

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 445 045**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/567** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2005 E 08013482 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2031063**

(54) Título: **Moduladores de receptores de olores**

(30) Prioridad:

**18.06.2004 US 581087 P**  
**22.06.2004 US 582011 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2014**

(73) Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)**  
**M454 DAVISON BUILDING, DUMC BOX 3664**  
**DURHAM, NC 27710, US**

(72) Inventor/es:

**MATSUNAMI, HIROAKI;**  
**MATSUNAMI, MOMOKA;**  
**SAITO, HARUMI y**  
**ZHUANG, HANYI**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 445 045 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

## Moduladores de receptores de olores

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/581.087; presentada el 18 de junio de 2004 y la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/582.011 presentada el 22 de junio de 2004.

La presente invención se realizó con soporte del gobierno con la subvención nº DC05782, otorgada por el National Institutes of Health.

**Campo de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y refiere a polipéptidos capaces de estimular la localización en la superficie celular del receptor de olores y la expresión funcional del receptor de olores. La presente invención proporciona además ensayos para la detección de ligandos específicos de varios receptores de olores. Adicionalmente, la presente invención se refiere a procedimientos de detección selectiva de polimorfismos de proteínas auxiliares del receptor de olores y a mutaciones asociadas con estados de enfermedad, así como a procedimientos de detección selectiva de agentes terapéuticos, ligandos y moduladores de dichas proteínas.

**Antecedentes de la invención**

La disfunción olfatoria surge por diversas causas e influye profundamente sobre la calidad de vida de los pacientes. Aproximadamente 2 millones de estadounidenses experimentan algún tipo de disfunción olfatoria. En los estudios se muestran que la disfunción olfatoria afecta a al menos 1 % de la población de menores de 65 años de edad y muy por encima del 50 % de la población de mayores de 65 años de edad. El sentido del olfato determina el sabor de los alimentos y las bebidas y sirve como sistema de advertencia temprano para la detección de riesgos ambientales, tales como alimentos podridos, fugas de gas natural, humo o contaminantes aéreos. Las pérdidas o distorsiones del sentido del olfato pueden afectar de forma adversa a la preferencia por alimentos, la ingesta de alimentos y el apetito.

Los trastornos del olfato se clasifican del siguiente modo: 1) anosmia: Incapacidad para detectar sensaciones olfatorias cualitativas (p. ej., ausencia de la función olfatoria), 2) anosmia parcial: capacidad para percibir algunos, pero no todos, los olores, 3) hiposmia o microsmia: disminución de la sensibilidad a los olores, 4) hiperosmia: función olfatoria anormalmente aguda, 5) disosmia (cacosmia o parosmia): percepción olfatoria o estimulación olorosa distorsionada o alterada o distorsionada, 6) fantosmia: sensación disósmica percibida en ausencia de un estímulo del olor (antes conocida como alucinación olfatoria) y 7) agnosia olfatoria: incapacidad para reconocer una sensación olorosa.

La disfunción olfatoria se clasifica además como 1) alteraciones en la conducción o transporte por obstrucción de las fosas nasales (p. ej., inflamación nasal crónica, poliposis etc.), 2) alteraciones neurosensoriales por daños en el neuroepitelio (p. ej., infección viral, toxinas aéreas etc.), 3) alteración neural olfatoria central por daños en el sistema nervioso central (p. ej., tumores, masas impactadas en el pedúnculo olfativo, trastornos neurodegenerativos etc.). Estas categorías no son mutuamente excluyentes. Por ejemplo, los virus pueden producir daños en el neuroepitelio olfatorio y también se pueden transportar al sistema nervioso central a través del nervio olfativo causando daños en los elementos centrales del sistema olfatorio.

Las neuronas del epitelio olfativo, las neuronas sensoriales olfativas (en lo sucesivo en el presente documento "neuronas olfativas" determinan inicialmente las capacidades para oler. En las neuronas olfativas, las proteínas del receptor del olor (en lo sucesivo en el presente documento "OR"), miembros de la super familia de receptores acoplados a proteína G (en lo sucesivo en el presente documento "GPCR"), se sintetizan en el retículo endoplásmico, se transportan y, en última instancia, se concentran en la membrana de la superficie celular de los cilios en la punta de la dendrita. Considerando que los OR desempeñan papeles en el reconocimiento de objetivos de los axones olfativos en desarrollo, las proteínas OR también están presentes en los terminales axónicos (véase, por ejemplo, Mombaerts, P., (1996) Cell 87, 675-686; Wang, F., y col. (1998) Cell 93, 47-60. En roedores, los olores se transmiten mediante tantos como 1.000 OR diferentes codificados por una familia multigénica (véase, por ejemplo, Axel, R. (1995) Sci Am 273, 154-159; Buck, L., y Axel, R. (1991) Cell 65, 175-187; Firestein, S. (2001) Nature 413, 211-218; Mombaerts, P. (1999) Annu Rev Neurosci 22, 487-509; Young, J. M., y col., (2002) Hum Mol Genet 11, 535-546 ; Zhang, X., y Firestein, S. (2002) Nat Neurosci 5, 124-133. Cada neurona olfativa expresa solo un tipo de OR, sentando la base celular de discriminación de olores por las neuronas olfativas (véase, por ejemplo, Lewcock, J. W., y Reed, R. R. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A; Malnic, B., y col., (1999) Cell 96, 713-723; Serizawa, S., y col., (2003) Science 302, 2088-2094.

Lo que se necesita es una mejor comprensión del sentido del olfato. Lo que se necesita también es una mejor comprensión de la función de los receptores del olfato.

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativas y no forman parte de la presente invención.

**Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y refiere a polipéptidos capaces de estimular la localización en la superficie celular del receptor de olores y la expresión funcional del receptor de olores. La presente invención proporciona además ensayos para la detección de ligandos específicos de varios receptores de olores.

