáncer, se evalúa el número de copias, es decir, el número de genes del *KCNB* en una célula. En general, para un gen autosómico dado, un animal tiene dos copias de cada gen. Sin embargo, se puede incrementar el número de copias por amplificación o duplicación de genes, por ejemplo, en células cancerosas, o reducirse por delección. Los procedimientos de evaluación del número de copias de un gen particular son
 60 muy conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, entre otros, ensayos basados en hibridación y amplificación.

Se puede usar cualquiera de una serie de ensayos basados en hibridación para detectar el gen del KCNB o el número de copias en las células de una muestra biológica. Un procedimiento de este tipo es por transferencia de tipo Southern. En una transferencia de tipo Southern, normalmente el ADN genómico se fragmenta, se separa electroforéticamente, se transfiere a una membrana, y posteriormente se hibrida a una sonda específica para el KCNB. Para la determinación del número de copias, la comparación de la intensidad de la señal de hibridación de la sonda para la región diana con una señal de una sonda de control para una región de ADN genómico normal (por ejemplo, una porción no amplificada de la misma célula, tejido, órgano, etc. o relacionado) proporciona una estimación del número de copias del KCNB relativo. La metodología de transferencia de Southern es muy conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, o Sambrook *et al.*, *supra*.

Un medio alternativo para determinar el número de copias de genes del KCNB en una muestra es por hibridación *in situ*, por ejemplo, hibridación *in situ* de fluorescencia, o FISH. Los ensayos de hibridación *in situ* son muy conocidos (por ejemplo, Angerer (1987) *Meth. Enzymol* 152: 649). En general, la hibridación *in situ* comprende las siguientes etapas principales: (1) fijación de tejido o estructura biológica que se va a analizar; (2) tratamiento de prehibridación de la estructura biológica para incrementar la accesibilidad del ADN diana, y para reducir la unión no específica; (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos al ácido nucleico en la estructura biológica o en el tejido; (4) lavados de posthibridación para retirar fragmentos de ácidos nucleicos no unidos en la hibridación y (5) detección de los fragmentos de ácidos nucleicos hibridados.

Las sondas usadas en estas aplicaciones se marcan normalmente, por ejemplo, con radioisótopos o indicadores fluorescentes. Las sondas preferidas son lo suficientemente largas, por ejemplo, de desde aproximadamente 50, 100 ó 200 nucleótidos hasta aproximadamente 1000 o más nucleótidos, como para hibridarse específicamente con el/los ácido(s) nucleico(s) diana (s) bajo condiciones restrictivas.

En varias realizaciones, se usan procedimientos de "sonda comparativa", tales como hibridación genómica comparativa (CGH), para detectar la amplificación de genes. En los procedimientos de hibridación genómica comparativa, una extracción de "prueba" de ácidos nucleicos se marca con una primera marca, mientras que una segunda extracción (por ejemplo, de una célula o tejido sano) se marca con una segunda marca. La proporción de hibridación de los ácidos nucleicos se determina por la proporción de la primera y segunda marcas que se unen a cada fibra en un conjunto. Las diferencias en la proporción de las señales de las dos marcas, por ejemplo, debido a la amplificación de genes en la extracción de pruebas, se detectan y la proporción proporciona una medida del número de copias del gen del KCNB.

Los protocolos de hibridación adecuados para su uso con los procedimientos de la invención se describen, por ejemplo, en Albertson (1984) *EMBOJ.* 3:1227-1234; Pinkel (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9138-9142; publicación EPO NO 430.402; *Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols*, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994), etc.

En otra realización, se usan ensayos basados en amplificación para detectar la expresión del KCNB o para medir el número de copias de genes del KCNB. En estos ensayos, las secuencias de nucleótidos del KCNB presentes en una muestra sirven como una plantilla en una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad del producto de amplificación será proporcional a la cantidad de la plantilla en la muestra original. La comparación de los controles apropiados proporciona una medida del nivel de polinucleótido del KCNB en la muestra. Los procedimientos de amplificación cuantitativa son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los protocolos detallados para la PCR cuantitativa se proporcionan, por ejemplo, en Innis *et al* (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.). La secuencia de ácidos nucleicos para el KCNB (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5) es suficiente para permitir que un experto seleccione rutinariamente cebadores para amplificar cualquier porción del gen.

En algunas realizaciones, se usa un ensayo basado en TaqMan para cuantificar polinucleótidos del KCNB. Los ensayos basados en TaqMan usan una sonda de oligonucleótidos fluorogénicos que contiene un colorante fluorescente 5' y un agente de desactivación 3'. La sonda se hibrida a un producto de PCR, pero no se puede extender por sí misma debido a un agente de bloqueo en el extremo 3'. Cuando se amplifica el producto de PCR en ciclos posteriores, la actividad de nucleasa 5' de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq, da como resultado la escisión de la sonda TaqMan. Esta escisión separa el colorante fluorescente 5' y el agente de desactivación 3', dando como resultado de este modo un incremento en la fluorescencia como función de la amplificación (véase, por ejemplo, literatura proporcionada por Perkin-Elmer, por ejemplo, www2.perkin-elmer.com).

Otros procedimientos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace (1989) *Genomics* 4: 560, Landegren *et al* (1988) *Science* 241:1077, y Barringer *et al.* (1990) *Gene* 89:117), amplificación de la transcripción (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:1173), replicación de secuencias auto-mantenidas (Guatelli *et al* (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 1874), PCR en puntos, y PCR de adaptador de engarce, etc.

C. Expresión en procariontas y eucariotas

Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado o ácido nucleico, tal como un ADNc que codifica un polipéptido del KCNB, normalmente se subclona una secuencia del KCNB en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción, y si es para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al* y Ausubel *et al*. Los sistemas de expresión bacteriana para expresar la proteína del KCNB están disponibles, por ejemplo, en *E. coli*, *Bacillus sp.*, y *Salmonella* (Palva *et al*, *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach *et al.*, *Nature* 302:543-545 (1983). Los kits de estos sistemas de expresión están comercialmente disponibles. Los sistemas de expresión eucariota para células de mamíferos, levaduras y células de insecto son muy conocidos en la técnica y también están disponibles comercialmente. En una realización, el vector de expresión eucariota es un vector adenovírico, un vector adenoasociado, o un vector retrovírico.

Para aplicaciones terapéuticas, los ácidos nucleicos del KCNB se introducen en una célula, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, usando cualquiera de un gran número de procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a, infección con vectores víricos, procedimientos basados en liposomas, aceleración de partículas biolística (pistola génica), e inyección de ADN desnudo. Estos ácidos nucleicos terapéuticamente útiles incluyen, pero no se limitan a, secuencias de codificación para el KCNB de longitud completa, secuencias de codificación para un fragmento, dominio, derivado o variante del KCNB, secuencias antisentido del KCNB y ribozimas del KCNB. Normalmente, estas secuencias se unirán de forma operable a un promotor, pero en numerosas aplicaciones se administrará un ácido nucleico en una célula que por sí misma es terapéuticamente efectiva de forma directa, por ejemplo, determinadas moléculas antisentido o de ribozima.

El promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. El promotor se posiciona opcionalmente de forma aproximada a la misma distancia del sitio de inicio de transcripción heterólogo, tal como está del sitio de inicio de transcripción en su posición natural. Sin embargo, tal como se conoce en la técnica, se puede conseguir alguna variación en esta distancia sin perder la función del promotor.

Además del promotor, el vector de expresión contiene normalmente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico que codifica el KCNB en células huésped. Por tanto, un casete de expresión típico contiene un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del KCNB y las señales requeridas para la poliadenilación eficiente del transcrito, sitios de unión a ribosoma, terminación de la traducción. La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del KCNB se puede unir a una secuencia de péptido señal escindible para promover la secreción de la proteína codificada por la célula transfectada. Estos péptidos señal incluirían, entre otros, los péptidos señal del activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento insulínico y neuronal, y esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Elementos adicionales del casete puede incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico como gen estructural, intrones con sitios dadores y aceptores de ajuste funcionales.

Además de una secuencia promotora, el casete de expresión también debería contener una región de terminación de la transcripción corriente abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficiente. La región de terminación se puede obtener del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener de genes diferentes.

El vector de expresión particular usado para transportar la información genética en la célula no es especialmente importante. Se puede usar cualquiera de los vectores de convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariontas. Los vectores de expresión bacteriana estándar incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D, y sistemas de expresión de fusión, tales como GST y LacZ. También se pueden añadir etiquetas de epítopos a las proteínas recombinantes para proporcionar procedimientos de aislamiento convenientes, por ejemplo, etiqueta c-myc, HA, 6-His, proteína de unión de maltosa, etiqueta VSV-G, etiqueta anti-DYKDDDDK, o cualquier etiqueta, de las que un gran número son muy conocidas por los expertos en la técnica.

Los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas se usan normalmente en vectores de expresión eucariotas, por ejemplo, vectores de SV40, vectores de virus del papiloma, y vectores derivados de virus Epstein Barr. Otros vectores eucariotas ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor de CMV, promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que han mostrado eficacia para la expresión en células eucariotas.

Algunos sistemas de expresión presentan marcadores que proporcionan la amplificación de genes, tales como neomicina, timidina cinasa, higromicina B fosfotransferasa, e dihidrofolato reductasa. De forma alternativa, los sistemas de expresión de alto rendimiento que no implican la amplificación de genes también son adecuados, tal como el uso de un vector baculovirus en células de insecto, con una secuencia que codifica un polipéptido del KCNB bajo la dirección del promotor de polihedrina u otros promotores de baculovirus fuertes.

Los elementos que se incluyen normalmente en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica la resistencia a antibióticos para permitir la selección de bacterias que albergan

plásmidos recombinantes y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucariotas. El gen de resistencia a antibióticos particular elegido no es importante, cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica es adecuado. Las secuencias procariotas se eligen opcionalmente de modo que no interfieran con la replicación del ADN en células eucariotas, si es necesario.

- 5 Los procedimientos de transfección estándar se usan para producir líneas celulares de bacteria, mamífero, levadura o insecto que expresan grandes cantidades de una proteína del KCNB, y después se purifican usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Colley *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:17619- 17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, en *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariotas se realiza de acuerdo con técnicas estándar (véase, por ejemplo, Morrison, *J. Bact.* 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, *Methods in Enzymology* 101:347-362 (Wu *et al.*, eds, 1983).

- 10 Se puede usar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos exógenas en células huésped. Éstos incluyen el uso de reactivos tales como Superfect (Qiagen), liposomas, transfección de fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección, vectores plasmídicos, vectores víricos, aceleración de partículas biolística (pistola génica), o cualquiera de los otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico, ADNc, ADN sintético u otro material genético exógeno clonado en una célula huésped (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). Sólo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular usado pueda introducir con éxito al menos un gen en la célula huésped que puede expresar un gen del KCNB.

- 15 Después de que se introduzca el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorecen la expresión del polipéptido del KCNB, que se recupera del cultivo usando técnicas estándar identificadas a continuación. Los procedimientos de cultivo de células procariotas o eucariotas son muy conocidos y se enseñan, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, Sambrook *et al.*, and in Freshney, *Culture of Animal Cells*. 3d. Ed., (1993), A Wiley-Liss Publication.

IV. Purificación de polipéptidos del KCNB

- 25 Los polipéptidos del KCNB naturales o bien recombinantes se pueden para su uso en ensayos funcionales, ensayos de unión, ensayos diagnósticos y otras aplicaciones. Los polipéptidos del KCNB naturales se purifican, por ejemplo, a partir de tejido de mamífero, tal como sangre, tejido linfático, o cualquier otra fuente de un homólogo del KCNB. Los polipéptidos del KCNB recombinantes se purifican a partir de cualquier sistema de expresión bacteriana o eucariota, por ejemplo, células CHO o células de insecto.

- 30 Las proteínas del KCNB se pueden purificar para una pureza sustancial por técnicas estándar, que incluyen, pero no se limitan a, precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio; cromatografía en columna, procedimientos de inmunopurificación, y otras (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); patente de EE. UU. NO 4.673.641; Ausubel *et al.*, *supra*; y Sambrook *et al.*, *supra*).

- 35 Se pueden emplear una serie de procedimientos cuando se va a purificar el polipéptido del KCNB recombinante. Por ejemplo, las proteínas que tienen propiedades de adhesión molecular establecidas se pueden fusionar de forma reversible al polipéptido del KCNB. Con el ligando apropiado, se puede absorber de forma selectiva un polipéptido del KCNB en una columna de purificación y después se puede liberar de la columna de una forma relativamente pura. Después, se retiran las proteínas fusionadas por actividad enzimática. Las proteínas del KCNB también se pueden purificar usando columnas de inmunofinidad.

