

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 233**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2007 E 07823033 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2216340**

54 Título: **Isoformas del receptor tipo 5 de somatostatina humana producidas por tratamiento alternativo y pares de oligonucleótidos para la detección de las mismas por PCR**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (100.0%)
AVDA. MEDINA AZAHARA 5
14071 CÓRDOBA, ES**

72 Inventor/es:

**DURÁN PRADO, MARIO;
MARTÍNEZ FUENTES, ANTONIO JESÚS;
VAZQUEZ MARTÍNEZ, RAFAEL;
GARCÍA NAVARRO, SOCORRO;
MALAGÓN POYATO, MARÍA DEL MAR;
CASTAÑO FUENTES, JUSTO PASTOR y
GRACIA NAVARRO, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 401 233 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

Isoformas del receptor tipo 5 de somatostatina humana producidas por tratamiento alternativo y pares de oligonucleótidos para la detección de las mismas por PCR

PROPÓSITO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a dos nuevas isoformas de receptor tipo 5 de somatostatina humana, así como a su detección en muestras biológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La somatostatina de neuropéptido hipotalámico (SRIF) actúa en una multitud de órganos y tejidos diana por todo el organismo, ejerciendo fundamentalmente un efecto inhibitor, tanto sobre la secreción como la regulación de otras hormonas u otros procesos biológicos diversos (Moller *et al.*, 2003).

- 15 Esta acción, que generalmente es inhibitoria, pero en algunas ocasiones es estimuladora, (Castaño *et al.*, 1996), es llevada a cabo por una familia de receptores de tipo de siete dominios de transmembrana (7TMD) acoplados a proteínas-G (GPCR), denominados receptores de somatostatina o receptores ssts. Todos los ssts comparten una estructura común que consiste en un extremo amino-terminal extracelular conectado a siete dominios hidrofóbicos insertados en la membrana, que a su vez están unidos a través de ocho dominios hidrofílicos, y que terminan en un extremo carboxi-terminal intracelular, que es importante para la modulación de segundas rutas de mensajero.

- 20 Hasta la actualidad, existen cinco subtipos diferentes de ssts en mamíferos, del sst1 al sst5, y también existen dos isoformas del subtipo 2 (sst2A y sst2B) en ratones y ratas producidas a través del ajuste alternativo del ARN mensajero precursor que codifica dos proteínas diferentes en la región carboxi-terminal intracelular que presentan propiedades diferentes con respecto a la modulación de rutas de señalización intracelular. Sin embargo, en peces se han descubierto otras isoformas para cada subtipo de receptor debido al fenómeno de duplicación génica en lugar de otro fenómeno de ajuste diferencial del ARN mensajero que codifica cada una de las isoformas.

- 25 Las GPCRs, que incluyen los ssts, están implicadas en numerosos procesos celulares de relevancia médica, medidos a través de rutas de transducción de señal a través de proteínas G. Más específicamente, uno de estos subtipos ssts, el sst5 humano (WO 0177172, WO 0155319, WO 0136446, EP 1369698, WO 03104816), ha sido ligado a una multitud de patologías diversas en mamíferos, tales como enfermedades hematológicas y cardiovasculares, trastornos del sistema nervioso central y periférico, cáncer, procesos inflamatorios, enfermedades hepáticas, enfermedades gastrointestinales y genito-urinarias (WO 03104816).

- 30 El receptor de somatostatina tipo 5 humano, sst5, está registrado en bases de datos públicas con números de acceso, que incluyen, aunque sin limitación, GI39756975, GI21954086, GI13937340, que contienen secuencias que pertenecen a la copia de ADN de la secuencia codificadora, así como secuencias genómicas que contienen la estructura génica completa de dicho receptor, y además de la secuencia codificadora, la región promotora contienen secuencias intrónicas y regiones 5' y 3' no codificadas. Hasta el momento, no se ha descrito un procesado alternativo de ARN mensajero de sst5 humano que proporcione ninguna isoforma alternativa diferente a las registradas en las bases de datos, y descritas a fondo en la bibliografía.

- 35 El documento WO 03/072824 describe una serie de marcadores útiles para predecir afecciones patológicas en el fallo cardíaco. Los marcadores presentados incluyen un receptor para somatostatina (véase la SEC ID N°: 7 y la SEC ID N°: 22).

- 40 Recientemente se ha clonado la secuencia correspondiente al ARN mensajero que contiene la secuencia codificadora del receptor sst5 porcino, así como las regiones no codificadas 5' (GI58223147) y 3'. Durante el proceso de clonación del sst5 porcino mediante la técnica RACE PCR, se había obtenido la secuencia parcial, y después la total, de las variantes de ARN mensajero mediante ajuste alternativo, que codificaban dos nuevas isoformas de receptor, como en el caso de la sst2 de rata, pero en este caso, codificaban seis y tres dominios transmembrana denominadas isoformas sst5B y sst5C porcinas (p-sst5B y p-sst5C), respectivamente.

- 45 Existen datos sobre GPCRs truncadas producidas mediante ajuste alternativo de ARN mensajero, que codifican proteínas que forman estructuras de menos de siete dominios transmembrana, como se ha descrito previamente para receptores GHRH (Rekasi *et al.*, 2000), GnRH (Pawson *et al.*, 2005), prostaglandina (Ishii *et al.*, 2001), etc., algunas de las cuales son funcionales con potencial relevancia en procesos tumorales. Según los resultados obtenidos para el sst5 porcino, la clonación de homólogos humanos potenciales de las isoformas porcinas de sst5B y sst5C se inició mediante RACE PCR, con el objetivo de evaluar posteriormente su presencia e importancia en tumores endocrinos a través de la técnica de PCR.

Bibliografía citada en el texto

1. Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. 2003. Somatostatin receptors. *Biochemia et Biophysica Acta*, 1616: 1-84.
- 5 2. Castaño JP, Torronteras R, Ramirez JL, Gribouval A, Sánchez-Hormigo A, Ruiz-Navarro A, Gracia-Navarro F. 1996. Somatostatin increases growth hormone (GH) secretion in a subpopulation of porcine somatotropes: evidence for functional and morphological heterogeneity among porcine GH-producing cells. *Endocrinology*, 137: 129-136.
3. Rekasi Z, Czompoly T, Schally AV, Halmos G. 2000. Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers. *PNAS*, 97: 10561-10566.
- 10 4. Pawson AJ, Maudsley S, Morgan K, Davidson L, Naor Z, Millar R. 2005. Inhibition of human type I gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR-I) function by expression of a human type II GnRHR gene fragment. *Endocrinology*. 146(6): 2639-2649.
- 5 5. Ishii Y, Sakamoto K. 2001. Suppression of protein kinase C signaling by the novel isoforma for bovine PGF2a Receptor I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285: 1-8.
- 15 6. Landa RL, Harbeck M, Kaihara K, Chepurny O, kitiphongspattana K, Graf O, Nikolaev VO, Lohse MJ, Holz GG, Roe MW. 2005. Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin secreting MIN6 β -cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 2; 280(35): 31294-31302.
7. Vilardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M & Lohse MJ. 2003. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21 807-812.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20 Los siguientes conceptos se detallan para una interpretación apropiada del presente texto: Un "receptor de somatostatina" es una proteína transmembrana acoplada a una proteína de tipo guanilato ciclasa que pertenece a la familia de proteínas de tipo siete dominios de transmembrana, activada por péptidos hipotalámicos de tipo somatostatina.