5 Adicionalmente, la presente invención se refiere a procedimientos de detección selectiva de polimorfismos de proteínas auxiliares del receptor de olores y a mutaciones asociadas con estados de enfermedad, así como a procedimientos de detección selectiva de agentes terapéuticos, ligandos y moduladores de dichas proteínas.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar un ligando del receptor de olores, que comprende las etapas de a) proporcionar i) una línea celular que comprende un receptor de olores y un agente informador, y ii) un compuesto de ensayo; b) exponer el compuesto de ensayo a la línea celular; y c) medir la actividad del agente informador en el que la línea celular expresa RTP1, RTP1-A1, RTP1-D3, o RTP2 como se define en la reivindicación 1. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular heteróloga o una línea celular natural. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular 293T. En realizaciones preferidas, el receptor de olores es un receptor de olores humanos. En otras realizaciones preferidas, el compuesto de ensayo es una molécula odorífera. En otras realizaciones más, el agente informador está regulado por un elemento respondedor al AMPc. En realizaciones preferidas, la línea celular comprende además G<sub>olf</sub>. En otras realizaciones, el receptor de olor es un receptor de olor murino. En otras realizaciones, el receptor de olor es un receptor de olor sintético. En realizaciones preferidas, el receptor de olor comprende S6/79, S18, S46, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y/o MOR32-11. En otras realizaciones, el agente informador es un agente de iluminación. En otras realizaciones más, el agente de iluminación es la luciferaza. En realizaciones alternativas, el procedimiento comprende además la etapa de detectar la presencia o ausencia de un ligando del receptor de olor basándose en la actividad del agente informador.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona una línea celular que expresa un receptor de olor, en la que la expresión se localiza en la superficie celular. En realizaciones preferidas, la línea celular comprende un gen heterólogo, como se define en la reivindicación 10. En otras realizaciones preferidas, la línea celular es una la línea celular 293T. En otras realizaciones, el receptor de olor es un receptor de olor humano. En realizaciones preferidas, el receptor de olores está marcado con un agente informador. En algunas realizaciones, el agente informador es un agente informador de iluminación. En algunas realizaciones, el agente informador de iluminación comprende glutatión-S-transferasa (GST), c-myc, 6-histidina (6X-His), proteína fluorescente verde (GFP), proteína de unión a la maltosa (MBP), hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), β-galactosidasa o GAL4. En realizaciones preferidas, la línea celular comprende además expresión de G<sub>olf</sub>. En realizaciones preferidas, el receptor de olor es un receptor de olor murino. En algunas realizaciones, el receptor de olor es un receptor de olor sintético. En realizaciones preferidas, el receptor de olor comprende S6/79, S18, S46, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y MOR32-11.

35 La descripción divulga un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica una proteína que comprende las SEC ID Nº 21, 27, 33, 34, 37, 38 y 41-50, y variantes de las mismas que son al menos un 80 % idénticas a las SEC ID Nº 21, 27, 33, 34, 37, 38 y 41-50. La secuencia puede unirse operablemente a un promotor heterólogo. La secuencia puede estar contenida dentro de un vector. El vector puede estar dentro de una célula huésped.

40 La descripción también divulga secuencias de ácido nucleico aisladas y purificadas que hibridan en condiciones de rigurosidad alta con un ácido nucleico que comprende las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y/o 18. La secuencia puede unirse operablemente a un promotor heterólogo. La secuencia puede estar contenida dentro de un vector. El vector huésped puede estar dentro de una célula huésped. El vector huésped puede expresarse en una célula huésped. La célula huésped puede estar localizada en un organismo, en el que el organismo es un animal no humano. La secuencia de polinucleótidos puede comprender al menos quince (p. ej., 15, 18, 20, 21, 25, 50, 100, 1000, ...) nucleótidos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos aislada.

45 La descripción contempla un polipéptido codificado por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18 y variantes de las mismas que tienen una identidad de al menos 80 % con las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18. La proteína puede tener una identidad de al menos 90 % con las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18 o la proteína puede tener una identidad de al menos 95 % con las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18.

50 La presente descripción también se refiere a una composición que comprende un ácido nucleico que inhibe la unión de al menos una porción de un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18 a sus secuencias complementarias.

55 La presente descripción proporciona un procedimiento para detectar una variante del polipéptido REEP en un sujeto, que comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto, en el que la muestra biológica comprende un polipéptido REEP y detectar la presencia o ausencia de una variante del polipéptido REEP en la muestra biológica. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de tejido, una muestra de orina y una muestra de líquido amniótico. El sujeto se puede seleccionar del grupo que consiste en un embrión, un feto, un animal neonato y un animal joven. El animal puede ser un ser humano. La detección puede comprender unión diferencial del anticuerpo. La detección puede comprender una transferencia de tipo Western blot.

El polipéptido de REEP variante puede ser un polipéptido de REEP1 variante. La detección puede comprender detectar una secuencia de ácido nucleico de REEP 1.

La presente descripción proporciona un procedimiento para detectar una variante del polipéptido RTP en un sujeto, que comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto, en el que la muestra biológica comprende un polipéptido RTP y detectar la presencia o ausencia de una variante del polipéptido RTP en la muestra biológica. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de tejido, una muestra de orina y una muestra de líquido amniótico. El sujeto se puede seleccionar del grupo que consiste en un embrión, un feto, un animal neonato y un animal joven. El animal puede ser un ser humano. La detección puede comprender la unión de anticuerpo diferencial. La detección puede comprender una transferencia de tipo Western. El polipéptido variante de RTP puede ser un polipéptido variante de RTP1 y/o RTP2. La detección puede comprender detectar una secuencia de ácido nucleico de RTP1 y/o RTP2. La variante de RTP1 puede seleccionarse del grupo que consiste en RTP1-A1, RTP1-D1 y RTP1-D3.

La presente descripción proporciona un kit que comprende un reactivo para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido variante de REEP en una muestra biológica. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido variante de REEP en una muestra biológica. El polipéptido REEP puede ser un polipéptido de REEP1. El polipéptido REEP puede seleccionarse del grupo que consiste en REEP1-6. Las instrucciones pueden comprender instrucciones requeridas por la U.S. Food and Drug Agency para kits diagnósticos *in vitro*. El reactivo puede ser uno o más anticuerpos. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de tejido, una muestra de orina y una muestra de líquido amniótico. Los reactivos se pueden configurar para detectar una secuencia de ácido nucleico de REEP1.