A. Purificación de proteínas del KCNB recombinantes

- 40 Las proteínas recombinantes se expresan por células de bacterias o eucariotas transformadas, tales como células CHO o células de insecto en grandes cantidades, normalmente después de la inducción del promotor, pero la expresión puede ser constitutiva. La inducción del promotor con IPTG es un ejemplo de un sistema de promotor inducible. Se cultivan las células de acuerdo con procedimientos estándar en la técnica. Se usan células recién obtenidas o congeladas para el aislamiento de la proteína.

- 45 Las proteínas expresadas en bacterias pueden formar agregados insolubles ("cuerpos de inclusión"). Varios protocolos son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión del KCNB. Por ejemplo, la purificación de cuerpos de inclusión normalmente implica la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión por la alteración de células bacterianas por ejemplo, por incubación en un tampón de TRIS 50 mM/HCl, pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 0,1 mM, PMSF 1 mM. La suspensión celular se puede lisar usando 2-3 pasos a través de una prensa francesa, homogeneizar usando un Polytron (Briikman Instruments) o someter a sonicación en hielo.
- 50 Los procedimientos alternativos de lisado de bacterias son patentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, Ausubel *et al.*, *supra*).

- 55 En caso necesario, los cuerpos de inclusión se solubilizan, y la suspensión celular lisada normalmente se centrifuga para retirar la materia insoluble no deseada. Las proteínas que formaron los cuerpos de inclusión se pueden renaturalizar por dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, urea (de desde aproximadamente 4 M hasta aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente un 80 %, base volumen/volumen) y clorhidrato de guanidina (de desde aproximadamente 4 M hasta aproximadamente 8

M). Algunos disolventes que pueden solubilizar proteínas que forman agregados, por ejemplo SDS (dodecilsulfato de sodio) y un 70 % de ácido fórmico, son inapropiados para su uso en este procedimiento debido a la posibilidad de desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañada de una falta de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y la renaturalización se puede producir después de la retirada (por diálisis, por ejemplo) o la dilución del desnaturalizante, permitiendo la reformación de proteína inmunológica y/o biológicamente activa. Otros tampones adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Los polipéptidos del KCNB se separan de otras proteínas bacterianas por técnicas de separación estándar, por ejemplo, con resina de agarosa Ni-NTA.

De forma alternativa, se puede purificar los polipéptidos del KCNB de periplasma de bacterias. Después de la lisis de las bacterias, cuando se exporta una proteína del KCNB dentro del periplasma de las bacterias, la fracción periplásmica de las bacterias se puede aislar por choque osmótico frío, además de otros procedimientos conocidos por expertos en la técnica. Para aislar proteínas recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se resuspende en un tampón que contiene un 20 % de sacarosa. Para lisis de las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en $MgSO_4$ y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar de las proteínas de huésped por técnicas de separación estándar muy conocidas por los expertos en la técnica.

B. Técnicas de separación de proteínas estándar para purificar polipéptidos de KCNB

A menudo como una etapa inicial, en particular si la mezcla de proteína es compleja, un fraccionamiento de sal inicial puede separar muchas de las proteínas de células huésped no deseadas (o proteínas derivadas del medio de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés. La sal preferida es sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita las proteínas reduciendo eficazmente la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Después, las proteínas precipitan en base a su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, más probable es que precipite a concentraciones de sulfato de amonio menores. Un protocolo típico incluye añadir sulfato de amonio saturado a una solución de proteína de modo que la concentración de sulfato de amonio resultante es de entre un 20-30 %. Esta concentración precipitará las proteínas más hidrófobas. Después, el precipitado se desecha (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante a una concentración conocida para precipitar la proteína de interés. Después, el precipitado se solubiliza en tampón y el exceso de sal se retira en caso necesario, a través de la diálisis o bien diafiltración. Otros procedimientos que se basan en la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación con etanol frío, son muy conocidos por los expertos en la técnica y se pueden usar para fraccionar mezclas de proteínas complejas.

Se puede añadir el peso molecular de una proteína del KCNB para aislarla de proteínas de mayor y menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferente tamaño de poro (por ejemplo, membranas Amicon o Millipore). En una primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene corte de peso molecular menor que el peso molecular de la proteína de interés. Después, lo retenido de la ultrafiltración se ultrafiltra contra una membrana con un corte molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana dentro del filtrado. Después, el filtrado se puede cromatografiar tal como se describe a continuación.

Las proteínas del KCNB también se pueden separar de otras proteínas en base a su tamaño, carga superficial neta, hidrofobicidad y afinidad para moléculas heterólogas. Además, los anticuerpos obtenidos contra proteínas se pueden conjugar con matrices de columna y las proteínas inmunopurificadas. Todos estos procedimientos son muy conocidos en la técnica. Será patente para un experto que las técnicas cromatográficas se pueden realizar a cualquier escala y usando un equipo de diferentes fabricantes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

V. Anticuerpos para miembros de la familia del KCNB

En varias realizaciones de la presente invención, se usarán anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos del KCNB. Estos anticuerpos tienen numerosas aplicaciones, incluyendo para la modulación de la actividad del KCNB y para inmunoensayos para detectar el KCNB, y variantes, derivados, fragmentos, etc. del KCNB. se pueden usar inmunoensayos para analizar cualitativa o cuantitativamente el polipéptido del KCNB. Una revisión general de la tecnología aplicable se puede encontrar en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988). En algunas realizaciones, se usan anticuerpos para detectar KCNB para aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico.

Un anticuerpo a KCNB también puede comprender un anticuerpo quimérico en el que el anticuerpo o un subfragmento del mismo se une a una molécula en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) se una a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, , etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia con una región variable que tenga una especificidad antigénica diferente o alterada. Estos anticuerpos pueden ser útiles, por ejemplo, como reactivos dirigidos para dirigir un resto tal como una toxina a una célula que expresa el KCNB.

Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con polipéptidos del KCNB son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *supra*, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975). Estas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de los anticuerpos de colecciones de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)).

Se puede usar una serie de inmunógenos que comprenden KCNB para producir anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido del KCNB. Por ejemplo, una proteína del KCNB recombinante, o un fragmento antigénico de la misma, se aísla tal como se describe en el presente documento. La proteína recombinante se pueden expresar en células eucariotas o procariontas, tal como se describe anteriormente, y se pueden purificar tal como se describe en general anteriormente. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. De forma alternativa, un péptido sintético derivado de las secuencias dadas a conocer en el presente documento y conjugado con una proteína vehículo se puede usar como inmunógeno. También se puede usar una proteína natural en forma pura o bien impura. Después, el producto se inyecta en un animal que puede producir anticuerpos. Se pueden generar anticuerpos monoclonales o bien policlonales, para su uso posterior en inmunoensayos para medir la proteína.

Los procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales son conocidos por los expertos en la técnica. Una cepa endogámica de ratones (por ejemplo, ratones BALB/C) o conejos se inmuniza con la proteína usando un coadyuvante estándar, tal como coadyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización estándar. Se monitoriza la respuesta inmunitaria del animal a la preparación de inmunógeno tomando sangrados de prueba y determinando la valoración de la reactividad con el polipéptido del KCNB. Cuando se obtienen valoraciones apropiadamente altas de anticuerpo para el inmunógeno, se recoge la sangre del animal y se preparan los antisueros. Si se desea, se puede realizar un fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer de anticuerpos reactivos a la proteína (véase Harlow y Lane, *supra*).

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales por diversas técnicas familiares para los expertos en la técnica. En Resumen, las células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado se immortalizan, comúnmente por fusión con una célula de mieloma (véase Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976)). Los procedimientos alternativos de immortalización incluyen transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Las colonias que surgen a partir de células immortalizadas individuales se criban para la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por estas células se puede potenciar por determinadas técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado.

De forma alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo cribando una colección de ADN a partir de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general por Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989).

Los anticuerpos monoclonales y sueros policlonales se recogen y se valoran contra la proteína inmunógena en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida, con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Normalmente, se seleccionan antisueros policlonales una valoración de 10^4 o mayor y se someten a prueba para determinar su reactividad cruzada frente a las proteínas no-KCNB, o incluso proteínas relacionadas de otros organismos, usando un inmunoensayo de unión competitiva. Los antisueros policlonales específicos y los anticuerpos monoclonales normalmente se unirán con una K_d de al menos aproximadamente 0,1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 1 μ M, opcionalmente al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y opcionalmente 0,01 μ M o mejor.

A. Ensayos de unión inmunológica

Una vez estén disponibles los anticuerpos específicos del KCNB, se pueden seleccionar las proteínas del KCNB individuales mediante una variedad de procedimientos de inmunoensayo. Para una revisión de los inmunoensayos generales, véase también *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Tot, eds., 7ª ed. 1991). Además, los inmunoensayos de la presente invención se pueden realizar en cualquiera de las diversas configuraciones, que se revisan ampliamente en *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); y Harlow y Lane, *supra*. Los ensayos de unión inmunológica (o inmunoensayos) usan normalmente un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o antígeno de elección (en este caso una proteína del KCNB o una subsecuencia antigénica de la misma). El anticuerpo (por ejemplo, anti-KCNB) se puede producir por cualquiera de una serie de medios muy conocidos por los expertos en la técnica y como se describe anteriormente.

Los inmunoensayos también usan a menudo un agente marcador para unirse específicamente y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente marcador puede ser por sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo anticuerpo/antígeno. Por tanto, el agente marcador puede ser un polipéptido del KCNB marcado o un anticuerpo anti-KCNB marcado. De forma alternativa, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo anticuerpo/KCNB (un anticuerpo secundario

normalmente es específico para anticuerpos de las especies de las que se deriva el primer anticuerpo). Otras proteínas que se pueden unir específicamente a regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como proteína A o proteína G, también se pueden usar como el agente marcador. Estas proteínas muestran una reactividad no inmunógena fuerte con regiones constantes de inmunoglobulinas de una variedad de especies (véase, por ejemplo, Kronval *et al.*, *J. Immunol.* 111:1401-1406 (1973); Akerstrom *et al.*, *J. Immunol.* 135:2589-2542 (1985)). El agente marcador se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, al que se puede unir específicamente otra molécula, tal como estreptavidina. Una variedad de restos detectables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Durante los ensayos, se pueden requerir etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de desde aproximadamente 5 segundos hasta varias horas, opcionalmente de desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, del antígeno, del volumen de solución, de las concentraciones y similares. Normalmente, los análisis se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque se pueden llevar a cabo en un intervalo de temperaturas, tales como de 10 °C a 40 °C.

1. Formatos de ensayo no competitivo

Los inmunoensayos para detectar una proteína del KCNB en una muestra pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de antígeno se mide directamente. En un ensayo de tipo "sándwich" preferido, por ejemplo, los anticuerpos anti-KCNB se pueden unir directamente a un sustrato sólido sobre el que se inmovilizan. Después, estos anticuerpos inmovilizados capturan la proteína del KCNB presente en la muestra de prueba. La proteína del KCNB así inmovilizada, se une después por un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo del KCNB que lleva una marca. De forma alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de una marca, pero, a su vez, se puede unir por un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie de la que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo o tercer anticuerpo se modifica normalmente con un resto detectable, tal como biotina, al que se une específicamente otra molécula, por ejemplo, estreptavidina, para proporcionar un resto detectable.

2. Formatos de ensayo competitivo

En ensayos competitivos, la cantidad de proteína del KCNB presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de una proteína del KCNB añadida (exógena), conocida, desplazada (por competición) de un anticuerpo anti-KCNB por la proteína del KCNB desconocida presente en una muestra. En un ensayo competitivo, se añade una cantidad conocida de proteína del KCNB a una muestra y después, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del KCNB. La cantidad de proteína del KCNB exógena unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de proteína del KCNB presente en la muestra. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de proteína del KCNB unida al anticuerpo se puede determinar midiendo la cantidad de proteína del KCNB presente en un complejo KCNB/anticuerpo, o bien de forma alternativa midiendo la cantidad de proteína no complejada restante. La cantidad de proteína del KCNB se puede detectar proporcionando una molécula del KCNB marcada.

Un ensayo de inhibición de hapteno es otro ensayo competitivo preferido. En este ensayo, la proteína del KCNB conocida se inmoviliza sobre un sustrato sólido. Se añade una cantidad conocida de anticuerpo anti-KCNB a la muestra y después, la muestra se pone en contacto con el KCNB inmovilizado. La cantidad de anticuerpo anti-KCNB unido a la proteína del KCNB inmovilizada conocida es inversamente proporcional a la cantidad de proteína del KCNB presente en la muestra. De nuevo, se puede detectar la cantidad de anticuerpo inmovilizado detectando la fracción inmovilizada de anticuerpo o bien la fracción de anticuerpo que permanece en solución. La detección puede ser directa cuando se marca el anticuerpo o indirecta por la adición posterior de un resto marcado que se une específicamente al anticuerpo tal como se describe anteriormente.