25 "RACE-PCR" se refiere a una Amplificación Aleatoria de Extremos de ADNc. Abarca una técnica basada en PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) mediante la cual se introducen oligonucleótidos de secuencia conocida en secuencias desconocidas de ADNc, que son usadas como secuencias diana para la amplificación de la región de ADNc incluida entre dichos oligonucleótidos y la región de interés mediante PCR.

30 Cushing hipofisario se refiere al "Síndrome de Cushing" o hiperfuncionamiento. Es una enfermedad originada por un aumento de la producción de la hormona cortisol o por el uso excesivo de la misma y otras hormonas esteroideas. El Síndrome de Cushing es hipofisario cuando es debido a una producción excesiva de hormona adrenocorticotrópica por parte de la hipófisis o glándula pituitaria.

35 En la presente memoria se describe la determinación de la secuencia de ADN que codifica dos nuevas isoformas del receptor de tipo 5 de somatostatina humana (sst5), denominadas sst5B y sst5C, con cinco y cuatro dominios transmembrana, respectivamente, originadas por un ajuste alternativo del ARN mensajero contenido en la secuencia genómica establecida en la base de datos con número de acceso G13937340 (Figura 1). Mediante el procedimiento descrito en la presente memoria, se obtienen moléculas de ADN recombinante que codifican polipéptidos que exhiben los motivos estructurales de los receptores de somatostatina, al menos en parte de la secuencia. También se describen en la presente memoria secuencias de ADN polinucleotídico que están hibridadas con las de dichas nuevas isoformas en condiciones restrictivas, que abarca un nivel de homología de al menos un 60% entre sus secuencias de nucleótidos, preferiblemente un 75% de homología e idealmente un 90% de homología, o que se derivan de ellas por degeneración del código genético o por mutagénesis.

45 El procedimiento descrito en la presente memoria permite obtener polipéptidos recombinantes funcionales para su posterior estudio. El ADN recombinante se inserta en vectores de expresión de tal modo que contengan una secuencia de nucleótidos tal como la descrita en las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 7, o derivada de ellas. Ambos polipéptidos expresados en vectores de expresión dentro de células hospedantes proporcionan un sistema de escrutinio de nuevos fármacos y compuestos capaces de unirse a las isoformas sst5B y sst5C *in vivo* e *in vitro* de un modo selectivo, así como sistemas de estudio de la modulación de las rutas mensajeras secundarias para cada una de las isoformas como respuesta a fármacos.

50 Como tal, en la presente memoria se describe un ácido nucleico humano purificado que se caracteriza por codificar una isoforma del receptor de tipo 5 de somatostatina humana (sst5) seleccionada entre: sst5B (SEC ID N°: 5), sst5C (SEC ID N°: 7), su secuencia complementaria, y una secuencia con al menos un 90% de homología con las secuencias previas, así como fragmentos de las secuencias previas.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana

- purificada, en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 5 o con una secuencia complementaria de la misma, o comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 7 o una secuencia complementaria de la misma. En un aspecto, el ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana purificada, o una secuencia complementaria del mismo, o
- 5 SEC ID N°: 7 o una secuencia complementaria de la misma. Asimismo, en la presente memoria se describe un ácido nucleico humano purificado que se caracteriza por incluir una secuencia codificadora parcial contenida en la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 3.
- En un aspecto específico, en la presente memoria se describe un ácido nucleico que se caracteriza por incluir el fragmento 3' RACE PCR correspondiente a sst5B, cuya secuencia es la SEC ID N°: 1, o fragmentos del mismo.
- 10 También se describe un ácido nucleico humano que se caracteriza por incluir el fragmento 3' RACE PCR correspondiente al sst5C, cuya secuencia es la SEC ID N°: 3, o fragmentos del mismo.
- Por tanto, la invención también proporciona un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana purificado en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 1 o un ácido nucleico complementario del mismo, o comprende una secuencia que tiene al menos un
- 15 90% de homología con la SEC ID N°: 3 o un ácido nucleico complementario de la misma. En un aspecto, el ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana purificado comprende la SEC ID N°: 1 o un ácido nucleico complementario de la misma, o la SEC ID N°: 3 o un ácido nucleico complementario de la misma.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido purificado que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina de acuerdo con la invención.
- 20 En la presente memoria se describe un polipéptido purificado que se caracteriza porque su secuencia de aminoácidos está definida por las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 8, que está codificado por uno de los oligonucleótidos descritos previamente en el texto.
- Por tanto, en un aspecto, el polipéptido purificado de la invención tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6 ó SEC ID N°: 8.
- 25 Además, en la presente memoria se describe un vector de expresión que se caracteriza por incluir la secuencia de oligonucleótidos descrita previamente, que está acoplada transcripcionalmente a un promotor exógeno. Dicho vector de expresión puede caracterizarse por dicha secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, tal como se ha definido previamente en este texto.
- Por tanto, la invención también proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina de acuerdo con la invención. En un aspecto, el ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina puede comprender la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5 ó SEC ID N°: 7, o ácidos nucleicos complementarios de las mismas.
- 30 Los métodos descritos en la presente memoria pueden caracterizarse por llevarse a cabo in vitro. Dicha investigación puede llevarse a cabo con células completas. Dicho método puede caracterizarse por los polipéptidos detallados en la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4, la SEC ID N°: 6 y la SEC ID N°: 8, originados en un vector de expresión definido previamente en el texto. Dicho polipéptido puede corresponder a uno codificado por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5, la SEC ID N°: 7, o fragmentos de los mismos.
- 35 Además, en la presente memoria se describen nuevos pares de oligonucleótidos detallados en las secuencias SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14, o en secuencias homólogas a las mismas en al menos un 90%, lo que permite amplificar mediante PCR las isoformas humanas sst5 A, B y C. En un aspecto específico se describe el uso de dichos oligonucleótidos para la amplificación selectiva de las isoformas sst5A, sst5B y sst5C a través de cualquier variedad de PCR. También se describe el uso de dichos oligonucleótidos para el estudio de la distribución tisular cuantitativa de sst5A, sst5B o sst5C en tejidos normales y tumorales.
- 40 Por tanto, la invención proporciona pares de oligonucleótidos que comparten al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 9, la SEC ID N°: 10, la SEC ID N°: 11, la SEC ID N°: 12, la SEC ID N°: 13 o la SEC ID N°: 14, en donde dichos pares de oligonucleótidos son útiles para la amplificación PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana de acuerdo con la invención. Los pares de oligonucleótidos pueden ser útiles para la amplificación PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana de acuerdo con la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7.
- 45 La invención también proporciona el uso de pares de oligonucleótidos de acuerdo con la invención para la amplificación PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana. En un aspecto, el ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana puede compartir un 90% de homología con la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7. En un aspecto, el ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana amplificado puede ser la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7.
- 50 Adicionalmente se proporciona un método para determinar la distribución de tejido de ácidos nucleicos de receptor de tipo 5 de somatostatina humana utilizando oligonucleótidos purificados de acuerdo con la invención.
- 55

También se describe en la presente memoria una copia de ADN que se caracteriza por hibridarse con las secuencias totales o parciales contenidas en las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5 ó SEC ID N°: 7.