La presente descripción proporciona un kit que comprende un reactivo para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido variante de RTP en una muestra biológica. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido variante de RTP en una muestra biológica. El polipéptido de RTP puede ser un polipéptido de RTP1 y/o RTP2. El polipéptido RTP puede seleccionarse del grupo que consiste en RTP1-4. Las instrucciones pueden comprender instrucciones requeridas por la U.S. Food and Drug Agency para kits diagnósticos *in vitro*. El reactivo puede ser uno o más anticuerpos. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de tejido, una muestra de orina y una muestra de líquido amniótico. Los reactivos se pueden configurar para detectar una secuencia de ácido nucleico de RTP1 y/o RTP2. El polipéptido de RTP1 puede ser un polipéptido variante de RTP1 seleccionado del grupo que consiste en RTP1-A1, RTP1-D1, y RTP1-D3.

La presente descripción proporciona un procedimiento para detectar compuestos, que comprende proporcionar una muestra que expresa un polipéptido de REEP heterólogo y un compuesto de ensayo y exponer la muestra al compuesto de ensayo y detectar un efecto biológico. El polipéptido de REEP puede seleccionarse del grupo que consiste en REEP1-6. La muestra puede comprender una célula. La muestra puede comprender un tejido. La muestra puede encontrarse en un sujeto. El efecto biológico puede comprender un cambio de actividad de REEP. El efecto biológico puede comprender un cambio de expresión de REEP.

La presente descripción proporciona un procedimiento para detectar compuestos, que comprende proporcionar una muestra que expresa un polipéptido de RTP heterólogo y un compuesto de ensayo y exponer la muestra al compuesto de ensayo y detectar un efecto biológico. La variante de RTP puede seleccionarse del grupo que consiste en RTP1-4 y RTP1-A1, RTP1-D1, y RTP1-D3. La muestra puede comprender una célula. La muestra puede comprender un tejido. La muestra puede encontrarse en un sujeto. El efecto biológico puede comprender un cambio de actividad de RTP. El efecto biológico puede comprender un cambio de expresión de RTP.

#### Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una estrategia de detección selectiva para identificar moléculas que estimulan la expresión en la superficie celular de receptores de olor. REEP1 se obtuvo de 1 análisis con Digital Differential Display. RTP1 se obtuvo de bibliotecas SAGE.

La Figura 2 muestra que REEP y/o RTP estimulan la expresión en la superficie celular de receptores de olor en células 293T. (A) ADNc que codifican diversos OR (MOR203-1, OREG, olfr62, OR-S46 y 17 de rata) se transfecaron con o sin REEP1, RTP1 y/o RTP2. Se observó un incremento de la tinción de los OR en la superficie celular en células que coexpresan las proteínas auxiliares. En contraste, no se observó diferencia de la tinción en la superficie celular en células que expresan receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos. Usando los protocolos de tinción de células vivas se observan señales fluorescentes en la superficie celular como tinción puntual distintiva. La barra de escala equivale a 50 um. (B) Números normalizados de células marcadas se muestran para cada condición de transfección (N=4918-15526). Después de una tinción inmunofluorescente doble contra receptores marcados con Rho y el receptor  $\beta$ 2 adrenérgico marcado con HA, se realizó un análisis FACS para cuantificar las células inmunopositivas. El número de células receptoras marcadas con Rho se normalizó a la de las células positivas para el receptor  $\beta$ 2 adrenérgico. En casi todos los casos se observaron más células inmunopositivas cuando se expresaron diferentes OR con REEP1, RTP1 y/o RTP2. En contraste, cuando se usó el receptor VR4 y mT2R5 en lugar de los OR no se observó potenciación. (C) Se muestra la fluorescencia

media normalizada de las células marcadas. La fluorescencia media del receptor  $\beta$ 2adrenérgico se usó como control. Se observó una fluorescencia más fuerte cuando se expresaron diferentes OR con REEP1, RTP1 y/o RTP2. En contraste, cuando se usó el receptor VR4 y mT2R5 en lugar de los OR no se observó potenciación. (d) Se muestra un resumen del análisis FACS.

5 La Figura 3 muestra que REEP y/o RTP no estimulan la expresión en la superficie celular de VR4 y mT2R5 en células 293T. ADNC que codifica VR4 and mT2R5 se transfecaron con o sin REEP1, RTP1 y/o RTP2 Al contrario que los OR, no se observó un incremento de la tinción de los OR en la superficie celular en células que expresan estas proteínas. La expresión de BFP se muestra para demostrar una eficiencia de la transfección elevada (~70 %) de las células transfectadas con VR4. Usando los protocolos de tinción de células vivas se observan señales fluorescentes en la superficie celular como tinción puntual distintiva. La barra de escala equivale a 50 um.

10 La Figura 4 presenta datos de histogramas fluorescentes para la expresión de REEP1, RTP1, y RTP2 con receptor de olor (A) olfr62 y (B) mT2R5.

15 La Figura 5 muestra las familias de REEP y RTP . (A) Secuencia de aminoácidos deducida de REEP1. La barra sólida indica supuesta región transmembrana (TM). La primera región TM podía funcionar como péptido señal. (B) Árbol filogenético sin raíces de los miembros de la familia de REEP. Al menos 6 miembros de la familia de REEP (REEP1-6) se han identificado en el genoma de ratón. YOP1P de levadura, HVA22 de cebada y DP1 humana son homólogas a las proteínas REEP. (C) Secuencia de aminoácidos deducida de RTP1 y RTP2. La barra sólida indica un supuesto dominio transmembrana. Los aminoácidos sombreados se conservan entre 20 RTP1 y RTP2. Existen dos miembros más (RTP3 y 4) en el genoma de ratón.