3. Determinaciones de reactividad cruzada

También se pueden usar inmunoensayos en el formato de unión competitiva para determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, una proteína al menos parcialmente codificada por la SEQ ID NO: 2 se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. Se añaden proteínas (por ejemplo, proteínas del KCNB y homólogos) al ensayo que compiten por la unión de los antisueros con el antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas añadidas de competir por la unión de los antisueros con las proteínas inmovilizadas se compara con la capacidad del polipéptido del KCNB codificado por la SEQ ID NO: 2 para competir con el mismo. La reactividad cruzada en porcentaje para las proteínas anteriores se calcula usando cálculos estándar. Los antisueros con menos de un 10 % de reactividad cruzada con cada una de las proteínas añadidas mencionadas anteriormente se seleccionan y se agrupan. Los anticuerpos de reactividad cruzada se retiran opcionalmente de los antisueros agrupados por inmunoabsorción con las proteínas añadidas consideradas, por ejemplo, homólogos relacionados de forma más distante.

Los antisueros inmunoabsorbidos y agrupados se usan después en un inmunoensayo de unión competitiva, tal como se describe anteriormente, para comparar una segunda proteína, que se es quizás un alelo o variante polimórfica de una proteína del KCNB, con la proteína inmunógena (es decir, proteína del KCNB codificada por SEQ ID NO: 2). Con

el fin de realizar esta comparación, cada una de las dos proteínas se evalúan en un amplio intervalo de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína requerida para inhibir un 50 % de la unión de los anticuerpos a la proteína a inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida para inhibir un 50 % de la unión es menor de 10 veces la cantidad de la proteína codificada por la SEQ ID NO: 2 que se requiere para inhibir un 50 % de la unión, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados para un inmunógeno del KCNB.

Los anticuerpos policlonales que se unen específicamente a una proteína del KCNB de una especie particular se pueden preparar sustrayendo anticuerpos de reactividad cruzada usando homólogos del KCNB. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para el KCNB humano se pueden preparar sustrayendo anticuerpos que son de reacción cruzada con el KCNB de ratón. De manera análoga, los anticuerpos específicos para una proteína del KCNB particular se pueden preparar en un organismo con genes del *KCNB* múltiples.

4. Otros formatos de ensayo

Se usa el análisis de transferencia de tipo Western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia de proteína KCNB en una muestra. En general, esta técnica comprende separar proteínas de muestra por electroforesis en gel en base al peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado, (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivatizado), e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína del KCNB. Los anticuerpos de polipéptidos anti-KCNB se unen específicamente al polipéptido del KCNB sobre el soporte sólido. Estos anticuerpos se pueden marcar directamente o, de forma alternativa, se pueden detectar posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos anti-ratón de oveja marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-KCNB.

Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberan reactivos o marcadores encapsulados. Los productos químicos liberados se detectan después de acuerdo con técnicas estándar (véase Monroe *et al.*, *Amer. Clin. Prod. Rev.* 5:34-41 (1986)).

Un experto en la técnica apreciará que a menudo es deseable minimizar la unión no específica en inmunoensayos. En particular, cuando el ensayo implica un antígeno o anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido, es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los medios de reducción de esta unión no específica son muy conocidos por los expertos en la técnica. Normalmente, esta técnica implica revestir el sustrato con una composición proteínica. En particular, las composiciones de proteínas, tales como albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo no grasa y gelatina se usan ampliamente, siendo la leche en polvo la más preferida.

5. Etiquetas

La marca particular o grupo detectable usado en el ensayo no es un aspecto importante de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo usado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Se han desarrollado bien estas marcas detectables en el campo de los inmunoensayos y, en general, se puede aplicar cualquier marca útil en estos procedimientos a la presente invención. Por tanto, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las etiquetas útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros usados comúnmente en un ELISA), y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, *etc.*).

La marca se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con procedimientos muy conocidos en la técnica. Como se indica anteriormente, se puede usar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las previsiones de eliminación.

Las marcas no radioactivas a menudo se unen por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. Después, el ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), que se puede detectar de forma inherente o bien que se une covalentemente a un sistema de señales, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Los ligandos y sus dianas se pueden usar en cualquier combinación adecuada con los anticuerpos que reconocen una proteína del KCNB o anticuerpos secundarios que reconocen anti-KCNB.

Las moléculas también se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, en particular fosfatasas, esterasas y glucosidasas, u oxidasas, en particular peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, *etc.* Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas, por ejemplo, iuminol. Para una

revisión de diversos sistemas productores de marcas o señales que se pueden usar, véase, la patente de los Estados Unidos NO 4.391.904.

Los expertos en la técnica conocen bien los medios de detección de marcadores. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radioactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando la marca es una marca fluorescente, se puede detectar excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por medio de película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, las marcas enzimáticas se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, las marcas colorimétricas simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado con la marca. Así, en diversos ensayos de tira reactiva, el oro conjugado aparece a menudo como rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana, en este caso, las partículas recubiertas de antígeno se aglutinan por muestras que comprende los anticuerpos diana. En este formato, no se necesita marcar ninguno de los componentes y la presencia del anticuerpo diana se detecta por inspección visual simple.

VI. Diagnóstico de enfermedades asociadas con actividad o expresión del *KCNB* alterada

Los ácidos nucleicos, proteínas y/o anticuerpos del *KCNB* se pueden usar de forma diagnóstica o de pronóstico para detectar enfermedades o afecciones asociadas con la actividad o expresión del *KCNB* alterada con respecto al valor normal. Estas enfermedades se pueden asociar con una disminución o bien un incremento en la actividad o expresión del *KCNB*. La actividad o expresión del *KCNB* se puede detectar usando cualquiera de una variedad de reactivos incluyendo, por ejemplo, proteína del *KCNB*, ARNm, ADN genómico o anticuerpos para el *KCNB*. Los cambios en la actividad pueden indicar alteraciones, (por ejemplo, número de copias del gen del *KCNB*, mutaciones en la secuencia del gen del *KCNB*, alteraciones en la transcripción, traducción, ARN, nivel de proteínas, estabilidad de proteínas o actividad de proteínas. Por consiguiente, se puede usar cualquiera de un gran número de ensayos, cuyos ejemplos se proporcionan en el presente documento, para detectar los ácidos nucleicos o polipéptidos del *KCNB*.

En consecuencia, las presentes secuencias se pueden usar para tratar cualquiera de los trastornos o afecciones descritos en el presente documento en un paciente, en el que una alteración en el nivel de expresión o actividad del *KCNB*, o la detección de una mutación perjudicial en un polinucleótido o polipéptido del *KCNB*, indica la presencia o la probabilidad de la enfermedad o afección. Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos de detección o diagnóstico de enfermedades o la probabilidad de enfermedad para enfermedades que están asociadas con un incremento o disminución de la actividad del *KCNB*. Éstas incluyen cáncer (descrita además a continuación) trastornos asociados con el cerebro, tales como epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, esclerosis múltiple, migraña, y trastorno psiquiátrico incluyendo depresión, esquizofrenia, trastorno bipolar, así como otros (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12^a edición, Wilson, *et al.*, eds., McGraw-Hill, Inc.). Otras enfermedades incluyen enfermedades relacionadas con el corazón, tales como arritmias, fallo cardiaco, y diversas enfermedades vasculares (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12^a edición, Wilson, *et al.*, ed., McGraw-Hill, Inc.) y enfermedades relacionadas con el páncreas, tales como pancreatitis, diabetes, otras anomalías de secreción hormonal en el páncreas, por ejemplo, secreción de glucagón, somatostatina (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12^a edición, Wilson, *et al.*, eds., McGraw-Hill, Inc).

En determinadas realizaciones, por ejemplo, diagnóstico de cáncer, se cuantificará el nivel de actividad de polinucleótido, polipéptido o proteína del *KCNB*. En estas realizaciones, la diferencia entre el nivel del *KCNB* en una muestra biológica de un paciente que tiene, o que se sospecha que tiene un trastorno asociado con *KCNB*, y un nivel de control normal será de forma preferente estadísticamente significativa. Normalmente, la presencia de diagnóstico a menudo representa al menos aproximadamente una alteración de 1,5, 2, 5, 10, o más veces en el nivel de polipéptido o polinucleótido del *KCNB* en la muestra biológica en comparación con un nivel esperado en una muestra de control, tal como una muestra de material biológico representativo de un sujeto sano o tejido normal. La detección del *KCNB* se puede realizar *in vitro*, es decir, en células dentro de una muestra biológica tomada del mamífero, o *in vivo*. Un "presencia diagnóstica" indica cualquier nivel del *KCNB* que se altera del esperado en una muestra de control normal.

En una realización, se puede usar un ácido nucleico o proteína del *KCNB* como herramienta de diagnóstico o pronóstico, solo o en combinación con otros procedimientos de diagnóstico para detectar incrementos en el número de copias o la expresión del *KCNB* que están asociados con cáncer por ejemplo, de mama o pulmón, así como otros cánceres tales como cánceres epiteliales, por ejemplo, colorrectal, próstata, riñón, estómago, vejiga, ovárico, o un cáncer del tubo digestivo. La detección de ácidos nucleicos o proteínas del *KCNB* también se puede usar para monitorizar la eficacia de un tratamiento de cáncer. Por ejemplo, el nivel de proteína o ácido nucleico del *KCNB* después de un tratamiento antineoplásico se puede comparar con el nivel antes del tratamiento, en el que una reducción del nivel del ácido nucleico o proteína del *KCNB* después del tratamiento indica un tratamiento eficaz. Los niveles de proteína o ácido nucleico del *KCNB* también se pueden usar para influir en la elección del tratamiento antineoplásico en un mamífero en el que, por ejemplo, un gran incremento de *KCNB* indica el uso de un tratamiento antineoplásico más agresivo y un pequeño incremento o ningún incremento indica el uso de un tratamiento

antineoplásico menos agresivo. Además, la capacidad para detectar células cancerosas que muestran una actividad o expresión del KCNB alterada puede ser útil en la monitorización, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*, del número y/o la ubicación de las células cancerosas en un paciente para evaluar el progreso de la enfermedad con el tiempo.

VII. Modulación de la actividad del KCNB

5 A. Ensayos para determinar moduladores de proteínas del KCNB

En varias realizaciones de esta invención, se modulará el nivel de actividad del KCNB en una célula administrando a la célula, *in vivo* o *in vitro*, cualquiera de un gran número de moléculas moduladoras del KCNB, por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, carbohidratos, o a cualquier molécula orgánica o inorgánica.

10 Para identificar moléculas que pueden modular el KCNB, se realizarán ensayos para detectar el efecto de diferentes moduladores candidatos sobre la actividad del KCNB en una célula. Se puede evaluar la actividad de polipéptidos del KCNB usando una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar los efectos funcionales, químicos y físicos, por ejemplo, medición de la unión del KCNB a otras moléculas (por ejemplo, unión radiactiva), medición de niveles de ARN y proteína del KCNB o medición de otros aspectos de polipéptidos del KCNB, por ejemplo, niveles de fosforilación, niveles de transcripción, capacidad para proteger a las células de la apoptosis (muerte celular programada), actividad receptora o del canal, y similares. Se pueden usar estos ensayos para someter a prueba tanto activadores como inhibidores de proteínas del KCNB. Los moduladores así identificados son útiles para, por ejemplo, muchas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

20 La actividad del canal de potasio de las proteínas del KCNB se pueden evaluar usando una variedad de ensayos para medir cambios en flujos iónicos, incluyendo técnicas de pinzamiento zonal de membrana, medida de corrientes de la célula completa, ensayos de flujo de rubidio radiomarcado, y ensayos de fluorescencia usando colorantes sensibles al voltaje (véase, por ejemplo, Vestergarrd-Bogind *et al*, *J. Membrane Biol* 88:67-75 (1988); Daniel *et al*, *J. Pharmacol Meth.* 25:185-193 (1991); Hoevinsky *et al*, *J. Membrane Biol* 137:59-70 (1994)). Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína del KCNB u homólogo de la misma se puede inyectar en ovocitos de *Xenopus*. Después, se puede evaluar la actividad del KCNB midiendo los cambios en la polarización de la membrana, es decir, los cambios en el potencial de membrana. Un medio preferido para obtener medidas electrofisiológicas es midiendo corrientes usando técnicas de pinzamiento zonal de membrana, por ejemplo, el modo "unido a célula", el modo "de dentro a fuera", y el modo de "célula completa" (véase, por ejemplo, Ackerman *et al.*, *New Engl J. Med.* 336:1575-1595,1997). Las corrientes de célula completa se pueden determinar usando metodología estándar tal como la descrita por Hamil *et al.*, *Pflugers. Archiv.* 391:185 (1981).