Además, también se describe una copia de ADN contenida en la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5, la SEC ID N°: 7 o en secuencias homólogas en al menos un 90%, que se caracteriza por ser capaz de silenciar la expresión génica de las isoformas sst5B y sst5C independientemente o conjuntamente.

Por tanto, en un aspecto adicional la invención proporciona el uso *in vitro* de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina de acuerdo con la invención para el silenciamiento de genes, donde se silencia la expresión de uno o ambos genes de receptor de tipo 5 de somatostatina, sst5B o sst5C.

También se describe en la presente memoria el uso de las secuencias contenidas en la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7 para generar anticuerpos selectivos que discriminen entre las isoformas sst5B y sst5C.

Por tanto, la invención también proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la invención para la producción de anticuerpos, en donde dichos anticuerpos discriminan las isoformas de polipéptido sst5B y sst5C.

La presente invención permite el desarrollo de nuevos fármacos capaces de unirse selectivamente a las nuevas isoformas de receptor de tipo 5 de somatostatina, sst5N y sst5C, que actúan como agonistas, antagonistas o agonistas inversos usando técnicas de medición de mensajero secundario tales como la medida micro-fluorométrica de calcio intracelular (Landa *et al.*, 2005). Más específicamente, la inserción del ADN recombinante contenido en la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 y la SEC ID N°: 7, o sus derivados, en vectores de expresión eucarióticos de tipo pCDNA3 (Invitrogen), que son usados ampliamente para el estudio de otros subtipos de receptor de somatostatina. El proceso, cuya metodología puede verse con más detalle en Landa *et al.*, (Landa *et al.*, 2005) puede esquematizarse de un modo general como se indica a continuación:

- (1) Cultivo de la línea celular que va a ser transfectada usando cubreobjetos de vidrio esterilizado.
- (2) Transfección de la línea celular con el plásmido recombinante de interés.
- (3) Incubación de las células transfectadas con 2,5 μ M de Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene) durante 30 minutos a 37°C en medio DMEM suplementado con 20 mM de NaHCO₃ a pH 7,4.
- (4) Montaje de los portaobjetos a los que están adheridas las células en una cámara acoplada a un microscopio invertido tal como el Nikon Eclipse TE 2000 E, acoplado a una cámara CCD Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu), ambas controladas con el software MetaMorph y MetaFluor (Molecular Devices).
- (5) Análisis de las células transfectadas con un objetivo de inmersión en aceite 40X a través de la excitación selectiva a 340 y 380 nm y midiendo la señal producida a 505 nm en intervalos de 5 segundos.
- (6) Los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular antes y después de la administración del fármaco en cuestión son analizados como el cociente de intensidades de la imagen obtenida con las respectivas longitudes de onda de excitación a 340 y 380 nm usando el software MetaFluor.

La presente invención también permite el desarrollo de fármacos que alteran el estado basal de las nuevas isoformas de receptor de tipo 5 de somatostatina, sst5B y sst5C. De esta manera, esta invención permitiría el uso de tecnología FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia) para medir la interacción física de ambas isoformas sst5B y sst5C entre ellas, así como con otras proteínas que pertenecen a la familia GPCR. Mediante esta técnica, se pueden estudiar los cambios en el estado basal rápidamente y con precisión, tanto si implican la agregación de complejos proteínicos ternarios como su disociación en respuesta a un fármaco. Más específicamente, la inserción del ADN recombinante contenido en la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 y la SEC ID N°: 7, o sus derivados, en vectores de expresión eucarióticos de tipo E-GFPN1 (Clontech), tales como el E-CFPN I y el E-YFPN1, permitiría que dichas estructuras recombinantes fueran co-transfectadas en líneas celulares tumorales de tipo HEK-293AD.

El proceso, cuya metodología puede verse con más detalle en Vilardaga *et al.* (Vilardaga *et al.*, 2003), puede esquematizarse de forma general como se indica a continuación:

- (1) Cultivo de la línea celular que va a ser transfectada usando cubreobjetos de vidrio esterilizado.
- (2) Co-transfección de la línea celular con los plásmidos recombinantes de interés.
- (3) Montaje de los portaobjetos a los que están adheridas las células en una cámara acoplada a un microscopio invertido tal como el Nikon Eclipse TE 2000 E, acoplado a una cámara CCD Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu), ambas controladas con el software MetaMorph y MetaFluor (Molecular Devices).
- (4) Análisis de las células transfectadas con un objetivo de inmersión en aceite 40X a través de la excitación selectiva a 440 y 495 nm y midiendo la señal a 510 y 540 nm, respectivamente, en intervalos de 5 segundos.
- (5) Los cambios en la intensidad de la señal de ambas moléculas fluorescentes antes y después de la administración del fármaco en cuestión son analizados como el cociente de intensidades de la imagen obtenida con las respectivas longitudes de onda de excitación a 510 y 540 nm usando el software MetaFluor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Esquema de amplificación de secuencias parciales correspondientes a las isoformas sst5B y sst5C mediante la técnica 3' RACE PCR. Las etapas descritas en el texto se presentan y los oligonucleótidos usados en cada caso se muestran de acuerdo a la nomenclatura de la Tabla 1.

- 5 Figura 2: Esquema de amplificación de secuencias codificadoras de las isoformas sst5B y sst5C mediante la técnica de amplificación con PCR y ligación triple. Las etapas descritas en el texto se presentan y los oligonucleótidos usados en cada caso se muestran de acuerdo a la nomenclatura de la Tabla 1.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

- 10 A continuación se describe un ejemplo para una mayor ilustración de la invención, pero que no la limita en modo alguno.

EJEMPLO

Se siguieron las siguientes etapas descritas en la Figura 1 para clonar secuencias parciales de las isoformas sst5B y sst5C:

- 15 (1) Aislamiento total y retro-transcripción de ARN de varios tejidos tumorales.
 (2) Amplificación de la región 3' de las isoformas sst5B y sst5C mediante RACE PCR; y
 (3) re-amplificación usando oligonucleótidos anidados en aquellos usados en la etapa (2).
 (4) Clonación de los productos de PCR de la etapa (3) y secuenciamiento para determinar su secuencia apropiada.
 (5) Verificación del inicio de la transcripción de las isoformas sst5B y sst5C mediante PCR usando la copia de
 20 ADN creada en (1) como molde.
 (6) Re-amplificación de (5) con el objetivo de verificar la especificidad de las bandas de PCR obtenidas en dicha etapa.

El método de amplificación descrito se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del "GeneRacer® Kit" de Invitrogen® Life Technologies, excepto para las etapas (5) y (6).

- 25 Se usó la estrategia esquematizada en la Figura 2 para clonar las secuencias de codificación y la expresión funcional de las isoformas sst5B y sst5C:

- (1) Se amplificaron los dos exones, exón 1 (E1) y exón 2 (E2), correspondientes a cada una de las isoformas a partir de ADN genómico humano.
 (2) Digestión enzimática de los fragmentos de PCR, y
 30 (3) Ligación mutua de los exones E1 y E2 dentro de un vector de expresión (no mostrado en la figura).