20 La Figura 6 muestra la expresión de REEP1, RTP1 y RTP2 (A) Análisis de transferencia de tipo Northern. Se usó el ARN total para análisis de transferencia de tipo Northern. El epitelio olfativo, el órgano vomeronasal y el cerebro mostraron bandas ~3,6kb correspondientes al ARNm de REEP1. Solo los ARN del epitelio olfativo y el órgano vomeronasal mostraron bandas ~3,6kb y ~2,6kb correspondientes al ARNm de RTP1 y RTP2, respectivamente. La tinción con bromuro de etidio para el ARNr 18S se muestra como control. (B) Análisis de hibridación *In situ* en el epitelio olfativo. Entre los miembros de REEP, solo REEP1 se expresó específicamente en las neuronas olfativas. REEP6 se expresó en células de soporte. Entre los miembros de RTP, RTP1 y RTP2 se expresaron fuertemente en las neuronas olfativas. RTP4 también se expresó en las neuronas olfativas pero a un nivel mucho más bajo. OMP es un marcador de neuronas olfativas maduras. Un aumento mayor de REEP1, RTP1, y RTP2 sugiere que todas las neuronas olfativas pueden expresar las tres moléculas. Barra de escala 200 um (70 um en las imágenes con alto aumento). (C) Análisis *in situ* de REEP1 en el cerebro. REEP1 fue expresada por una subpoblación de células cerebrales. Barra de escala 200 um.

25 La Figura 7 muestra la asociación de receptores de olor con REEP1 y RTP1. (A) Análisis de transferencia de tipo western control que indica la expresión de MOR203-1 marcado con HA, REEP1 marcado con Flag, RTP1 e ICAP1 en células 293T. (B) Cuando se precipitó Flag- RTP1 o Flag-REEP1, coprecipitaron las proteínas HA-MOR203-1 (calles 1 y 2). No obstante, cuando se precipitó Flag- ICAP-1 (proteína control negativo) no se detectaron las proteínas HA-MOR203-1 (calle 3). (C) Cuando se precipitó HA-MOR203-1, se copurificaron Flag-RTP1 y Flag-REEP1, cuando se coexpresaron (calles 1 y 2). La proteína control negativo (Flag-ICAP-1) no se coprecipitó (Calle 3). Los asteriscos indican las proteínas Ig no específicas. (D) Se observó poca expresión en superficie celular cuando RTP1 se transfeció en células 293T. No obstante, cuando RTP1 y un receptor de olor (OREG) se cotransfectaron se observó más señal de tinción de RTP1.

30 (E) Se observó una pequeña cantidad de señal en superficie celular cuando REEP1 se transfeció en células 293T. La coexpresión de un OR (olfr62) no modificó la expresión de REEP1. La barra de escala equivale a 50 um.

35 La Figura 8 muestra que la expresión de REEP1, RTP1 o RTP 2 potencia la activación del receptor de olor. (A) Diagrama que muestra un elemento respondedor a AMPc (CRE) y luciferasa se usó para monitorizar la activación de los OR. La activación de OR aumenta el AMPc, que potencia la expresión del gen indicador de luciferasa a través de CRE. (B) Actividades normalizadas de la luciferasa  $\pm$  SEM (N=4). REEP1, RTP1 y RTP2, expresados en varias combinaciones junto con OREG, potenciaron las actividades de la luciferasa en comparación con el OR solo. (C) Actividades relativas de la luciferasa  $\pm$  SEM (N=4). OREG o OR-S46 se usaron para conocer si REEP1, RTP1, o RTP2 podían cambiar las especificidades de ligando de los OR. Para obtener la activación relativa de diferentes olores, la actividad de la luciferasa a 300uM de vanillina (OREG) o ácido decanoico (OR-S46) se consideró de 1 en cada condición de expresión. (D) Actividades normalizadas de la luciferasa  $\pm$  SEM (N=8). Respuesta potenciada en células Hana3A, una línea celular estable que expresa REEP1, RTP1, RTP2 y Golf, cuando se expresaron tres OR diferentes. (E) Ensayos con AMPc. Producción potenciada de AMPc a varias concentraciones de eugenol en células Hana3A cuando se transfeció OREG. En contraste, la producción de AMPc no fue diferente entre las células Hana3A y las células 293T que expresan G<sub>olf</sub> cuando el receptor  $\beta$ 2adrenérgico se transfeció y se usó isoproterenol.

40 La Figura 9 muestra análisis de RT-PCR de células Hana3A; + indica los productos de PCR usando muestras de ADN de células Hana3A como ADN molde; - indica los controles negativos sin transcriptasa inversa; M indica

el marcador de ADN.

La Figura 10 muestra la expresión en la superficie celular de receptores de olor en células Hana3A y 293T. Los ADNc que codifican tres OR (OREG, olfr62 y OR-S46) se transfecaron en células Hana3A o 293T. Se observó un incremento de la tinción en la superficie celular en células Hana3A. La barra de escala equivale a 50 um.

- 5 La Figura 11 muestra los perfiles de reconocimiento de receptores de olor por los olores. (A) A la izquierda se muestran los olores de ensayo. El color indica las actividades relativas de la luciferasa (N=4). Cada OR respondió a diferentes subpoblaciones de olores. (B) y (C) Actividades normalizadas de la luciferasa (N=4). Se usaron 139 sustancias químicas para la detección selectiva de MOR203-1 y olfr62. MOR203-1 respondió al ácido nonanoico. Olfr62 respondió a cinco compuestos aromáticos relacionados.
- 10 La Figura 12 muestra la expresión en la superficie celular de 8 receptores de olor en células Hana3A. La barra de escala equivale a 50 um.
- La Figura 13 muestra modelos de los papeles de REEP y/o RTP en la expresión de receptores de olor.
- 15 La Figura 14 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 1) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 21) para REEP1 murino- Referencia.
- 20 La Figura 15 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 2) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 22) para REEP2 murino- Referencia.
- La Figura 16 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 3) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 23) para REEP3 murino- Referencia.
- 25 La Figura 17 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 4) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 24) para REEP4 murino- Referencia.
- 30 La Figura 18 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 5) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 25) para REEP5 murino- Referencia.
- La Figura 19 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 6) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 26) para REEP6 murino- Referencia.
- 35 La Figura 20 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 7) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 27) para REEP1 humano- Referencia.
- La Figura 21 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 8) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 28) para REEP2 humano- Referencia.
- 40 La Figura 22 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 9) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 29) para REEP3 humano- Referencia.
- La Figura 23 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 10) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 30) para REEP4 humano- Referencia.
- La Figura 24 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 11) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 31) para REEP5 humano- Referencia.
- 45 La Figura 25 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 12) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 32) para REEP6 humano- Referencia.
- La Figura 26 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 13) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 33) para RTP1 murino.
- La Figura 27 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 14) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 34) para RTP2 murino.
- La Figura 28 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 15) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 35) para RTP3 murino- Referencia.
- La Figura 29 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 16) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 36) para RTP4 murino- Referencia.
- 50 La Figura 30 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 17) para RTP1-A1 humano y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 37) para RTP1 humano.
- La Figura 31 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARN) de SEC ID Nº 18) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 38) para RTP2 humano.