30 También se puede evaluar la actividad del KCNB, tal como la protección de la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la capacidad del KCNB para proteger a las células de la muerte celular programada inducida por TNF- α usando la metodología descrita en el ejemplo 4.

Normalmente, la proteína del KCNB del ensayo será un polipéptido recombinante o natural, con una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante conservadoramente modificada de la misma. De forma alternativa, la proteína del KCNB del ensayo se derivará de un eucariota e incluirá una subsecuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En general, la identidad de secuencia de aminoácidos será de al menos un 70 %, opcionalmente al menos un 75 %, 85 % o 90 %; u opcionalmente al menos de un 95 % a un 98 %. Opcionalmente, el polipéptido de los ensayos comprenderá un dominio de una proteína del KCNB, tal como un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, un bucle extracelular, uno o más dominios transmembrana y similares. En determinadas realizaciones, un dominio de una proteína del KCNB, por ejemplo, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, un bucle extracelular, o uno o más dominios transmembrana, se une a un sustrato sólido y se usa, por ejemplo, para aislar cualquier molécula que se pueda unir y/o modular su actividad. En determinadas realizaciones, un dominio de un polipéptido del KCNB, por ejemplo, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, un bucle extracelular, o uno o más dominios transmembrana, se fusiona con un polipéptido heterólogo, formando de este modo un polipéptido quimérico. Estos polipéptidos quiméricos también son útiles, por ejemplo, en ensayos para identificar los moduladores de KCNB.

50 Las muestras o ensayos que se tratan con un inhibidor o activador de proteína del KCNB potencial se comparan con las muestras de control sin el compuesto de prueba, para examinar la extensión de la modulación. Las muestras de control (no tratadas con activadores o inhibidores) se asignan con un valor de actividad del KCNB relativo de 100. Se logra la inhibición de una proteína del KCNB cuando el valor de la actividad del KCNB con relación al control es de aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 50 %, opcionalmente aproximadamente un 25-0 %. Se logra la activación de una proteína del KCNB cuando el valor de la actividad del KCNB con relación al control es de aproximadamente un 110 %, opcionalmente, de aproximadamente un 150 %, 200-500 %, o aproximadamente un 1000-2000 %.

55 Se pueden determinar los efectos de los compuestos de prueba sobre la función de los polipéptidos examinando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Se puede usar cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte a la actividad del KCNB para evaluar la influencia de un compuesto de prueba sobre los polipéptidos de esta invención. Cuando se determinan las consecuencias funcionales usando células intactas o animales, también se

puede medir una variedad de efectos tales como cambios en el crecimiento celular o cambios en el pH, cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como Ca^{2+} , IP3, cGMP o cAMP o cambios en el potencial de membrana de las células.

- 5 Una célula huésped que contiene una proteína del KCNB de interés se pone en contacto con un compuesto de prueba durante un tiempo suficiente para llevar a cabo cualquier interacción, y después se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para llevar a cabo estas se puede determinar empíricamente, tal como dejar parar un tiempo y midiendo el nivel de transcripción en función del tiempo. Se puede medir la cantidad de transcripción usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica que sea adecuado. Por ejemplo, se puede detectar la expresión de ARNm de la proteína de interés usando transferencia de tipo Northern o detectando sus productos polipéptidos usando inmunoensayos.

B. Ensayos para determinar compuestos que interactúan con KCNB

- 15 En determinadas realizaciones, se realizarán ensayos para identificar moléculas que interactúan físicamente con proteínas del KCNB. Estas moléculas pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo polipéptidos, polinucleótidos, aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos, o cualquier otra molécula orgánica o inorgánica. Estas moléculas pueden representar moléculas que interaccionan normalmente con KCNB o pueden ser moléculas sintéticas u otras que pueden interactuar con KCNB y que se pueden usar potencialmente como compuestos principales para identificar clases de moléculas que pueden interactuar con y/o modular el KCNB. Estos ensayos pueden representar ensayos de unión física, tales como cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación, pantallas de doble híbrido, u otros ensayos de unión, o pueden representar ensayos genéticos.

- 20 En cualquiera de los ensayos de unión o funcionales descritos en el presente documento, *in vivo* o *in vitro*, se puede usar cualquier proteína del KCNB o cualquier derivado, variación, homólogo o fragmento de una proteína del KCNB. Preferentemente, la proteína del KCNB es idéntica al menos aproximadamente en un 70 % a la SEQ ID NO: 1. En varias realizaciones, se usa un fragmento de una proteína del KCNB. Por ejemplo, se puede usar un fragmento que contiene un dominio N-terminal o C-terminal, o un bucle extracelular o dominio transmembrana. Estos fragmentos se pueden usar solos, en combinación con otros fragmentos del KCNB o en combinación con secuencias de proteínas heterólogas, por ejemplo, los fragmentos se pueden fusionar con polipéptidos heterólogos, formando de este modo un polipéptido quimérico.

- 30 Los compuestos que interaccionan con proteínas del KCNB se pueden aislar en base a una capacidad de unirse específicamente a una proteína del KCNB o un fragmento de la misma. En varias realizaciones, la proteína del KCNB o fragmento de proteína se unirá a un soporte sólido. En una realización, se preparan columnas de afinidad usando el polipéptido del KCNB y se identifican moléculas que interactúan físicamente. Será patente para un experto que se pueden realizar técnicas cromatográficas en cualquier escala y usando un equipo de distintas fabricaciones (por ejemplo, Pharmacia Biotechnology). Además, se pueden identificar moléculas que interactúan con proteínas del KCNB *in vivo* por co-inmunoprecipitación u otros procedimientos, es decir, inmunoprecipitando la proteína del KCNB usando anticuerpos anti-KCNB de una célula o extracto celular e identificando compuestos, por ejemplo, que se precipitan junto con la proteína del KCNB. Estos procedimientos son muy conocidos por los expertos en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Ausubel *et al*, Sambrook *et al*, y Harlow y Lane, todos *supra*.

C. Moduladores y compuestos de unión

- 40 Los compuestos sometidos a prueba como moduladores de una proteína KCNB pueden ser cualquier compuesto químico orgánico o inorgánico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Normalmente, los compuestos de prueba serán moléculas químicas pequeñas y péptidos. Esencialmente, se puede usar cualquier compuesto químico como modulador potencial o compuesto de unión en los ensayos de la invención, aunque a menudo se usan los compuestos que se pueden disolver en soluciones acuosas u orgánicas (en especial, basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para cribar grandes colecciones químicas automatizando las etapas del ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente adecuada para los ensayos, que se desarrollan normalmente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microvaloración sobre placas de microvaloración en ensayos robóticos). Se apreciará que hay muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika- Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

- 50 En una realización preferida, los procedimientos de cribado de rendimiento alto implican proporcionar una colección combinatoria química o de péptidos que contenga un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (modulador potencial o compuestos de unión). Estas "colecciones químicas combinatorias" se criban después en uno o más ensayos, como se describe en el presente documento, para identificar los miembros de la colección (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales o se pueden usar por si mismos como productos terapéuticos potenciales o reales.

Una colección química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o bien por síntesis biológica, combinando un número de "bloques de construcción" químicos tales como

reactivos. Por ejemplo, una colección química combinatoria lineal, tal como una colección de polipéptidos, se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos (aminoácidos) en todas las formas posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos de un compuesto de polipéptido). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de esta mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos.

La preparación y el cribado de colecciones químicas combinatorias es muy conocida por los expertos en la técnica. Estas colecciones químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, colecciones de péptidos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493 (1991) y Houghton *et al*, *Nature* 354:84-88 (1991)). También se pueden usar otros productos químicos para generar colecciones de diversidad química. Estos compuestos químicos incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 92/00091) benzodiazepinas (por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)), péptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann *et al*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de colecciones de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al*, *Science* 261:1303 (1993)), y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell *et al*, *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)), colecciones de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook, todos *supra*), colecciones de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.539.083), colecciones de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14 (3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287), colecciones de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang *et al.*, *Science*, 274:1520-1522 (1996) y la patente de los EE.UU. N.º 5.593.853), colecciones de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, patente de los EE.UU. 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente de los EE.UU. N.º 5.549.974; pirrolidinas, la patente de los EE.UU. N.º 5.525.735 y 5.514.785; compuestos de morfolino, patente de los EE.UU. N.º 5.506.337; benzodiazepinas, patente de los EE.UU. N.º 5.288.514 y similares).

Los dispositivos para la preparación de colecciones combinatorias están comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas colecciones combinatorias están comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, *etc.*).

1. Ensayos en estado sólido y de alto rendimiento

En una realización, la invención proporciona ensayos solubles usando moléculas tales como un dominio N-terminal o C-terminal, solo o bien unido covalentemente a una proteína heteróloga para crear una molécula quimérica. En otra realización, la invención proporciona ensayos *in vitro* basados en fase sólida en un formato de alto rendimiento, en los que un dominio, molécula quimérica, proteína del KCNB o célula o tejido que expresa una proteína del KCNB está unido a un sustrato de fase sólida.

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible cribar hasta varios miles de moduladores diferentes en un solo día. En particular, se puede usar cada pocillo de una placa de microvaloración para realizar un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado, o, si se van a observar los efectos de la concentración o del tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden probar un solo modulador. Por tanto, una sola placa de microvaloración estándar puede analizar aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces, una sola placa puede fácilmente analizar de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible poner analizar varias placas diferentes por día, es posible analizar cribados de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, se han desarrollado enfoques microfluídicos para la manipulación de reactivos.

La molécula de interés se puede unir al componente en estado sólido, directa o indirectamente, por medio de enlace covalente o no covalentes, por ejemplo, a través de una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una variedad de componentes. En general, una molécula que se une a la etiqueta (un enlazador de etiqueta) se fija a un soporte sólido, y la molécula etiquetada de interés se une al soporte sólido por interacción de la etiqueta y el enlazador de etiqueta.

Se puede usar una serie de etiquetas y enlazadores de etiqueta, en base a las interacciones moleculares conocidas bien descritas en la literatura. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un enlazador natural, por ejemplo, biotina, proteína A, o proteína G, se puede usar junto con enlazadores de etiqueta apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, *etc.*) Los anticuerpos para moléculas con enlazadores naturales tales como biotina también están ampliamente disponibles y enlazadores de etiqueta apropiados; véase, SIGMA Immunochemicals, catálogo de 1998, SIGMA, St. Louis MO).

Igualmente, se puede usar cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo apropiado para formar un par etiqueta/enlazador de etiqueta. Miles de anticuerpos específicos están comercialmente disponibles

y muchos anticuerpos adicionales se describen en la literatura. Por ejemplo, en una configuración común, la etiqueta es un primer anticuerpo y el enlazador de etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo.

5 Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimidaz, y poliacetatos también pueden formar una etiqueta o enlazador de etiqueta apropiado. Muchos otros pares de etiqueta/enlazador de etiqueta también son útiles en sistemas de ensayo descritos en el presente documento, como sería evidente para un experto tras una revisión de esta divulgación.

10 Los engarces comunes tales como péptidos, poliéteres, y similares también pueden servir como etiquetas, e incluyen secuencias de polipéptidos, tales como secuencias poli-gly de entre aproximadamente 5 a 200 aminoácidos. Estos engarces flexible, son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los engarces de poli(etilenglicol) están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama. Estos engarces tienen opcionalmente enlaces amida, enlaces sulfhidrilo, o enlaces heterofuncionales.

15 Los enlazadores de etiqueta se fijan a sustratos sólidos usando cualquiera de una variedad de procedimientos disponibles actualmente. Los sustratos sólidos se derivan o funcionalizan comúnmente exponiendo la totalidad o una porción del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que reacciona con una porción del enlazador de etiqueta. Por ejemplo, los grupos que son adecuadas para unirse a una porción de cadena mayor incluirían aminas, grupos hidroxilo, tiol y carboxilo. Se pueden usar aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una variedad de superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de estos ensayos de pipolímeros en fase sólida está bien descrita en la literatura. Véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida de; por ejemplo, péptidos); Geysen *et al.*, *J. Immun. Meth.* 102:259-274 (1987) (que describe la síntesis de los componentes de fase sólida sobre pins); Frank y Doring, *Tetrahedron* 44:60316040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias de péptidos sobre discos de celulosa); Fodor *et al. Science*, 251:767-777 (1991); Sheldon *et al, Clinical Chemistry* 39(4):718-719 (1993); y Kozal *et al, Nature Medicine* 2(7):753759 (1996) (que describen todos conjuntos de biopolímeros fijados a sustratos sólidos). Los enfoques no químicos para fijar enlazadores de etiqueta a sustratos incluyen otros procedimientos comunes, tales como calor, reticulación por radiación UV, y similares.