Además, se diseñaron pares de oligonucleótidos capaces de discriminar cada una de las isoformas sst5A, sst5B y sst5C (SEC ID N°: 9 a SEC ID N°: 14) y que podían ser usados con fines cuantitativos, discriminando selectivamente cada isoforma en condiciones de PCR específicas, descritas más detalladamente en el texto.

Aislamiento de ácidos nucleicos.

- 35 ***Aislamiento de ARN.*** Se llevó a cabo usando el reactivo Trizol de Invitrogen® según las recomendaciones indicadas por dicha compañía. Se usaron tejidos procedentes de dos adenomas hipofisarios diagnosticados como no funcionales y una muestra de "Cushing" hipofisario como material de partida para el aislamiento total de ARN diseñado para la clonación. El ARN resultante se re-suspendió en un volumen final de 12 µL de H₂O tratada con DEPC, de los cuales se usó 1 µL para cuantificación espectrofotométrica. Se usaron 2 µg de ARN de cada uno de
 40 los tumores para la retro-transcripción en un volumen final de 20 µL. También se usó ARN procedente de la línea celular tumoral HeLa del kit "GeneRacer", y se usó la misma cantidad de ARN para la reacción de retro-transcripción (Figura 1.1). Se siguieron las indicaciones del kit "GeneRacer®" de Invitrogen® para la reacción de retro-transcripción. También se usó una batería heterogénea de tejidos tumorales hipofisarios con fines diagnósticos, de los cuales se usó una cantidad de entre 15 y 100 mg para la extracción de ARN total. El ARN resultante también fue
 45 re-suspendido en un volumen final de 12 µL de H₂O tratada con DEPC, de los cuales se usó 1 µL para cuantificación espectrofotométrica. Para la retro-transcripción se usaron entre 2 y 5 µg de ARN procedente de cada tumor, según el rendimiento de cada extracción. La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL usando la enzima "PowerScript" de BD Biosciences según las indicaciones del fabricante.

- 50 ***Aislamiento de ADN.*** Se llevó a cabo usando el reactivo Trizol de Invitrogen®, usando 107 linfocitos humanos como material de partida. El ADN genómico obtenido se cuantificó espectrofotométricamente.

Amplificación mediante PCR y obtención de secuencias parciales de las isoformas sst5B y sst5C.

Tal como se ha indicado previamente, se usó el sistema de amplificación comercial "Kit GeneRacer®" de Invitrogen® en combinación con los oligonucleótidos diseñados específicamente indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación selectiva de secuencias parciales de h-sst5B y h-sst5C.

Nombre (SEC ID)	Secuencia 5' → 3', posición en la secuencia de referencia y secuencia de aminoácidos	Dirección de lectura	Referencia
Hum_sst5-ATG (15)	1-ATGGAGCCCCTGTTCCCAGCCT-22 1-MEPLFPA-7	Sentido	GI39756975
Ra_hum_sst5_3' (16)	49D-TGGGTCTCTCTGTGCATGTC-512 164-WVLSLCM-170	Sentido	GI39756975
Ra_hum_sst5_3'N (17)	523-CTGGTGTTCGCGGACGTGCAG-543 175-LVFADVQ-181	Sentido	GI39756976
sst5B-C_E1_U-HindIII (18)	1-TCAAGCTTCGATGGAGCCCCTGTTCCCAGC-20 1-MEPLFP-6	Sentido	GI39756975
sst5B-E1_L_blunt (19)	599-CGGCGCGAAGAAGCCCAGCAC-619 207-VLGFFAP-213	Antisentido	GI39756975
sst5B-E2-U_blunt (20) LLRGS	2275-CTGCTGAGAGGCAGCGGCC-2293 LLRGS	Sentido	GI13937340
sst5B-E2-L_BamHI (21)	2437-TTAGGATCCTCAGAGCAAGCCAAGTTGCC-2457 GNLALL	Antisentido	GI13937340
sst5E1_L_blunt (22)	675-GTTGCAGGTACCGCCCTCCTG-695 181-QEGGTCN-187	Antisentido	GI39756975
sst5C-E2_U blunt (23)	2548-CGTCTGCCAGAGCAGGACCTC-2569 RLPRAGP	Sentido	GI13937340
sst5C-E2_L_BamHI (24)	2617-ACTGGATCCTCAGCCTGGGCCTTTCTCCTG-2637 QEKGP	Sentido	GI13937340

*Las bases que aparecen en cursiva representan dianas de enzimas de restricción

Tras la reacción de retro-transcripción, se usaron 100 ng de copia de ADN para cada reacción PCR, usando los oligonucleótidos Ra_hum_sst5_3' (SEC ID 16) y GeneRacer 3' (Figura 1.3), donde las muestras fueron sometidas a una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de cinco repeticiones de 30 segundos de desnaturalización a 94°C y 1 minuto 30 segundos de alineamiento y extensión a 72°C, además de otros treinta y cinco ciclos iguales al anterior pero usando una temperatura de alineamiento menos exigente de 66°C. El programa de amplificación continuó con 7 minutos de extensión a 72°C con el objetivo de finalizar la síntesis de productos de PCR incompletos. Se re-amplificó 1 µL de cada producto de PCR con los oligonucleótidos Ra_hum_sst5_3'N (SEC ID 17) y GeneRacer 3'N (Figura 1.4), sometiendo a las muestras a una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, y a continuación a treinta y dos ciclos de 30 segundos de una segunda desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 66°C y 40 segundos de extensión a 72°C. El programa de amplificación continuó con 7 minutos de extensión a 72°C con el objetivo de finalizar la síntesis de productos de PCR incompletos. Para ambas amplificaciones se usó una mezcla de polimerasas Biotools Certamp provista de un pistón específicamente para mezclas complejas. Las diferentes reacciones de PCR se llevaron a cabo simultáneamente con todas las copias de ADN. Los productos de PCR fueron observados en gel de agarosa al 1% y las bandas obtenidas se purificaron usando el kit comercial QuiaQuick Mini Elute (Quiagen). Los productos de PCR purificados de este modo fueron clonados con extremos romos en el sitio de restricción EcoRV del vector pBluescript KSII+ y fueron secuenciados, dando como resultado la secuencia correspondiente a 609 pares de bases (SEC ID 1) obtenida de la copia de ADN de células HeLa y otra secuencia de 197 pares base (SEC ID 3) obtenida de la copia de ADN de "Cushing" hipofisario. Ambas copias de ADN obtenidas de las células HeLa y del "Cushing" hipofisario fueron amplificadas a continuación con los oligonucleótidos Hum_sst5_ATG (SEC ID 15) y GeneRacer 3' (Figura 1.5) y los productos de dichas reacciones fueron re-amplificados con el mismo oligonucleótido Hum_sst5_ATG y el oligonucleótido GeneRacer 3'N anidado (Figura 1.6). Se usó el mismo programa para ambas reacciones de amplificación PCR que consiste en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguida de cuarenta ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 62°C y 1 minuto 30 segundos de extensión a 72°C. La observación en gel de agarosa al 1% permitió demostrar la existencia de una banda de aproximadamente 1 kilobase obtenida a partir de la copia de ADN de HeLa, y otra banda de aproximadamente 700 pares base obtenida de la copia de ADN del "Cushing" hipofisario. Este resultado permitió demostrar que, análogamente a las secuencias porcinas homólogas, ambas isoformas, denominadas sst5B y sst5C, respectivamente, comparten un inicio putativo de la traducción común con la isoforma sst5A, cuya secuencia era conocida previamente y se encuentra disponible en las bases de datos con el número de acceso GI39756975.