La Figura 32 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 19) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 39) para RTP3 humano- Referencia.

La Figura 33 muestra la secuencia de ácido nucleico (ARNm) de SEC ID Nº 20) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 40) para RTP4 humano- Referencia.

5 La Figura 34 muestra los patrones de activación de los receptores de olor humanos en respuesta a la exposición al agente odorífero.

La Figura 35 muestra esquemáticamente los segmentos de aminoácidos de RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, y RTP1-E (referencia) en comparación con RTP1.

La Figura 36 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-A ((SEC ID Nº 41), Referencia.

10 La Figura 37 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-B (SEC ID Nº 42), Referencia.

La Figura 38 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-C (SEC ID Nº 43), Referencia.

La Figura 39 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-D (SEC ID Nº 44), Referencia.

La Figura 40 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-E (SEC ID Nº 45), Referencia.

15 La Figura 41 muestra la expresión en la superficie celular de OLFR62 en células Hana3A y 293T. Los ADNc que codifican RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D y RTP1-E se transfecaron en células Hana3A o 293T. Se observó un incremento de la tinción en la superficie celular en células Hana3A y 293T que expresan RTP1-D.

20 La Figura 42 muestra esquemáticamente un ensayo de luciferasa usado para monitorizar la actividad de OLFR62. El elemento respondedor a AMPc (CRE) y la luciferasa se usaron para monitorizar la activación de OLFR62. La activación de OLFR62 aumenta el AMPc, que potencia la expresión del gen indicador de luciferasa a través de CRE.

La Figura 43 muestra la actividad de OLFR62 como indica la expresión de la luciferasa en células Hana3A y 293T. que expresan RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E y pCI como control. La Figura 44 muestra esquemáticamente los segmentos de aminoácidos de RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3 en comparación con RTP1-A y RTP1-D, respectivamente.

25 La Figura 45 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-A1 ((SEC ID Nº 46) y la secuencia de aminoácidos humana para RTP1-A1 (SEC ID Nº 47).

La Figura 46 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-D1 (SEC ID Nº 48), Referencia.

La Figura 47 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP-D2 (SEC ID Nº 49), Referencia.

La Figura 48 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP-D3 (SEC ID Nº 50).

30 La Figura 49 muestra la expresión en la superficie celular de OLFR62 en células 293T. Los ADNc que codifican RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3 y pCI como control se transfecaron en células 293T. Se observó un incremento de la tinción en la superficie celular en células 293T que expresan RTP1-A1, RTP1-D1 y RTP1-D3.

35 La Figura 50 muestra la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-1 como indica la expresión de la luciferasa en células 293T que expresan RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3, y pCI como control.

La Figura 51 muestra la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-1 como indica la expresión de la luciferasa en células Hana3A que expresan RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3, y pCI como control.

40 La Figura 52 muestra la expresión en la superficie celular de OLFR62, OREG, MOR203-1, S6, y 23-1 en células 293T cotransfectedas con RTP1, RTP1-A1 o pCI control. Los ADNc que codifican RTP1, RTP1-A1 y pCI como control se transfecaron en células.

La Figura 53 muestra esquemáticamente los segmentos de aminoácidos de RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6). Referencia.

45 La Figura 54 muestra la expresión en la superficie celular de un OR en células que expresan RTP1, RTP4, Quimera 1, Quimera 2, Quimera 3, Quimera 4, Quimera 5, Quimera 6, and control pCI. ADNc que codifican RTP1, RTP4, RTP1-A1, Quimera 1, Quimera 2, Quimera 3, Quimera 4, Quimera 5, Quimera 6, y pCI control se transfecaron en células 293T.

La Figura 55 muestra la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-1 como indica la expresión de la luciferasa en células 293T que expresan RTP1, RTP4, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, Quimera 1, Quimera 2, Quimera 3,

Quimera 4, Quimera 5, Quimera 6, y pCl control.

La Figura 56 muestra la detección de RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-A1, RTP1-D, Quimera 4, Quimera 5, RTP1-D3, RTP1-D1, Quimera 6, y RTP4 usando anti-RTP1.

### Definiciones

- 5 Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen una serie de términos.

Como se usa en el presente documento, el término “REEP”, cuando se usa en referencia a proteínas o ácido nucleico, se refiere a proteínas o ácidos nucleicos que codifican una proteína REEP de la presente invención El término REEP abarca tanto las proteínas que son idénticas a REEP silvestres (p. ej., REEP 1, REEP2, REEP3, REEP4, REEP5, y REEP6) como las que derivan de REEP silvestre (p. ej., variantes de polipéptidos de REEP de la presente invención). ““REEP” puede ser un ácido nucleico de REEP murino silvestre (ARNm) (p. ej., las SEC ID Nº 1-6) o un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos de REEP Murino silvestre (p. ej., las SEC ID Nº 21-26). ““REEP” puede ser un ácido nucleico de REEP humano silvestre (ARNm) (p. ej., las SEC ID Nº 7-12) o un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos de REEP humano silvestre (p. ej., las SEC ID Nº 27-32). Ejemplos de proteínas o ácidos nucleicos REEP incluyen, entre otros, REEP1, REEP2, REEP3, REEP4, REEP5 y REEP6.