2. Ensayos basados en ordenadores

30 Otro ensayo para determinar compuestos que modulan la actividad de proteína del KCNB implica un diseño de fármaco asistido por ordenador, en el que se usa un sistema informático para generar una estructura tridimensional de una proteína del KCNB basada en la información estructural codificada por su secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de entrada interactúa directa y activamente con un algoritmo preestablecido en un programa informático para proporcionar modelos estructurales secundarios, terciarios y cuaternarios de la proteína. Los modelos de la estructura de proteína se examinan después para identificar regiones de la estructura que tienen la capacidad para unirse. Estas regiones se usan después para identificar compuestos que se unen a la proteína.

35 El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera introduciendo secuencias de aminoácidos de proteína de al menos 10 residuos de aminoácidos o las correspondientes secuencias de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido del KCNB en el sistema informático. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o la secuencia de aminoácidos del mismo, preferentemente es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 1, y versiones conservadoramente modificadas de la misma. La secuencia de aminoácidos representa la secuencia primaria o la subsecuencia de la proteína, que codifica la información estructural de la proteína. Se introducen al menos 10 residuos de la secuencia de aminoácidos (o una secuencia de nucleótidos que codifica 10 aminoácidos) en el sistema informático desde teclados de ordenador, soportes legibles por ordenador que incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, disquetes magnéticos, cintas, cartuchos y chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), informaciones difundidas por sitios de Internet, y por RAM. El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera después por la interacción de la secuencia de aminoácidos y del sistema informático, usando programas informáticos conocidos por los expertos en la técnica.

45 La secuencia de aminoácidos representa una estructura primaria que codifica la información necesaria para formar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína de interés. El programa informático se fija en determinados parámetros codificados por la secuencia primaria para generar el modelo estructural. Estos parámetros se denominan "términos de energía", e incluyen principalmente potenciales electrostáticas, potenciales hidrófobo, superficies accesibles a disolvente, y el enlace de hidrógeno. Los términos de energía secundarios incluyen potenciales de van der Waals. Las moléculas biológicas forman las estructuras que minimizan los términos de energía de forma acumulativa. Por lo tanto, el programa de ordenador está usando estos términos codificados por la estructura primaria o secuencia de aminoácidos para crear un modelo estructural secundario.

55 La estructura terciaria de la proteína codificada por la estructura secundaria se forma después en base a los términos de energía de la estructura secundaria. En este momento, el usuario puede introducir variables adicionales, tales como si la proteína está unida a membrana o es soluble, su ubicación en el cuerpo y su ubicación celular, por ejemplo, citoplásmica, de superficie, o nuclear. Estas variables junto con los términos de energía de la estructura secundaria se usan para formar el modelo de la estructura terciaria. Para modelar la estructura terciaria, el programa de ordenador

compara caras hidrófobas de la estructura secundaria con similares, y caras hidrófilas de estructura secundaria con similares.

Una vez se ha generado la estructura, se identifican regiones de unión a modulador potenciales por el sistema informático. Las estructuras tridimensionales para moduladores potenciales se generan introduciendo secuencias de aminoácidos o nucleótidos o fórmulas químicas de los compuestos, como se describe anteriormente. La estructura tridimensional del modulador potencial se compara después con la de la proteína del KCNB para identificar compuestos que se unen a la proteína. La afinidad de unión entre la proteína y el compuesto se determina usando términos de energía para determinar qué compuestos tienen una mayor probabilidad de unirse a la proteína.

Los sistemas informáticos también se usan para el cribado de mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecies de genes del *KCNB*. Estas mutaciones se pueden asociar con los estados de enfermedad o rasgos genéticos. Como se describe anteriormente, también se puede usar GeneChip™ y tecnología relacionada para el cribado de mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecies. Una vez se identifican las variantes, se pueden usar ensayos diagnósticos para identificar a los pacientes que tienen estos genes mutados. La identificación de los genes del *KCNB* mutados implica recibir la entrada de una primera secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 1, respectivamente, y versiones conservadoramente modificadas de la misma. La secuencia se introduce en el sistema informático, tal como se describe anteriormente. La primera secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos se compara después con una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que tiene una identidad sustancial a la primera secuencia. La segunda secuencia se introduce en el sistema informático del modo descrito anteriormente. Una vez que se comparan la primera y segunda secuencias, se identifican las diferencias de nucleótidos o aminoácidos entre las secuencias. Estas secuencias pueden representar diferencias alélicas en diversos genes del *KCNB*, y mutaciones asociadas con estados de enfermedad y rasgos genéticos.

VIII. Modulación de actividad/expresión de nKCN para tratar enfermedades o afecciones

En varias realizaciones de esta invención, un compuesto, por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, u otra molécula se administra a un paciente, *in vivo* o *ex vivo* para efectuar un cambio en la actividad o expresión del KCNB en el paciente. El cambio deseado puede ser un incremento o bien disminución en la actividad o expresión del KCNB. Por ejemplo, en una paciente con cáncer de mama con un tumor que muestra un incremento en los niveles del KCNB en relación con el tejido de mama normal, puede ser deseable disminuir la actividad o expresión del KCNB. En otros pacientes con enfermedades asociadas con una disminución en la actividad o expresión del KCNB, puede ser deseable incrementar la actividad o expresión de KCNB.

Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de enfermedades que están asociadas con un incremento o disminución de la actividad del KCNB. En determinadas realizaciones, se puede usar el KCNB en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades o afecciones. Por ejemplo, la actividad de KCNB que se expresa en un tipo celular particular se puede usar para modular la función celular (por ejemplo, la capacidad de respuesta a señales extracelulares), modulando específicamente de este modo la función de las células de ese tipo en un paciente. Además, las mutaciones en los KCNB específicos celulares podrían producir una enfermedad, afección o síntoma asociado a la ausencia de la función del tipo celular particular. Éstos incluyen cáncer, incluyendo cáncer de mama, pulmón, colon y próstata, trastornos asociados con el cerebro, tales como epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, esclerosis múltiple, migraña, y trastorno psiquiátrico incluyendo depresión, esquizofrenia, trastorno bipolar, así como otros (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12ª edición, Wilson, *et al.*, eds., McGraw-Hill, Inc.). Otras enfermedades incluyen enfermedades relacionadas con el corazón, tales como arritmias, fallo cardíaco, y diversas enfermedades vasculares (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12ª edición, Wilson, *et al.*, ed., McGraw-Hill, Inc.) y enfermedades relacionadas con el páncreas, tales como pancreatitis, diabetes, otras anomalías de secreción hormonal en el páncreas, por ejemplo, secreción de glucagón, somatostatina (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 12ª edición, Wilson, *et al.*, eds., McGraw-Hill, Inc). En consecuencia, la modulación de KCNB (por ejemplo, administrando moduladores del KCNB) se puede usar para tratar o prevenir cualquiera de las afecciones o enfermedades.

Los compuestos que se pueden administrar a un paciente incluyen ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos del KCNB de longitud completa, por ejemplo, como se muestra como la SEQ ID NO: 1, o cualquier derivado, fragmento o variante de la misma, unida de manera operable a un promotor. Los ácidos nucleicos adecuados también incluyen secuencias inhibitorias tales como secuencias antisentido o de ribozimas, que se pueden administrar, por ejemplo, en un vector de expresión unido de manera operable a un promotor, o que se pueden suministrar directamente. Además, se puede usar cualquier ácido nucleico que codifica un polipéptido que modula la expresión de KCNB.

En general, se pueden administrar ácidos nucleicos a las células usando cualquiera de un gran número de vectores o procedimientos, por ejemplo, vectores retrovíricos, adenovíricos o víricos adenoasociados, formulaciones liposomales, inyección de ADN desnudo, administración facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por péptidos), complejos lípidos catiónicos, y administración mediada por partículas ("pistola génica") o mediada por presión.

Las proteínas también se pueden administrar a un paciente para modular la actividad del KCNB. En realizaciones preferidas, se administrará un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une específicamente al KCNB. Además, se puede usar cualquier polipéptido que interactúa con y/o modula la actividad del KCNB, por ejemplo, un polipéptido que

se identifica usando los ensayos descritos en la actualidad. Además, se pueden usar polipéptidos que afectan a la expresión del KCNB.

Además, se puede usar cualquier compuesto que se encuentra o que está diseñado para que interactúe con y/o module la actividad del KCNB. Por ejemplo, se puede usar cualquier compuesto que se encuentra, usando los procedimientos descritos en el presente documento, que se une a o modula la actividad del KCNB.

Se puede usar cualquiera de las moléculas descritas anteriormente para incrementar o disminuir la expresión o actividad del KCNB, o de otro modo para afectar a las propiedades y/o el comportamiento de polipéptidos o polinucleótidos del KCNB, por ejemplo, estabilidad, localización intracelular, interacciones con otros restos intracelulares o extracelulares, etc.

10 A. Administración y composiciones farmacéuticas

La administración de cualquiera de las presentes moléculas se puede lograr por cualquiera de las rutas usadas normalmente para introducir o poner un compuesto modulador en contacto último con el tejido que se va a tratar. Los moduladores se administran de cualquier manera adecuada, opcionalmente con vehículos farmacéuticamente aceptables. Los procedimientos adecuados de administración de estos moduladores están disponibles y son muy conocidos por los expertos en la técnica, y, aunque se puede usar más de una vía para administrar una composición particular, a menudo una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra vía.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el procedimiento usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., (1985)).

Los moduladores del KCNB, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden preparar como formulaciones en aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para administrarse por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden poner en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, nasal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intravesicular o intratecal. Las formulaciones de compuestos se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o múltiples, tales como ampollas y viales. Las soluciones y suspensiones se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente. Los moduladores también se puede administrar como parte de un fármaco o alimento preparado.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en los sujetos con el tiempo. La dosis se determinará por la eficacia de los moduladores particulares empleada y la afección del sujeto, así como el peso corporal o el área superficial de la región que se va a tratar. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular.

Para determinar la cantidad efectiva de la modulación que se va a administrar, el médico puede evaluar los niveles plasmáticos circulantes del modulador, toxicidades del modulador y la producción de anticuerpos anti-modulador. En general, la dosis equivalente de un modulador es de desde aproximadamente 1 ng/kg hasta 10 mg/kg en un sujeto típico.

Para la administración, se pueden administrar moduladores de la presente invención en una tasa determinada por la DL-50 del modulador y los efectos secundarios del compuesto a determinadas concentraciones, como se aplica a la masa y la salud general del sujeto. La administración se puede lograr por medio de dosis individuales o divididas.

IX. Kits

Los reactivos que se hibridan específicamente a ácidos nucleicos del KCNB, tales como cebadores y sondas del KCNB y reactivos específicos del KCNB que se unen específicamente a o modulan la actividad de una proteína del KCNB, por ejemplo, anticuerpos KCNB u otros compuestos, se usan para tratar enfermedades o afecciones asociadas con el KCNB.

Los ensayos de ácidos nucleicos para detectar la presencia de ADN y ARN para un polinucleótido del KCNB en una muestra incluyen numerosas técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como análisis de tipo Southern, análisis de tipo Northern, transferencia en mancha, protección de ARNasa, análisis SI, técnicas de amplificación tales como PCR y LCR, e hibridación *in situ*. En la hibridación *in situ*, por ejemplo, el ácido nucleico diana se libera de sus entornos celulares de tal forma que esté disponible para hibridación dentro de la célula preservando la morfología

celular para interpretación y análisis posterior. Los siguientes artículos proporcionan una visión general de la técnica de hibridación *in situ*: Singer *et al*, *Biotechniques* 4:230- 250 (1986); Haase *et al.*, *Methods in Virology*, vol. VII, p. 189-226 (1984); y *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (Hames *et al*, eds. 1987). Además, se puede detectar una proteína del KCNB usando las diversas técnicas de inmunoensayo descritas anteriormente. La muestra de prueba se compara normalmente tanto con un control positivo (por ejemplo, una muestra que expresa una proteína del KCNB recombinante) como con un control negativo.

La presente invención también proporciona kits para el cribado de moduladores de proteínas o ácidos nucleicos del KCNB. Estos kits se pueden preparar a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, estos kits pueden comprender una cualquiera o más de los materiales siguientes: ácidos nucleicos o proteínas del KCNB, tubos de reacción, e instrucciones para probar la actividad del KCNB. Opcionalmente, el kit contiene una proteína del KCNB biológicamente activa. Se puede preparar una amplia variedad de kits y componentes de acuerdo con la presente invención, dependiendo del usuario del kit destinado y las necesidades particulares del usuario.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Amplificación del KCNB en cáncer

El siguiente ejemplo muestra que el KCNB se amplifica en cáncer.