Obtención de las secuencias codificadoras correspondientes a las isoformas sst5B y sst5C.

Una estrategia basada en la amplificación independiente de los dos exones que comprenden cada isoforma (Figura 2), así como la posterior ligación de ambos fragmentos dentro de un vector de expresión eucariótico, vino seguida de la clonación y la expresión funcional de las isoformas sst5B y sst5C. Más específicamente, partiendo de ADN genómico como molde, se amplificó el exón 1 (E1) de cada isoforma mediante PCR, usando un oligonucleótido sentido común para la sst5B y la sst5C, el sst5B-C_EI_U_HindIII (SEC ID 18), que incorpora una secuencia de

restricción para la enzima HindIII, y un oligonucleótido antisentido específico de cada isoforma, sst5B-E1_L_blunt (SEC ID 19) y sst5C-E1_L_blunt (SEC ID 22) para sst5B y sst5C, respectivamente (Figura 2.1 y 3.2). Los exones 2 (E2) fueron amplificados de un modo análogo, con los pares específicos de oligonucleótidos sentido y antisentido sst5B-E2-U_blunt (SEC ID 20) / sst5B-E2-L_BamHI (SEC ID 21) para la isoforma sst5B, y sst5C-E2_U_blunt (SEC ID 23) / sst5C-E2_L_BamHI (SEC ID 24) para la isoforma sst5C. Las cuatro reacciones PCR se llevaron a cabo simultáneamente usando un programa que consistía en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguida de treinta y cuatro ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 62°C, y 40 segundos de extensión a 72°C. En cada caso, se usó una polimerasa de alta fidelidad con una copia de tipo Pfu Ultra (Stratagene) suplementando las reacciones con betaína 1M (Sigma). A través de estas reacciones de PCR, se pudo incorporar una secuencia de restricción para la enzima HindIII en el extremo 5' de cada E1, el extremo como 3' del E1, el extremo como 5' del E2, y una secuencia de restricción para la enzima BamHI en el extremo 3' de cada E2. Se verificó previamente que ninguna de las enzimas de restricción tuviera sitios de corte adicionales dentro de las secuencias de interés. Los fragmentos de PCR obtenidos fueron purificados usando el kit comercial QuiaQuick Mini Elute (Quiagen), y tras digestión enzimática con HindIII y BamHI, se unieron a través de una reacción triple dentro del vector de expresión eucariótico pCDNA3+ (Invitrogen) que había sido linealizado con las enzimas de restricción previas. Ambas estructuras, sst5B-pCDNA3+ y sst5C-pCDNA3+, fueron secuenciadas al menos por duplicado con el objetivo de verificar la integridad de las secuencias y para compararlas con la secuencia genómica de G113937340, que contiene las dos isoformas, usando el programa BLAST 2 SEQUENCES <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/wblast.cgi>.

Amplificación diferencial selectiva de secuencias parciales correspondientes a las isoformas sst5A, sst5B y sst5C con fines cualitativos.

Se desarrollaron pares de oligonucleótidos con fines diagnósticos, lo que permite una discriminación selectiva mediante PCR de cada una de las isoformas de sst5 humana, sst5A (G139756975), sst5B y sst5C. El par de oligonucleótidos Hum_sst5A_cuant_U / Hum_sst5A_cuant_L, SEC ID 9 y SEC ID 10, respectivamente, amplifica un producto de PCR de 154 pares base usando una temperatura de alineamiento de 68°C. El par de oligonucleótidos Hum_sst5B_cuant_U / Hum_sst5B_cuant_L, SEC ID 11 y SEC ID 12, respectivamente, amplifica un fragmento de PCR de 142 pares base, usando una temperatura de alineamiento de 68°C, contenida en la secuencia correspondiente a sst5B (SEC ID 5), y no amplifica las isoformas sst5C o sst5A (G139756975), a la vez que produce un producto de amplificación de 1643 pares base contenido en la secuencia genómica humana G113937340 que incluye el intrón situado entre los exones E1 y E2 de la isoforma sst5B. El par de oligonucleótidos Hum_sst5C_cuant_U / Hum_sst5C_cuant_L, SEC ID 13 y SEC ID 14, respectivamente, amplifica un fragmento de PCR de 137 pares base usando una temperatura de alineamiento de 68°C, contenido en la secuencia correspondiente a sst5C (SEC ID 6) y también amplifica un fragmento de 488 pares base contenido en la secuencia correspondiente a la sst5B y otro fragmento de 1989 pares base contenido en la secuencia genómica humana G113937340, que incluye el intrón situado entre los exones E1 y E2 de la isoforma sst5C. Las tres reacciones de PCR se llevan a cabo simultáneamente usando un programa de PCR común que consiste en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C y 37 repeticiones de 10 segundos a 94°C, 10 segundos de alineamiento a 68°C y 10 segundos de extensión a 72°C. Usando estas condiciones de PCR, cada par de oligonucleótidos amplifica únicamente el fragmento de PCR específico de cada isoforma de manera selectiva, sin amplificar las otras secuencias adicionales mencionadas previamente. En todos los casos, las reacciones fueron suplementadas con betaína 1M (Sigma). Esta metodología permitió observar la presencia selectiva de la isoforma sst5B en varios tumores hipofisarios clasificados clínicamente como no funcionales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Córdoba
 Duran Prado, Mario
 5 Martinez Fuentes, Antonio Jesús
 Vazquez Martínez, Rafael
 García Navarro, Francisco
 García Navarro, Socorro
 10 Malagon Poyato, Maria del Mar
 Castano Fuentes, Justo Pastor

<120> Isoformas Truncadas del Receptor-5 de la Somatostatina en Tumores Pituitarios

<130>202PCT
 15 <140> PCT/ES2007/00627
 <141> 27-10-2007

<160>24
 20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 609
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>CDS
 30 <222>(1)..(333)

<220>
 <221>3'UTR
 <222> (334)..(609)
 35 <400> 1

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58		

ES 2 401 233 T3

ggagggcaca gggagcggct gaggggcac aaatcctggc aggagaaagg cccaggctga 513
 ggccaggcct gggaaacatc caagcagtga ggacacgcgt gtttgacaac tgctcccctg 573
 aataaatgcg aggataaatg ttttaaaaaa aaaaaa 609

5 <210>2
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val Phe Ala Asp
 1 5 10 15
 Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Ala Ser Trp Pro Glu Pro Val Gly
 20 25 30
 Leu Trp Gly Ala Val Phe Ile Ile Tyr Thr Ala Val Leu Gly Phe Phe
 35 40 45
 Ala Pro Leu Leu Arg Gly Ser Gly Arg Ala Gly Asp Ala Asn Gly Arg
 50 55 60
 Pro Trp Glu Ser Arg Arg Leu Pro Pro Arg Ile Val Leu Pro Pro Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Thr Pro Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Pro Glu Arg Gly Pro
 85 90 95
 Arg Glu Pro Cys Trp Gly Leu Trp Gly Asn Leu Ala Leu Leu
 100 105 110