Como se usa en el presente documento, el término “RTP”, cuando se usa en referencia a proteínas o ácido nucleico, se refiere a proteínas o ácidos nucleicos que codifican una proteína RTP de la presente invención El término RTP abarca tanto proteínas que son idénticas a los RTP silvestres (p. ej., RTP1, RTP2, RTP3, y RTP4) y las derivadas de RTP silvestre (p. ej., variantes de polipéptidos de RTP incluyendo, entre otros, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, o genes químéricos construidos con porciones de regiones de codificación de RTP1 (p. ej., RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), and RTP4-A1-D1 (Quimera 6)). En algunas realizaciones, “RTP” puede ser un ácido nucleico de RTP murino silvestre (ARNm) (p. ej., las SEC ID Nº 13-16) o un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos de RTP murino silvestre o variante (p. ej., las SEC ID Nº 33-36, 41-50). ““RTP” puede ser un ácido nucleico de RTP humano silvestre (ARNm) (p. ej., las SEC ID Nº 17-20) o un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos de RTP humano silvestre (p. ej., las SEC ID Nº 37-40). Ejemplos de proteínas o ácidos nucleicos de RTP incluyen, entre otros, RTP1, RTP2, RTP3, RTP4, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6).

30 Como se usa en el presente documento, “receptor de olor” se refiere a receptores de olor generados de neuronas sensoriales olfatorias. Ejemplos de receptores de olor incluyen, entre otros S6/79, S18, S46, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y MOR32-11.

Como usa en el presente documento, la expresión “localización en la superficie celular del receptor de olor” o términos equivalentes se refieren al transporte molecular de un receptor de olor a una membrana de superficie celular. Ejemplos de localización en la superficie celular incluyen, entre otros, localización en los cilios en la punta de una dendrita y localización en un terminal axónico.

Como usa en el presente documento, la expresión “expresión funcional del receptor de olor” o términos equivalentes hace referencia a una capacidad del receptor de olor para interaccionar con un ligando del receptor de olor (p. ej., una molécula odorífera).

40 Como usa en el presente documento, la expresión “trastorno olfativo”, “disfunción olfativa”, “enfermedad olfativa” o expresión similar hace referencia a un trastorno, disfunción o enfermedad que tiene como resultado una disminución de la sensación olfatoria (p. ej., aberración del olor). Ejemplos de trastornos olfativos, disfunciones olfativas y/o enfermedades olfativas incluyen, entre otros, traumatismos cerebrales, infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington. La disminución del sentido del olfato se clasifica como anosmia, ausencia de sentido del olfato; hiposmia, disminución del sentido del olfato; disosmia, distorsión del sentido del olfato; cacosmia – sensación de un olor malo o nauseabundo; y parosmia sentido del olfato en ausencia de un estímulo adecuado.

50 Como se usa en el presente documento, el término “REEP1”, cuando se usa en referencia a una proteína o ácido nucleico, se refiere a una proteína o ácido nucleico que codifica una proteína REEP1 de la presente invención El término REEP1 abarca tanto las proteínas que son idénticas a REEP1 silvestre como las que derivan de REEP1 silvestre (p. ej., variantes de REEP1 o genes químéricos construidos con porciones de regiones de codificación de REEP1). ““REEP1” puede ser un ácido nucleico de REEP1 murino silvestre (ARNm) (p. ej., las SEC ID Nº 1) o un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos murina silvestre (SEC ID Nº 21). ““REEP1” puede ser un ácido nucleico de REEP1 humano silvestre (ARNm) (SEC ID Nº 7) o un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos REEP 1 humano (SEC ID Nº 27). ““REEP1” puede ser un ácido nucleico o aminoácido variante o mutante.

- Como se usa en el presente documento, el término "RTP1", cuando se usa en referencia a una proteína o ácido nucleico, se refiere a una proteína o ácido nucleico de RTP1 que codifica una proteína RTP1 que es idéntica a RTP1 silvestre. "RTP1" puede ser un ácido nucleico de RTP1 murino silvestre (ARNm) (SEC ID Nº 13) o una secuencia de aminoácidos murina silvestre (SEC ID Nº 33) o "RTP1" es la secuencia de aminoácidos RTP 1 humano silvestre (SEC ID Nº 37).
- Como se usa en el presente documento, el término "RTP2", cuando se usa en referencia a una proteína o ácido nucleico, se refiere a una proteína o ácido nucleico de RTP2 que codifica una proteína RTP1 que es idéntica a RTP2 silvestre.
- "RTP2" puede ser un ácido nucleico de RTP2 murino silvestre (ARNm) (SEC ID Nº 14) o la secuencia de aminoácidos murina silvestre (SEC ID Nº 34). En otras realizaciones, "RTP2" puede ser un ácido nucleico de RTP2 humano silvestre (ARNm) (SEC ID Nº 18) o una secuencia de aminoácidos de RTP2 humana silvestre (SEC ID Nº 38).
- Como se usa el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" hacen referencia a cualquier animal, tal como un mamífero como un perro, gato, ave, ganado y, preferentemente, un ser humano. Ejemplos específicos de "sujetos" y "pacientes" incluyen, entre otros, individuos con un trastorno olfativo, e individuos con características o síntomas relacionados con un trastorno olfativo.
- Como se usa en el presente documento, la expresó "síntomas de un trastorno olfativo" y "características de un trastorno olfativo" incluyen, entre otros, una disminución del sentido del olfato (p. ej., aberración del olor).
- La expresión "en condiciones tales que los síntomas se reducen" hace referencia a cualquier grado de reducción cualitativa o cuantitativa en síntomas detectables de trastornos olfativos, incluyendo, entre otros, un impacto detectable sobre la tasa de recuperación de la enfermedad o la reducción de al menos un síntoma de un trastorno olfativo.
- El término "ARNsi" se refiere ARN de interferencia cortos. Los procedimientos de uso de los ARNsi se describen en la solicitud de patentes de EE.UU. Nº Nº: 20030148519/A1 En algunas realizaciones, los ARNsi comprenden una región dúplex, o bicatenaria, de aproximadamente 18-25 nucleótidos de longitud; a menudo los ARNsi contienen de aproximadamente dos a cuatro nucleótidos sin aparear en el extremo 3' de cada hebra. Al menos una hebra de la región dúplex o bicatenaria de un ARNsi es sustancialmente homóloga a o sustancialmente complementaria a una molécula de ARN diana. La hebra complementaria a una molécula de ARN diana es la "hebra antisentido". La hebra homóloga a la molécula de ARN diana es la "hebra sentido" y también es complementaria a la hebra antisentido del ARNsi. Los ARNsi pueden también contener secuencias adicionales; ejemplos no limitantes de dichas secuencias incluyen secuencias de unión, o bucles, así como una estructura troncal y otras plegadas. Los ARNsi parecen funcional como intermediarios clave en el desencadenamiento del ARN de interferencia en invertebrados y en vertebrados y en el desencadenamiento de la degradación de ARN específica de secuencia durante la silenciación génica postranscripcional en plantas.
- La expresión "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere a la silenciación o disminución de la expresión génica por parte de ARNsi. Es el proceso de silenciación génica específica de secuencia postranscripcional en animales y plantas, iniciado por ARNsi homólogo en su región dúplex a la secuencia del gen silenciado. El gen puede ser endógeno o exógeno al organismo, estar presente integrado en un cromosoma o presente en un vector de transcripción que no está integrado en el genoma. La expresión del gen se inhibe completa o parcialmente. El ARNi también se puede considerar que inhibe la función de un ARN diana; la función del ARN diana puede ser completa o parcial.
- Como se usa en el presente documento, los términos "instrucciones" para usar dicho kit para dicha detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico o polipéptido variante de REEP1 en dicha muestra biológica, "instrucciones para usar dicho kit para dicha detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico o polipéptido variante de RTP1 en dicha muestra biológica", "instrucciones para usar dicho kit para dicha detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico o polipéptido variante de RTP2 en dicha muestra biológica" incluyen instrucciones para usar los reactivos contenidos en el kit para la detección de ácidos nucleicos o polipéptidos de REEP y/o RTP variantes y silvestres.
- El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (p. ej., ADN), que comprende secuencias de codificación necesarias para la producción de un polipéptido, ARN (p. ej., entre otros, ARNm, ARNr y ARNr) p precursor (p. ej., REEP1, RTP1 o RTP2). El polipéptido, ARN o precursor puede estar codificado por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia de codificación siempre se conserven la actividad deseada o las propiedades funcionales (p. ej., actividad enzimática, unión del ligando, transducción de la señal, etc.) de la longitud completa o del fragmento. El término también abarca la región de codificación de un gen estructural y las secuencias que incluye localizadas adyacentes a la región de codificación en los extremos tanto 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb en cualquier extremo de modo que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región de codificación y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en 3' o cadena abajo de la región de codificación y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El