Se identificó el KCNB como el epicentro de la amplificación en la región del cromosoma humano 8q24.3, que se amplifica en cáncer. Este ejemplo demuestra la determinación del número de copias de ADN en el amplicón 8q24.3 (figura 2).

Se determinó el número de copias de ADN para cada uno de los 10 marcadores en muestras de ADN genómico preparadas a partir de tanto tumores primarios como líneas celulares tumorales para definir los límites del amplicón. Se usaron los siguientes marcadores: Wi-11623, STS humano; FAK, cinasa de adhesión focal (N.º de acceso L13616); 34D10-5', secuencia BAC lateral T7 del clon 34D10 de colecciones B&C de BAC humano CITB, publicación IV, 381K12-T7, T7 secuencia BAC lateral T7 del clon 381K12 de colecciones B&C de BAC humano CITB, publicación IV, 431C18T7, secuencia terminal BAC lateral T7 de clon genómico AC007869; d8sl741, STS humano; 564L17-5', secuencia BAC terminal T7 final de clon genómico AC007871; 4P6-3', secuencia BAC terminal SP6 de clon genómico 4p6 de colecciones B&C de BAC humano CITB, publicación IV, WI-18632, STS humano; TI-5', extremo 5' del clon de ADNc humano AK026394.1. CHTN159 y 87-634 son tumores de mama primarios y ZR7530 y MDAMB436 son líneas celulares de tumores de mama.

Se diseñaron sondas para cada marcador usando PrimerExpress 1.0 (Applied Biosystems) y se sintetizaron por Operon Technologies. Una sonda diana, una sonda de referencia que representa una región de copia individual normal en el genoma, y ADN genómico de tumor (1 ng) se sometieron al detector de secuencia Taqman 7700 de Applied Biosystems siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados se muestran en la figura 2. Estos datos definen los límites de amplificación de la región 8q24.3.

El análisis adicional de aproximadamente 200 tumores de mama mostró que aproximadamente un 10-14 % se amplifican en esta región. Los tumores de mama primarios se proporcionaron por Linda Rodgers y Mike Wigler en el Cold Spring Harbor Laboratory, y por Jeff Marks en la Universidad de Duke.

Identificación del KCNB

El mapeado físico basado en PCR, *supra*, mostró que el clon BAC 431cl8 (número de acceso AC007869) de la librería de BAC humano CITB publicación IV (Research Genetics) estaba en el epicentro. Posteriormente, se usó una secuencia genómica humana de aproximadamente 200 kB de longitud que está contenida en el clon BAC, para buscar en las bases de datos Genbank y SWISSPROT por medio de BLASTX.

Se encontró que las regiones de la secuencia mostraban homología de secuencia con una proteína del canal de K⁺ de *Caenorhabditis elegans* previo TWK-8 (número de acceso P34410.) TWK-8 es homóloga a un canal de potasio humano clonado, KCNK3 (número de acceso AAC51777/PID g2465542), que está localizado en el cromosoma humano 2p23. En base a la homología con KCNK3, se determinó un marco de lectura abierta establecido como SEQ ID NO: 2, a partir de la secuencia genómica. El marco de lectura abierta deducido del KCNB comparte una identidad de aminoácidos de un 62 % con el KCNK3. La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína del KCNB codificada por ADN genómico se muestra como la SEQ ID NO: 1.

Amplificación de PCR de ADNc del KCNB a partir de la línea celular de tumor de mama

Después se realizó una PCR de alta fidelidad que emplea cebadores con las secuencias de nucleótidos establecidas en las SEQ ID NO: 3 y 4 para obtener un ADNc que codifica el KCNB a partir de una preparación de ADNc de una línea celular de cáncer de mama ZR7530. Se aisló el ADNc como sigue.

(1) Preparación de ADNc de primera hebra;

Se incubó un microgramo de ARN total preparado a partir de una línea celular de cáncer de mama humano, ZR7530, con 1 μM de oligo (dT)₁₈ y 200 unidades de transcriptasa inversa MMLV (CIONTECH, Palo Alto, CA) en un volumen total de 20 μl , que contenía los siguientes componentes: Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM y dNTP 50 μM . Después de una incubación de 60 minutos a 42 °C, se mantuvo la reacción a 95 °C durante 5 min para desactivar la transcriptasa inversa. Posteriormente, se añadieron ochenta microlitros de agua libre de nucleasa para dar la preparación de ADNc de 1^a hebra.

(2) Amplificación de PCR de ADNc de KCN:

Se mezclaron cuatro microlitros de la preparación de ADNc de primera hebra de ZR7530 en un volumen total de 50 μl con los siguientes ingredientes: dNTP 20 μM , 0,5 μM de cada uno de los oligonucleótidos R5 y R10 (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente), Tris-HCl 10 mM, pH 8,85, (NH₄)₂SO₄ 5 mM, KCl 25 mM, MgSO₄ 2 mM y 3 unidades de ADN polimerasa PWO (Roche, Indianápolis, IN). Después se recubrió la reacción con aceite mineral (30 μl) y se amplificó usando un termociclador de PCR (MJ Research, Watertown, MA) durante 40 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: 95 °C durante 20 segundos, 64 °C durante 40 segundos, y 72 °C durante 1 min. Posteriormente, se purificó la mezcla usando columnas de purificación de PCR High-Pure (Roche, Indianápolis, IN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después del análisis usando electroforesis en gel de agarosa a un 2 %, se detectó un producto de aproximadamente 1,2 kb de longitud, representando el marco de lectura abierta de longitud completa del KCN.

La secuencia de ADNc fue idéntica a la del marco de lectura abierta de la secuencia genómica (SEQ ID NO: 2), excepto para una citosina en la posición 653, que reemplaza la T presente en la secuencia genómica. La sustitución de C por T en esa posición no altera el aminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos. Se determinó la secuencia de nucleótidos de las regiones no traducidas 5' y 3' (UTR) del ARN mensajero del KCN en la línea celular de tumor de mama ZR7530 usando el procedimiento RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc). La secuencia de ADNc, que incluye la las UTR 5' y 3' se establece en la SEQ ID NO: 5.

La secuencia que incluye las UTR 5' y 3' es aproximadamente de 2,3 kb de longitud. El codón de inicio de metionina y el codón de parada están indicados en negrita. El nucleótido G en la posición 323 desde el extremo 5' de la secuencia marca el final del exón 1 y el nucleótido G en la posición 324 representa la primera base del exón 2. De la comparación del ADNc del KCN y de la correspondiente secuencia genómica (n.º de acceso: AC007869), se deduce que un intrón de aproximadamente 83,6 kb está flanqueado por el exón 1 y 2. La supuesta secuencia señal de poliadenilación está subrayada.

Ejemplo 2. Expresión del KCN

Los siguientes ejemplos demuestran que el KCN se expresa normalmente en niveles elevados en el cerebro y se sobreexpresa en cáncer.

KCN se sobreexpresa en una línea celular de cáncer de mama con relación a células de mama normales

También se determinó el nivel de expresión de ARNm del KCN en tejido de cáncer de mama con relación al tejido de mama normal (tabla 1). Se realizó un PCR cuantitativa tal como se indica a continuación.

Se aisló el ARN Total de las líneas celulares de tumor y los tejidos de tumor primario congelados usando el reactivo de Trizol (Gibco/Life technology, Gaithersburg, MD) y se almacenaron en RNasecure (Ambion, Austin, TX) a una concentración de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se trató el ARN total con DNaseI (Gibco) para eliminar el ADN genómico y después se sometió a reacción de transcriptasa inversa, acoplada con amplificación de PCR en un formato de un tubo de acuerdo con el fabricante (Perkin Elmer/ABI). Se midió el número de ciclos de PCR necesario para cruzar un límite prefijado, también conocido como valor Ct, en preparaciones de ARN de tumor de muestra y una serie de preparaciones de ARN de glándula mamaria normal a diversas concentraciones para determinar tanto la sonda diana como la sonda de β -actina usando una máquina de Taqman PE/ABI7700. Después, se calculó la abundancia relativa de la secuencia diana para β -actina en cada muestra por análisis estadísticos de los valores Ct de las muestras desconocidas y la curva estándar generada a partir de la preparaciones de ARN de glándula mamaria de diversas concentraciones.

Se usaron tres oligonucleótidos para cada PCR cuantitativa: un cebador directo, un cebador inverso y una sonda. En la realización de los análisis para obtener los resultados mostrados en la tabla 1, se usaron conjuntos diferentes de oligonucleótidos, que se establecen en las SEQ ID NO 6-8 y 9-11. Se obtuvieron resultados comparables con cada conjunto. Los resultados mostrados en la tabla 1 muestran que KCN se sobreexpresa en células de cáncer de mama con relación al valor normal.

De los 38 tumores de mama primarios examinados, 19 expresan ARNm del KCN en un nivel de 5 veces o mayor que el tejido de mama normal (19/38 = 50 % de frecuencia de sobreexpresión) (Tabla 1b). Todos los 11 tumores que mostraban incrementos del número de copias del gen del KCN también mostraron sobreexpresión del ARNm. (Los tumores que presentaban un número de copias del gen KCN menor de 2,5 están marcados con "-" y los tumores con un número de copias de mayor de 2,5 están marcados con "+". ND representa "no determinado").

De los 12 tumores que no muestran amplificación del KCNB, 7 sobreexpresaron el KCNB, a menudo un rasgo característico de un oncogen.

TABLA 1a

Niveles de ARNm del KCNB relativos en líneas celulares del cáncer de mama

Línea celular de tumor de mama	Nivel de ARNm relativo
¹ ZR7530	3
BT20	0,27
BT549	0,81
MCF7	0,32
2 6NC	0,56
² HBL-100	1
² Células epiteliales de glándula mamaria normales	1

¹De las 7 líneas celulares en la tabla, ZR7530 es la única amplificada en 8q24.3.

²Se normalizaron niveles relativos de ARNm del KCNB para la línea celular HBL-100 o bien para las células epiteliales de glándula mamaria normales. Se usó ARNm de β -actina como referencia interna en todas las muestras probadas.

ND = no determinado

Tabla 1b

Expresión de ARNm en tumores de mama primarios

Tumoral de mama	Número de copias de gen	Nivel de expresión de ARNm relativo
88-523	-	7,1
96-201	-	13
96-342	-	5,8
96-102	-	8,9
96-32	-	0,4
96-16	-	0,7
95-523	-	1,0
95-377	-	3,5
95-326	-	10
94-847	-	2,9
94-797	-	16

ES 2 378 417 T3

(continuación)

88-468	-	27
CHTN159	+	13,8
95-480	+	9,2
95-347	+	11
91-82	+	550
90-445	+	32,3
90-794	+	343,3
90-197	+	66
88-499	+	108
87-634	+	69
96-308	+	25
88-682	+	3,5
96-442	ND	2,2
96-349	ND	4,7
96-317	ND	11
96-273	ND	0,4
96-190	ND	5,2
96-160	ND	1,2
96-140	ND	3,4
96-109	ND	0,35
96-84	ND	1,0
95-504	ND	1,9
95-487	ND	1,5
95-427	ND	1,4
95-283	ND	1,7
95-237	ND	1,6
95-65	ND	0,14

KCNB se expresa en otros tumores del epitelio.

También se examinó la expresión de KCNB en tipos de tumores distintos del tumor de mama (tabla 2). Los resultados muestran que el KCNB también se sobreexpresa en tumores de pulmón y de próstata. El número de cada tipo de tumor examinado está indicado. Se encontró que cuatro tumores de próstata metastásicos sobreexpresan el KCNB en 5

ES 2 378 417 T3

(continuación)

veces o más de las 26 muestras examinadas. De 20 tumores de pulmón examinados, un 35 % mostró expresión mayor de cinco veces.

Tabla 2

Tipo de tumor	Amplificación	Frecuencia de sobreexpresión de ARNm
Tumores de mama n = 38	<2 veces: 19 5-10 veces: 7 10-20 veces: 6 >20 veces: 6	50 % >5 veces
Tumores de pulmón n = 20	<2 veces: 8 2-3 veces: 5 5-10 veces: 3 10-20 veces: 1 >40 veces: 3	35 % >5 veces
Tumores de colon n = 10	<2 veces: 9 >40 veces: 1	10 % >5 veces
Tumores de próstata n = 26	<2 veces: 20 2-5 veces: 2 5-10 veces: 2 >10 veces: 2	15 % >5 veces

TASK1 humano, un homólogo de secuencia cercano del KCNB, no se sobreexpresa en cáncer.