10 <210>3
 <211> 197
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221>CDS
 <222>(1)..(162)
 20 <220>
 <221>3'UTR
 <222>(163)..(197)
 25 <400> 3

ES 2 401 233 T3

```

tgg gtc ctg tct ctg tgc atg tcg ctg ccg ctc ctg gtg ttc gcg gac      48
Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val Phe Ala Asp
1           5           10
gtg cag gag ggc ggt acc tgc aac cgt ctg ccc aga gca gga cct caa      96
Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Arg Leu Pro Arg Ala Gly Pro Gln
                20           25           30
cct cct gga ggg cac agg gag cgg ctg agt ggg cac aaa tcc tgg cag      144
Pro Pro Gly Gly His Arg Glu Arg Leu Ser Gly His Lys Ser Trp Gln
                35           40           45
gag aaa ggc cca ggc tga ggccaggcct gggaaacatg ttaaaaaaaaa aaaaa      197
Glu Lys Gly Pro Gly
50

```

5 <210>4
 <211>53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val Phe Ala Asp
1           5           10
Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Arg Leu Pro Arg Ala Gly Pro Gln
                20           25           30
Pro Pro Gly Gly His Arg Glu Arg Leu Ser Gly His Lys Ser Trp Gln
                35           40           45
Glu Lys Gly Pro Gly
50

```

10
 15 <210>5
 <211> 822
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221>CDS
 <222>(1)..(822)
 <400> 5

ES 2 401 233 T3

atg	gag	ccc	ctg	ttc	cca	gcc	tcc	acg	ccc	agc	tgg	aac	gcc	tcc	tcc	48
Met	Glu	Pro	Leu	Phe	Pro	Ala	Ser	Thr	Pro	Ser	Trp	Asn	Ala	Ser	Ser	
1				5					10					15		
ccg	ggg	gct	gcc	tct	gga	ggc	ggt	gac	aac	agg	acg	ctg	gtg	ggg	ccg	96
Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Val	Gly	Pro	
			20					25					30			
gcg	ccc	tcg	gca	ggg	gcc	cgg	gcg	gtg	ctg	gtg	ccc	gtg	ctg	tac	ctg	144
Ala	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Tyr	Leu	
		35					40					45				
ctg	gtg	tgt	gcg	gcc	ggg	ctg	ggc	ggg	aac	acg	ctg	gtc	atc	tac	gtg	192
Leu	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Tyr	Val	
	50					55					60					
gtg	ctg	cgc	ttc	gcc	aag	atg	aag	acc	gtc	acc	aac	atc	tac	att	ctc	240
Val	Leu	Arg	Phe	Ala	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Thr	Asn	Ile	Tyr	Ile	Leu	
65					70					75					80	
aac	ctg	gca	gtg	gcc	gac	gtc	ctg	tac	atg	ctg	ggg	ctg	cct	ttc	ctg	288
Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Val	Leu	Tyr	Met	Leu	Gly	Leu	Pro	Phe	Leu	
				85					90					95		
gcc	acg	cag	aac	gcc	gcg	tcc	ttc	tgg	ccc	ttc	ggc	ccc	gtc	ctg	tgc	336
Ala	Thr	Gln	Asn	Ala	Ala	Ser	Phe	Trp	Pro	Phe	Gly	Pro	Val	Leu	Cys	
			100					105					110			
cgc	ctg	gtc	atg	acg	ctg	gac	ggc	gtc	aac	cag	ttc	acc	agt	gtc	ttc	384
Arg	Leu	Val	Met	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gln	Phe	Thr	Ser	Val	Phe	

ES 2 401 233 T3

115	120	125	
tgc ctg aca gtc atg agc gtg gac cgc tac ctg gca gtg gtg cac ccg Cys Leu Thr Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Val His Pro			432
	130	135	
ctg agc tcg gcc cgc tgg cgc cgc ccg cgt gtg gcc aag ctg gcg agc Leu Ser Ser Ala Arg Trp Arg Arg Pro Arg Val Ala Lys Leu Ala Ser		140	480
	145	150	
gcc gcg gcc tgg gtc ctg tct ctg tgc atg tgc ctg ccg ctc ctg gtg Ala Ala Ala Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val		165	528
	170	175	
ttc gcg gac gtg cag gag ggc ggt acc tgc aac gcc agc tgg ccg gag Phe Ala Asp Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Ala Ser Trp Pro Glu		180	576
	185	190	
ccc gtg ggg ctg tgg ggc gcc gtc ttc atc atc tac acg gcc gtg ctg Pro Val Gly Leu Trp Gly Ala Val Phe Ile Ile Tyr Thr Ala Val Leu		195	624
	200	205	
ggc ttc ttc gcg ccg ctg ctg aga ggc agc ggc cgc gcg ggt gac gca Gly Phe Phe Ala Pro Leu Leu Arg Gly Ser Gly Arg Ala Gly Asp Ala		210	672
	215	220	
aat ggc agg ccc tgg gaa tcc cgc cgc ctc cca cct aga att gtc cta Asn Gly Arg Pro Trp Glu Ser Arg Arg Leu Pro Pro Arg Ile Val Leu		225	720
	230	235	
cct ccc cca ccc caa aca cca gct ttt cct ggc gcc cca ggc cca gaa Pro Pro Pro Pro Gln Thr Pro Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Pro Glu		245	768
	250	255	
cgt ggg ccc aga gag cct tgc tgg ggt ctc tgg ggc aac ttg gcc ttg Arg Gly Pro Arg Glu Pro Cys Trp Gly Leu Trp Gly Asn Leu Ala Leu		260	816
	265	270	
ctc tga Leu			822

<210>6
 <211>273
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Glu	Pro	Leu	Phe	Pro	Ala	Ser	Thr	Pro	Ser	Trp	Asn	Ala	Ser	Ser
1				5					10					15	
Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Val	Gly	Pro
		20						25					30		
Ala	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Tyr	Leu
		35					40					45			
Leu	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Tyr	Val
	50					55					60				
Val	Leu	Arg	Phe	Ala	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Thr	Asn	Ile	Tyr	Ile	Leu
65					70					75					80

ES 2 401 233 T3

Asn Leu Ala Val Ala Asp Val Leu Tyr Met Leu Gly Leu Pro Phe Leu
85 90 95

Ala Thr Gln Asn Ala Ala Ser Phe Trp Pro Phe Gly Pro Val Leu Cys
100 105 110

Arg Leu Val Met Thr Leu Asp Gly Val Asn Gln Phe Thr Ser Val Phe
115 120 125

Cys Leu Thr Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Val His Pro
130 135 140

Leu Ser Ser Ala Arg Trp Arg Arg Pro Arg Val Ala Lys Leu Ala Ser
145 150 155 160

Ala Ala Ala Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val
165 170 175

Phe Ala Asp Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Ala Ser Trp Pro Glu
180 185 190

Pro Val Gly Leu Trp Gly Ala Val Phe Ile Ile Tyr Thr Ala Val Leu
195 200 205

Gly Phe Phe Ala Pro Leu Leu Arg Gly Ser Gly Arg Ala Gly Asp Ala
210 215 220

Asn Gly Arg Pro Trp Glu Ser Arg Arg Leu Pro Pro Arg Ile Val Leu
225 230 235 240

Pro Pro Pro Pro Gln Thr Pro Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Pro Glu
245 250 255

Arg Gly Pro Arg Glu Pro Cys Trp Gly Leu Trp Gly Asn Leu Ala Leu
260 265 270

Leu

- <210>7
- <211>651
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221>CDS
- 10 <222>(1)..(651)
- <400> 7

atg gag ccc ctg ttc cca gcc tcc acg ccc agc tgg aac gcc tcc tcc 48
 Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Ser Thr Pro Ser Trp Asn Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 ccg ggg gct gcc tct gga ggc ggt gac aac agg acg ctg gtg ggg ccg 96
 Pro Gly Ala Ala Ser Gly Gly Gly Asp Asn Arg Thr Leu Val Gly Pro
 20 25 30
 gcg ccc tcg gca ggg gcc cgg gcg gtg ctg gtg ccc gtg ctg tac ctg 144
 Ala Pro Ser Ala Gly Ala Arg Ala Val Leu Val Pro Val Leu Tyr Leu
 35 40 45
 ctg gtg tgt gcg gcc ggg ctg ggc ggg aac acg ctg gtc atc tac gtg 192
 Leu Val Cys Ala Ala Gly Leu Gly Gly Asn Thr Leu Val Ile Tyr Val
 50 55 60
 gtg ctg cgc ttc gcc aag atg aag acc gtc acc aac atc tac att ctc 240
 Val Leu Arg Phe Ala Lys Met Lys Thr Val Thr Asn Ile Tyr Ile Leu
 65 70 75 80
 aac ctg gca gtg gcc gac gtc ctg tac atg ctg ggg ctg cct ttc ctg 288
 Asn Leu Ala Val Ala Asp Val Leu Tyr Met Leu Gly Leu Pro Phe Leu
 85 90 95
 gcc acg cag aac gcc gcg tcc ttc tgg ccc ttc gcc ccc gtc ctg tgc 336
 Ala Thr Gln Asn Ala Ala Ser Phe Trp Pro Phe Gly Pro Val Leu Cys
 100 105 110
 cgc ctg gtc atg acg ctg gac ggc gtc aac cag ttc acc agt gtc ttc 384
 Arg Leu Val Met Thr Leu Asp Gly Val Asn Gln Phe Thr Ser Val Phe
 115 120 125
 tgc ctg aca gtc atg agc gtg gac cgc tac ctg gca gtg gtg cac ccg 432
 Cys Leu Thr Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Val His Pro
 130 135 140
 ctg agc tcg gcc cgc tgg cgc cgc ccg cgt gtg gcc aag ctg gcg agc 480
 Leu Ser Ser Ala Arg Trp Arg Arg Pro Arg Val Ala Lys Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 gcc gcg gcc tgg gtc ctg tct ctg tgc atg tcg ctg ccg ctc ctg gtg 528
 Ala Ala Ala Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val
 165 170 175
 ttc gcg gac gtg cag gag ggc ggt acc tgc aac cgt ctg ccc aga gca 576
 Phe Ala Asp Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Arg Leu Pro Arg Ala
 180 185 190
 gga cct caa cct cct gga ggg cac agg gag gcg ctg agt ggg cac aaa 624
 Gly Pro Gln Pro Pro Gly Gly His Arg Glu Arg Leu Ser Gly His Lys
 195 200 205
 tcc tgg cag gag aaa ggc cca ggc tga 651
 Ser Trp Gln Glu Lys Gly Pro Gly
 210 215

<210>8
 <211>216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

ES 2 401 233 T3

Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Ser Thr Pro Ser Trp Asn Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Ala Ala Ser Gly Gly Gly Asp Asn Arg Thr Leu Val Gly Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ser Ala Gly Ala Arg Ala Val Leu Val Pro Val Leu Tyr Leu
 35 40 45
 Leu Val Cys Ala Ala Gly Leu Gly Gly Asn Thr Leu Val Ile Tyr Val
 50 55 60
 Val Leu Arg Phe Ala Lys Met Lys Thr Val Thr Asn Ile Tyr Ile Leu
 65 70 75 80
 Asn Leu Ala Val Ala Asp Val Leu Tyr Met Leu Gly Leu Pro Phe Leu
 85 90 95
 Ala Thr Gln Asn Ala Ala Ser Phe Trp Pro Phe Gly Pro Val Leu Cys
 100 105 110
 Arg Leu Val Met Thr Leu Asp Gly Val Asn Gln Phe Thr Ser Val Phe
 115 120 125
 Cys Leu Thr Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Val His Pro
 130 135 140
 Leu Ser Ser Ala Arg Trp Arg Arg Pro Arg Val Ala Lys Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Trp Val Leu Ser Leu Cys Met Ser Leu Pro Leu Leu Val
 165 170 175
 Phe Ala Asp Val Gln Glu Gly Gly Thr Cys Asn Arg Leu Pro Arg Ala
 180 185 190
 Gly Pro Gln Pro Pro Gly Gly His Arg Glu Arg Leu Ser Gly His Lys
 195 200 205
 Ser Trp Gln Glu Lys Gly Pro Gly
 210 215

<210>9
 <211>22
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 9

10 ccgccagagc ttccagaagg tt 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

ES 2 401 233 T3

<400> 10
gctggtctgc ataagcccgt tg 22

5 <210> 11
<211>23
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 11
ggcgcogtct tcatcatcta cac 23

<210> 12
<211>22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 12
gggggtgggg aggtaggaca at 22

20 <210> 13
<211>23
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 13
gtcctgtctc tgtcatgtc gct 23

30 <210> 14
<211>22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35 <400> 14
caggattigt gcccaactcag cc 22

40 <210> 15 <211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <400> 15
atggagcccc tgtcccagc ct 22

50 <210> 16
<211>23
<212> ADN
<213> Homo sapiens

55 <400> 16
tgggtcctgt ctctgtcat gtc 23

60 <210> 17
<211> 21
<212> ADN

ES 2 401 233 T3

<213> Homo sapiens
<400> 17
5 ctggtgttcg cggacgtgca g 21
<210> 18
<211> 30
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens
<400> 18
tcaagcttcg atggagcccc tgttcccagc 30
15 <210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
20 <400> 19
cggcgcgaag aagcccagca c 21
25 <210>20
<211> 19
<212> ADN
<213> Homo sapiens
30 <400> 20
ctgctgagag gcagcggcc 19