- 5 TASK1 (también conocido como KCNK3, Duprat *et al.* *EMBOJ.* (1997) 16, 5464- 5471) comparte una identidad de secuencia de proteína de un 62 % con el KCNB. Se examinó un subconjunto de tumores de mama primarios para determinar si TASK se sobreexpresa en cáncer. Se determinó el nivel de ARNm de TASK1 usando metodología similar a la usada para la determinación de los niveles de ARNm del KCNB. Los cebadores y la sonda de TASK usados para el análisis de Taqman de la expresión de ARNm de TASK1 y del número de copias fueron: cebador de PCR directa, 5' GCAGTGTCTGGAAGGCTGAAG 3' (SEQ ID NO:12); cebador de PCR inversa, 5' CGCACTG GAGGTTCAAGCTAA 3' (SEQ ID NO:13); y, la sonda de detección [6- FAM]-CCTCCAGCCACATTCT CATAGCAGGTAGG-[TAMRA] (SEQ ID NO: 14).

15 TASK1 no se sobreexpresó en cáncer ni se identificaron tumores de mama que mostraran un incremento en el número de copias del gen TASK1 (tabla 3). Por tanto, el número de copias del gen se incrementa y la sobreexpresión asociada con cáncer es única para KCNB de entre los canales de K de tipo TASK.

Tabla 3

Tumoral de mama	N.º de copias del gen del KCNB	Nivel de ARNm relativo de KCNB	Nivel de ARNm relativo de TASK1
95-523		1	0,07
95-377	-	3,5	0,9
95-326	-	10,0	0,03

ES 2 378 417 T3

(continuación)

94-847	-	2,9	0,3
94-797	-	16	0,7
95-347	+	11	0,03
91-82	+	550	1,8
87-634	+	69	0,7
88-682	+	3,5	0,07

KCNB se expresa altamente en tejido cerebral humano normal.

5 Se adquirieron quince ARN totales de tejidos humanos normales de Biochain Institute y se analizaron para determinar la expresión del KCNB usando RT-Taqman (tabla 4). La mayoría de los tejidos expresan el KCNB a un nivel comparable, salvo para el cerebro que expresa niveles relativamente altos del KCNB. Se determinaron los niveles con relación al nivel de β -actina en el tejido. Los resultados se expresan en una unidad arbitraria.

Tabla 4

Tejido normal	Nivel de ARNm del KCNB relativo
cerebro	1381
páncreas	7,6
corazón	8,6
colon	1,5
bazo	1,1
hígado	1,2
placenta	0,91
mama	2,1
riñón	3,9
estómago	2,6
ovario	1,4
pulmón	2,7
próstata	0,85
vejiga	2,2
PBL	0,96

Ejemplo 3. Expresión del KCNB funcional en células COS-7.

El siguiente ejemplo muestra los efectos de la expresión de KCNB sobre corrientes de la célula completa.

10 Se usó un análisis de transfección para examinar la actividad del KCNB en células COS-7 usando un plásmido de expresión que codifica el KCNB. Los cultivos de Control recibieron el mismo vector de expresión que carece de la

5 inserción del KCNB. Se registraron las corrientes de célula completa se registraron en soluciones de pipeta y que contenían KCl 140 mM. El potencial de retención fue de 0 mV, y las etapas de voltaje fueron de -150 hasta +116 mV en incrementos de 14 mV. Los resultados se muestran en la figura 3. Los datos demuestran que las corrientes se generan en las células que expresan el KCNB y, además, que el KCNB muestra una actividad característica de una proteína de canal de potasio.

Ejemplo 4. KCNB protege a las células de la muerte celular inducida por TNF- α

10 Usando un procedimiento de transferencia génica basado en virus, se establecieron transfectantes de línea celular MEF (fibroblastos embrionarios de ratón), A9 que expresaba KCNB, BCL2, o bien ambos KCNB y BCL2. Después, se probó la sensibilidad de estas líneas celulares para TNF- α . Se cultivaron los transfectantes en DMEM/F-12 (Gibco)+ 10 % FBS (Gibco) en presencia de 0, 2,5 ó 5 ng/ml de TNF- α de ratón (Calbiochem). Cuarenta y ocho horas después de la adición de TNF- α , se recogieron todas las células, tanto vivas como muertas, y se tiñeron con azul de tripano. Los resultados (figura 4) mostraron que un mayor número de células que expresaban KCNB o tanto KCNB como BCL2 sobrevivieron después del tratamiento con 2,5 ó 5 ng/ml de TNF- α en comparación con los transfectantes que se generaron usando el control de vector o BCL2 solo. Por tanto, se observó que la expresión del KCNB protege a las
15 células de la matanza inducida por TNF- α .

Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia como si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para incorporarse por referencia.

20 Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente patente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención, que ciertos cambios y modificaciones se pueden realizar a éste sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

Secuencia de proteína del KCNB basada en una secuencia de ADN genómico humano:

MKRQNVRTLIVCTFTYLLVGAAVFDALSDHEMREBEKLEKAEIRIKGKYNIS
SEYRQLELVILQSEPHRAGVQWKFAGSFYFAITVITITIGYGHAAPGTDAGKAFK
MFYAVLGIPLTLVMFQSLGERMNTFVRYLLKRIKCCGMRNTDVS MENMVTVG
FFSCMGTLICIGAAAFSQCEEWSFFHAYYYCFITLTTIGFGDYVALQTKGALQKKP
LYVAFSFMYL VGLTVIGAFNLVVL RFLTMNSEDERRDAEERASLAGNRNSMVI
HIPEEPRPSRPRYKADVPDLQSVCSCTCYRSQDYGGRSVAPQNSFSAKLAPHYFH
SISYKIEEISPSTLKNLSPSPISSISPGLHSFTDHOQLMKRRKSV

5 SEQ ID NO: 2

Marco de lectura abierta del KCNB predicho a partir de ADN genómico:

5' ATGAAGAGGCAGAACGTGCGGACTCTGTCCCTCATCGTCTGCACCTTCACC
TACCTGCTGGTGGGCGCCGCCGTGTTTCGACGCCCTCGAGTCGGACCACGAGA
TGCGCGAGGAGGAGAACTCAAAGCCGAGGAGATCCGGATCAAGGGGAAGT
ACAACATCAGCAGCGAGGACTACCGGCAGCTGGAGCTGGTGATCCTGCAGTC
GGAACCGCACCGCGCCGGCGTCCAGTGGAAATTCGCCGGCTCCTTCTACTTTG
CGATCACGGTCATCACCAACCATAGGTTATGGGCACGCTGCACCTGGCACCGA
TGCGGGCAAGGCCTTCTGCATGTTCTACGCCGTGCTGGGCATCCCGCTGACAC
TGGTCATGTTCCAGAGCCTGGGCGAGCGCATGAACACCTTCGTGCGCTACCTG
CTGAAGCGCATTAAAGAAGTGCTGTGGCATGCGCAACACTGACGTGTCTATGG
AGAACATGGTGACTGTGGGCTTCTTCTCCTGCATGGGGACGCTGTGCATCGGG
GCGGCCGCTTCTCCAGTGTGAGGAGTGGAGCTTCTTCCACGCCTACTACTA
CTGCTTCATCACGTTGACTACCATTGGGTTCGGGGACTACGTGGCCCTGCAGA
CCAAGGGTGCCCTGCAGAAGAAGCCGCTCTACGTGGCCTTTAGCTTTATGTAT
ATCCTGGTGGGGCTGACGGTCATCGGGGCCTTCTCAACCTGGTCGTCCTCAG
GTTCTTGACCATGAACAGTGAGGATGAGCGGCGGGATGCTGAAGAGAGGGCA
TCCCTCGCCGAAACCGCAACAGCATGGTCATTCACATCCCTGAGGAGCCGC
GGCCCAGCCGGCCCAGGTACAAGGCGGACGTCCCGGACCTGCAGTCTGTGTG
CTCCTGCACCTGCTACCGCTCGCAGGACTATGGCGGCCGCTCGGTGGCACCGC
AGAACTCCTTCAGCGCCAAGCTTGCCCCCACTACTTCCACTCCATCTCTTAC
AAGATCGAGGAGATCTCACCAAGCACATTAACAAAACAGCCTCTTCCCATCGC

**CTATTAGCTCCATCTCTCCTGGGTTACACAGCTTTACCGACCACCAGAGGCTG
ATGAAACGCCGGAAGTCCGTTTAG 3'**

SEQ ID NO: 3

Cebador de sentido para amplificación por PCR de ADNc del KCNB:

KCNB-R5: 5'-GCCATGAAGAGGCAGAACGTGCG

5 SEQ ID NO: 4

Cebador antisentido para amplificación por PCR de ADNc del KCNB:

KCNB-R10: 5'-CGGACTCCGGCGTTTCATCA

SEQ ID NO: 5

10 Secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa, incluyendo las UTR 5' y 3' de la línea celular de cáncer de mama ZR7530:

**5' TGCGGGACATGCCCCCGCGCCGGCTCCTTGCTGGCGGCCATGAAGAGGC
AGAACGTGCGGACTCTGTCCCTCATCGTCTGCACCTCACCTACCTGCTGGTG
GGCGCCGCCGTGTTTCGACGCCCTCGAGTCGGACCACGAGATGCGCGAGGAGG
AGAAACTCAAAGCCGAGGAGATCCGGATCAAGGGGAAGTACAACATCAGCA
GCGAGGACTACCGGCAGCTGGAGCTGGTGATCCTGCAGTCGGAACCGCACCG
CGCCGGCGTCCAGTGGAATTCGCCGGCTCCTTCTACTTTGCGATCACGGTCA
TCACCACCATAGGTTATGGGCACGCTGCACCTGGCACCGATGCGGGCAAGGC
CTTCTGCATGTTCTACGCCGTGCTGGGCATCCCGCTGACACTGGTCATGTTCC
AGAGCCTGGGCGAGCGCATGAACACCTTCGTGCGCTACCTGCTGAAGCGCAT
TAAGAAGTGCTGTGGCATGCGCAACACTGACGTGTCTATGGAGAACATGGTG
ACTGTGGGCTTCTTCTCCTGCATGGGGACGCTGTGCATCGGGGCGGCCGCTT
CTCCCAGTGTGAGGAGTGGAGCTTCTTCCACGCCTACTACTACTGCTTCATCA
CGTTGACTACCATTGGGTTTCGGGACTACGTGGCCCTGCAGACCAAGGGCGC
CCTGCAGAAGAAGCCGCTCTACGTGGCCTTTAGCTTTATGTATATCCTGGTGG
GGCTGACGGTCATCGGGGCTTCTCAACCTGGTCGTCCTCAGGTTCTTGACC
ATGAACAGTGAGGATGAGCGGCGGGATGCTGAAGAGAGGGCATCCCTCGCC
GGAAACCGCAACAGCATGGTCATTCACATCCCTGAGGAGCCGCGGCCAGCC
GGCCCAGGTACAAGGCGGACGTCCCGGACCTGCAGTCTGTGTGCTCCTGCAC
CTGCTACCGCTCGCAGGACTATGGCGGCCGCTCGGTGGCACCGCAGAACTCC
TTCAGCGCCAAGCTTGCCCCCACTACTTCCACTCCATCTCTTACAAGATCGA
GGAGATCTCACCAAGCACATTAATAAAACAGCCTCTTCCCATCGCCTATTAGCT**

CCATCTCTCCTGGGTTACACAGCTTTACCGACCACCAGAGGCTGATGAAACGC
CGGAAGTCCGTTTAGGTGTGGGGAGGGAAATGGGACAGAAAAGTCATTTGTC
ATAGTTGGTGTTAATTTCCATTGGTCCAACCTCGTCTTTTCTTATTTATTAT
TATTATTGTCATCATTATTACTTTCTCTCCTTCCTCCTTTCTTGGTCTCTTGGTC
TCATTTTCCCCCACCTTTCCAGCCAGACAGAGCAGGCCAAAGGGAAATACAG
GCCCATCCTCCTCTGAAACTCACATCTGAGCATGAAGCATGGATCTCCTCCTT
CCTTCCCAGCAGACTATGCCTTACATTTCTCACCCACCCACCCCATCATCTCT
GCAGTGGTTTTCCCGGGACAGATGTGAGACCAAGACCACGGAGACAGAGCTG
AGAGGATAACCCACCCAAAGCTGCACATCACGCTCAGCCTTCAATCGCCTAC
CCTTAGTGGTGTCTCTGACCTAACTCCTTTCTCTTTTCCTAAGGACTGAGTGAC
TGTGTGTGTGTTGTGTGTGTGCTTCTGTGTGCACGTGTGTGCGTGACAAAACGG
GAAGTATTAGGTATTCCGTTTTCTTTCCCATCACACATCATAGCCTGCTTTTGG
CTGCTTCAAACAAAACGGGAAGACAAAACCCACAAGGTTTTTGATTTATCG
TATTTTGCCAAATCAAGCATGTTTCATTAAGCAGTTCTTATCCCTGATGTGTCA
TGGCCATATTTTCTAAATGCTAGGTTCTAAATTATATTAATGTTTTTTAGGGGC
GGGTGGGCAAGACGACCCAAACCATCTTAGCTTGCCAGTTCAGACATTTTTTA
AAAAGCATGCACTTTGTAAACTGGTATGCGCTATCAACAAAAAAACTAGAA
ATGGAATAATCCAAAGCCAATAACATTAACTTATAAAAAGACATTTTTAATTT
GTCACCTCCAGTTCCAACAATTTACCATGCAACTGGAATTGTCAGGGGAAAC
GGGAAAATTGTTGGAACCCAGAGTATCTATTTCCCTCTTATTGATGATTTTG
TGCAGCACCTACCCTGCATAAATAAGAATTATAGTGTTGGAATGCTTGGGTGA
GAATGGGTATTAGTATGTGGCTGTGGTTCCTTTTCCCTCATGAAAATTGACAGG
GCATTCCTCATTAAAAATACATATCTATTTCAAGAAAAAAAAAAAAA 3'