35 <210>21
<211>30
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 21
40 ttaggatcct cagagcaagg ccaagttgcc 30
<210> 22
<211>21
45 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 22
50 gttgcaggta cggccctct g 21
<210>23 <211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens
55 <400> 23
cgtctgcca gagcaggacc tc 22
60 <210>24

ES 2 401 233 T3

<211>30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 24

actggatcct cagcctgggc cttctctcg 30

10

REIVINDICACIONES

- 5 **1.-** Un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana purificado, donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 5, o con una secuencia complementaria a la misma, o comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 7, o con una secuencia complementaria a la misma.
- 2.-** Un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana purificado según la reivindicación 1, donde dicho ácido nucleico comprende la SEC ID N°: 5 o una secuencia complementaria a la misma, o la SEC ID N°: 7 o una secuencia complementaria a la misma.
- 10 **3.-** Un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana purificado, donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 1 o con un ácido nucleico complementario a la misma, o comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 3 o con un ácido nucleico complementario al mismo.
- 15 **4.-** Un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina purificado según la reivindicación 3, donde dicho ácido nucleico comprende la SEC ID N°: 1 o un ácido nucleico complementario a la misma, o la SEC ID N°: 3 o un ácido nucleico complementario a la misma.
- 5.-** Un polipéptido purificado que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 6.-** Un polipéptido de receptor de tipo 5 de somatostatina purificado según la reivindicación 5, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4, la SEC ID N°: 6 ó la SEC ID N°: 8.
- 20 **7.-** Un polipéptido de receptor de tipo 5 de somatostatina purificado según la reivindicación 6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 ó la SEC ID N°: 4.
- 8.-** Un polipéptido de receptor de tipo 5 de somatostatina purificado según la reivindicación 6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6 ó la SEC ID N1: 8.
- 25 **9.-** Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 10.-**Un vector de expresión según la reivindicación 9, donde dicho ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina comprende la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7, o ácidos nucleicos complementarios a las mismas.
- 30 **11.-**Un vector de expresión según la reivindicación 10, donde dicho ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina comprende la SEC ID N°: 1, o un ácido nucleico complementario a la misma.
- 12.-**Un vector de expresión según la reivindicación 10, donde dicho ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina comprende la SEC ID N°: 3, o un ácido nucleico complementario a la misma.
- 35 **13.-**Pares de oligonucleótidos que comparten al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 9, la SEC ID N°: 10, la SEC ID N°: 11, la SEC ID N°: 12, la SEC ID N°: 13 ó la SEC ID N°: 14, donde dichos pares de oligonucleótidos son útiles para la amplificación por PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 14.-**Pares de oligonucleótidos según la reivindicación 13, útiles para la amplificación por PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana que comparte al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7.
- 40 **15.-**Pares de oligonucleótidos según la reivindicación 13, útiles para la amplificación por PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana según la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7.
- 16.-**El uso de pares de oligonucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 para la amplificación por PCR de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana.
- 45 **17.-**El uso según la reivindicación 16, en el que dicho ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana amplificado comparte al menos un 90% de homología con la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7.
- 18.-**El uso según la reivindicación 16, en el que dicho ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina humana amplificado es la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3, la SEC ID N°: 5 ó la SEC ID N°: 7.
- 50 **19.-**Un método in vitro para la determinación de la distribución de tejido de ácidos nucleicos de receptor de tipo 5 de

somatostatina humana que utiliza oligonucleótidos purificados según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

20.-El uso in vitro de un ácido nucleico de receptor de tipo 5 de somatostatina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el silenciamiento génico, donde se silencia la expresión de uno o ambos genes de receptor de tipo 5 de somatostatina, sst5B y sst5C.

- 5 **21.**-El uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para la producción de anticuerpos, en el que dichos anticuerpos discriminan las isoformas de polipéptido sst5B y sst5C.

Figura 1

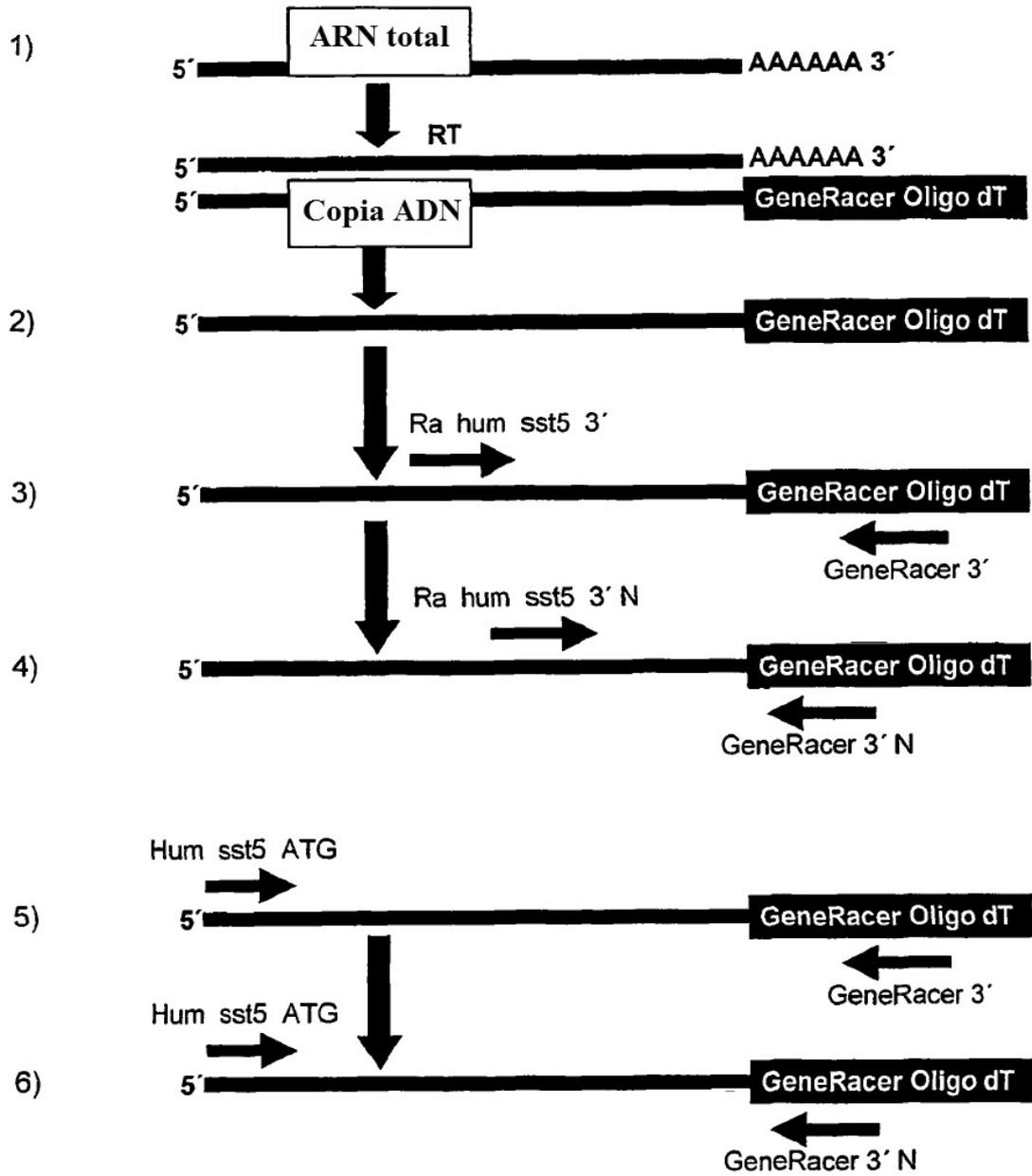


Figura 2