SEQ ID NO: 6

Cebador de sentido para PCR cuantitativa para el KCNB:

KCNBQF1: 5'-CGGCGTCCAGTGGAATT

5 SEQ ID NO: 7

Cebador antisentido para PCR cuantitativa para el KCNB:

KCNBQR1: 5'-GCCATAACCTATGGTGGTGAT

SEQ ID NO: 8

Oligonucleótido de sonda del KCNB para PCR cuantitativa:

10 KCNB QP1: 5'-(6-FAM)-CCGGCTCCTTCTACTTTGCGATCACG-(TAMRA)

SEQ ID NO: 9

Cebador de sentido para PCR cuantitativa para el KCNB:

KCNB QF3: 5'-ACCTGCTGAAGCGCATTAAAGA

SEQ ID NO: 10

Cebador antisentido para PCR cuantitativa para el KCNB:

KCNB QR3: 5'-GTCACCATGTTCTCCATAGACACG

SEQ ID NO: 11

5 Oligonucleótido de sonda del KCNB para PCR cuantitativa:

KCNB QP3: 5'-(6-FAM)-CAGTGTGCGCATGCCACAGCA-(TAMRA)

SEQ ID NO: 12

Cebador de TASK1 directo para PCR cuantitativa:

5' GCAGTGTCTGGAAGGCTGAAG 3'

10 SEQ ID NO: 13

Cebador de TASK1 inverso para PCR cuantitativa:

5' CGCACTG GAGGTTCAAGCTAA 3'

SEQ ID NO: 14

Oligonucleótido de sonda del TASK1 para PCR cuantitativa:

15 5' [6-FAM]-CCTCCAGCCACATTCT CATAGCAGGTAGG-[TAMRA] 3'

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico del KCNB que tiene una identidad de secuencia de ácidos nucleicos mayor de un 90 % a lo largo de su longitud con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos establecida en la SEQ ID NO: 2, en el que un incremento de 1,5 veces o más del ácido nucleico del KCNB detectado en comparación con el valor normal indica la presencia de células cancerosas.
2. Un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico del KCNB que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos del ácido nucleico que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2 ó 5, en el que un incremento de 1,5 veces o más del ácido nucleico del KCNB detectado en comparación con el valor normal indica la presencia de células cancerosas.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico del KCNB que se detecta comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico del KCNB que se detecta comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la molécula de ácido nucleico se pone en contacto con una sonda que se hibrida selectivamente al ácido nucleico del KCNB bajo condiciones en las que la sonda se hibrida selectivamente a la molécula de ácido nucleico para formar un complejo de hibridación estable, y detectar el complejo de hibridación.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de puesta en contacto comprende además la etapa de amplificación del ácido nucleico del KCNB en una reacción de amplificación.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa.
8. Un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
detectar una sobreexpresión de un polipéptido del KCNB que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % a lo largo de su longitud con respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 en la muestra, en la que un incremento de 1,5 veces o más del polipéptido del KCNB detectado cuando se compara con el normal indica la presencia de células cancerosas.
9. Un procedimiento de detección de células cancerosas en una muestra biológica de mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
detectar una sobreexpresión de un polipéptido del KCNB que tiene al menos 50 péptidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 en la muestra, en la que un incremento de 1,5 veces o más del polipéptido del KCNB detectado cuando se compara con el normal indica la presencia de células cancerosas.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 ó 9, en el que el polipéptido del KCNB que se detecta comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, 9 ó 10, en el que el polipéptido del KCNB se detecta usando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que se marca el anticuerpo.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es una muestra biológica humana.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células cancerosas se seleccionan del grupo que consiste en células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon y células de cáncer de próstata.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que las células cancerosas son células de cáncer de mama.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que las células cancerosas son células de cáncer de pulmón.
17. El uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del KCNB que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de un 90 % a lo largo de su longitud con respecto a la secuencia de

aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 para detectar células cancerosas en una muestra biológica de mamífero.

- 5
18. El uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del KCNB que comprende al menos 50 péptidos contiguos de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 para detectar células cancerosas en una muestra biológica de mamífero.
 19. El uso de la reivindicación 17, en el que se marca el anticuerpo.
 20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, en el que la muestra es una muestra biológica humana.
 - 10 21. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que las células cancerosas se seleccionan del grupo que consiste en células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon y células de cáncer de próstata.
 22. El uso de la reivindicación 21, en el que las células cancerosas son células de cáncer de mama.
 23. El uso de la reivindicación 21, en el que las células cancerosas son células de cáncer de pulmón.

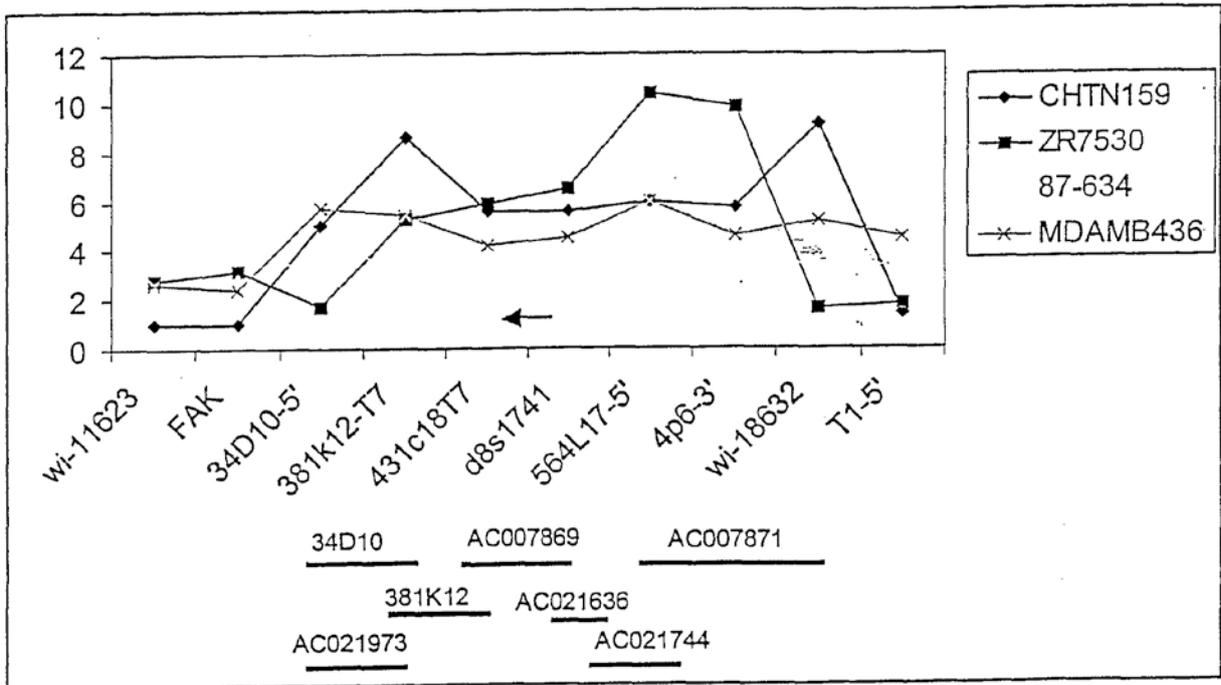


Figura 2

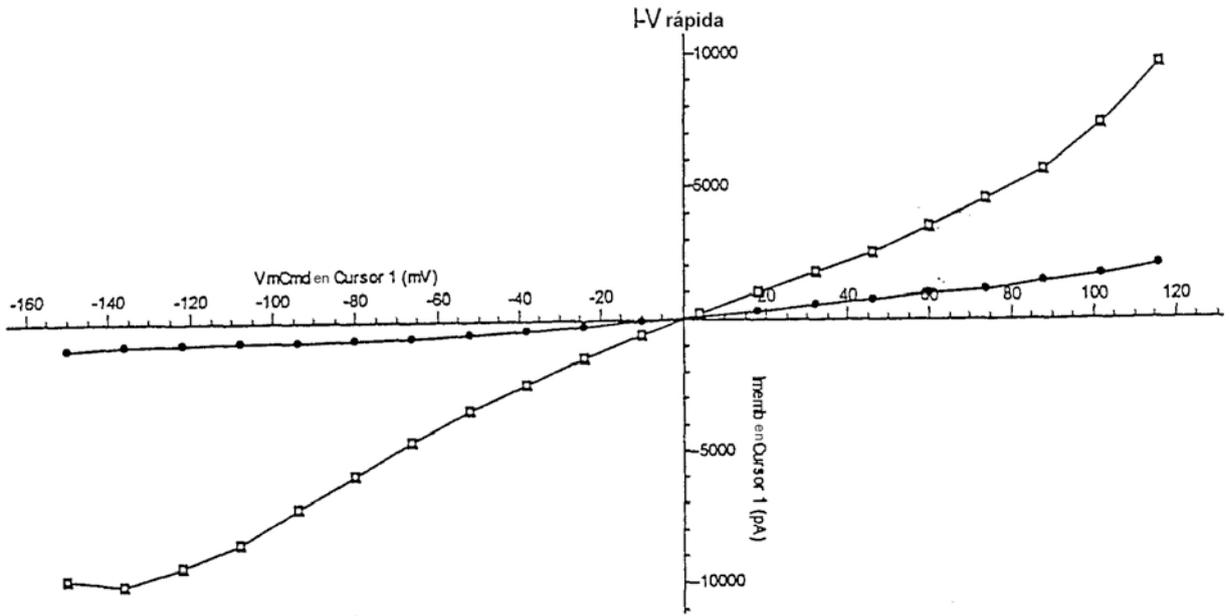


Figura 3

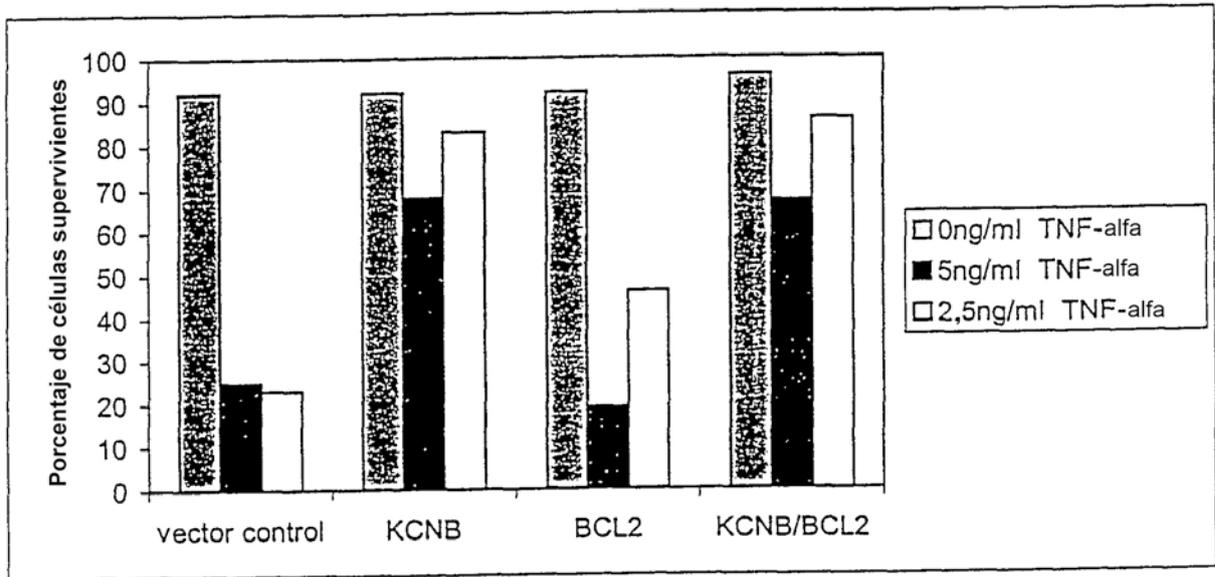


Figura 4