término "gen" abarca tanto ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clón de un gen contiene la región de codificación interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe a ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores, como los potenciadores. Los intrones se eliminan o "cortan" del tránscribo nuclear o primario; por tanto, los intrones no están en el tránscribo de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u ordenar los aminoácidos en un polipéptido naciente.

En concreto, la expresión "gen de REEP1", "gen RTP", "gen de RTP1", "gen de RTP2," o "genes de RTP2" se refiere a la longitud completa respecto a las secuencias nucleotídicas de REEP y/o RTP (p. ej., contenida en las SEC ID Nº 1, 2 y 3). No obstante, también se pretende que el término abarque fragmentos de las secuencias de REEP y/o RTP (p. ej., RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, and RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3), genes quiméricos construidos con porciones de las regiones de codificación de RTP1 (p. ej., (RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6)), mutantes de las secuencias de REEP y/o RTP, así como otros dominios dentro de las secuencias de nucleótidos de REEP y/o RTP de longitud completa. Además, las expresiones "secuencia de nucleótidos de REEP1", "secuencia de polinucleótidos de REEP1", "secuencia de nucleótidos de RTP1", "secuencia de polinucleótidos de RTP1", "secuencia de nucleótidos de RTP2", "secuencia de polinucleótidos de RTP2", abarca secuencias de ADN, secuencias de ADNc, secuencias de ARN (p. ej., ARNm) y secuencias reguladoras asociadas.

Cuando en el presente documento se cita "secuencia de aminoácidos" para hacer referencia a una secuencia de aminoácidos de una molécula proteica natural, con "secuencia de aminoácidos" y términos similares, tales como "polipéptido" o "proteína" no se pretende limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula proteica citada.

Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas en ambos extremos, 5' y 3', de las secuencias presentes en el tránscribo de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan en 5' o 3' de las secuencias no traducidas presentes en el transcripto de ARN.). La región flanqueante en 5' puede contener secuencias reguladoras, tales como promotores y potenciadores, que controlen o influyan sobre la transcripción del gen. La región flanqueante en 3' puede contener secuencias que dirijan la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

La expresión "de tipo silvestre" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísle de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es el que se observa más frecuentemente en una población y, por lo tanto, se denomina arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen. Por el contrario, los términos "modificado", "mutante", "polimorfismo" y "variante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico silvestre. Cabe destacar que se pueden aislar mutantes de origen natural; los mismos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se compararon con el gen o producto génico de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de ácido nucleico codificante", "secuencia de ADN codificante" y "ADN codificante" se refieren a el orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una hebra de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). Por tanto, la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

Se dice que las moléculas de ADN tienen extremos "5'" y extremos "3'" porque los mononucleótidos reaccionan para fabricar oligonucleótidos o polinucleótidos de un modo tal que el 5'fosfato de un anillo mononucleótido fosfato está unido al oxígeno en 3' de su vecino en una dirección mediante un enlace fosfodiéster. Por tanto, un extremo de un oligonucleótido o polinucleótido, al que se hace referencia como "extremo 5'" si su fosfato en 5' no está unido al oxígeno en 3' de un anillo pentosa de mononucleótido y como "extremo 3'" si su oxígeno en 3' no está unido a un fosfato en 5' de un anillo pentosa de mononucleótido posterior. Como se usa en el presente documento, también se puede decir que una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna a un oligonucleótido más grande, también tiene extremos 5' y 3'. En una molécula de ADN lineal o circular, se hace referencia a los elementos pequeños estando "cadena arriba" o en 5' de los elementos "cadena abajo" o en 3'. Esta terminología refleja el hecho de que la transcripción progresó en dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra de ADN. El promotor y los elementos potenciadores que dirigen la transcripción de un gen ligado se localizan, en general, en 5' o cadena arriba de la región de codificación. No obstante, los elementos potenciadores pueden ejercer su efecto incluso cuando se localizan en 4' del elemento promotor y la región de codificación. Las señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación se localizan en 3' o cadena debajo de la región de codificación.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" y "polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" significan una secuencia de ácido nucleico que comprende la región de codificación de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. La región de codificación puede estar presente en una forma de

- ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario (es decir, la hebra sentido) o bicatenario. Elementos de control adecuados, tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación etc., pueden colocarse cerca de la región de codificación del gen si es necesario para permitir el inicio adecuado de la transcripción y/o el correcto procesamiento del transcripto de ARN primario. Como alternativa, la región de codificación usada en los vectores de expresión de la presente invención puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias intermedias, señales de poliadenilación etc., o una combinación de elementos de control tanto endógenos como exógenos.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "elemento regulador" se refiere a un elemento genético que controla algún aspecto de la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor es un elemento regulador que facilita la iniciación de la transcripción de una región de codificación unida operablemente. Otros elementos reguladores incluyen señales de corte y empalme, señales de poliadenilación, señales de terminación etc.
- Como se usa en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, para la secuencia 5'-A-G-T-3" es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5." La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases nucleotídicas están apareadas de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos. La complementariedad puede incluir la formación de pares de bases entre cualquier tipo de nucleótidos, incluyendo bases no naturales, bases modificadas, bases sintéticas y similares.
- El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente complementaria con un ácido nucleico diana y se denomina usando la expresión funcional "sustancialmente homólogo". La expresión "inhibición de la unión", cuando se usa en referencia a la unión del ácido nucleico, se refiere a la inhibición de la unión debido a la competición de las secuencias homólogas por la unión a una secuencia diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana se puede analizar usando un ensayo de hibridación (de transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de rigurosidad baja. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una completamente homóloga a una diana en condiciones de rigurosidad baja. Cabe mencionar que las condiciones de rigurosidad baja son tales que se permite la unión inespecífica; las condiciones de rigurosidad baja requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión inespecífica puede analizarse mediante el uso de una segunda diana que carece de incluso un grado parcial de complementariedad (es decir, una identidad inferior a aproximadamente el 30 %); en ausencia de unión inespecífica, la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.
- En la técnica se sabe que se pueden emplear numerosas condiciones equivalentes para comprender condiciones de rigurosidad baja; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición en bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición en bases, presente en solución o inmovilizados etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (p. ej., la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la solución de hibridación se puede variar para generar condiciones de hibridación de rigurosidad baja diferentes, pero equivalentes, de las condiciones enumeradas anteriormente. Además, en la técnica se conocen condiciones que estimulan la hibridación en condiciones de rigurosidad alta (p. ej., incrementar la temperaturas de la hibridación y/o etapas de lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación etc.).
- Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico bicatenario, tal como un ADNc o clon genómico, la expresión "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con una o ambas hebras de la secuencia de ácido nucleico bicatenario en condiciones de baja rigurosidad, como se ha descrito anteriormente.
- Un gen puede producir múltiples especies de ARN que se generan mediante corte y empalme diferencial del tránscribo de ARN primario. Los ADNc que son variantes de corte y empalme del mismo gen contendrán regiones de identidad de secuencia u homología completa (que representan la presencia del mismo exón o porción del mismo exón sobre ambos ADNc) y regiones de no identidad completa (por ejemplo, que representan la presencia del exón "A" sobre el ADNc 1 en el que el ADNc2 contiene el exón "B" en su lugar). Dado que los dos ADNc contienen regiones de identidad de secuencia, ambos hibridarán con una sonda que proceda de todo el gen o de porciones del gen que contienen secuencias encontradas en ambos ADNc; las dos variantes de corte y empalme son, por tanto, sustancialmente homólogas a dicha sonda y entre sí.
- Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenario, la expresión "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar (es decir, es la complementaria de) con la secuencia de ácido nucleico bicatenario en condiciones de baja rigurosidad, como se ha descrito anteriormente.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "compite por la unión" se usa en referencia a un primer

- polipéptido con una actividad que se une al mismo sustrato que un segundo polipéptido con una actividad, en la que el segundo polipéptido es una variante del primer polipéptido o un polipéptido diferente o relacionado. La eficiencia (p. ej., cinética o termodinámica) de la unión por el primer polipéptido puede ser igual o mayor o menor que la eficiencia de la unión del sustrato por el segundo polipéptido. Por ejemplo, la constante de unión en el equilibrio ( $K_D$ ) para la unión al sustrato puede ser diferente para los dos polipéptidos. El término "Km" como se usa en este documento se refiere a la constante de Michaelis-Menten para una enzima se define como la concentración del sustrato específico a la que una enzima dada produce la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzima.
- Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa con referencia al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) están influidas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos), la rigurosidad de las condiciones implicadas y la  $T_m$  del híbrido formado y la proporción G:C dentro de los ácidos nucleicos.
- Como se usa en el presente documento, el término " $T_m$ " se usa con referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que la población de moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocia a la mitad en hélices únicas. La ecuación para calcular la  $T_m$  de ácidos nucleicos. Como se indica por referencias convencionales, una estimación simple del valor  $T_m$  se puede calcular con la ecuación:  $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$ , cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a NaCl 1 M (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales, así como características de secuencia para el cálculo de  $T_m$ .
- Como se usa en el presente documento, el término "rigurosidad" se usa con referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y presencia de otros compuestos, tales como disolventes orgánicos, en las que se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. Los expertos en la técnica reconocerán que condiciones de "rigurosidad" se pueden alterar variando los parámetros que se acaban de describir individualmente o en conjunto.
- En condiciones de "alta rigurosidad", el emparejamiento de bases de ácidos nucleicos tendrá lugar solamente entre fragmentos de ácido nucleico que tienen una alta frecuencia de secuencias de bases complementarias (p. ej., hibridación en condiciones de "alta rigurosidad" se puede producir entre homólogos con una identidad de aproximadamente el 85 – 100 %, preferentemente una identidad de aproximadamente el 70 – 100 %). En condiciones de "rigurosidad media", el emparejamiento de bases de ácidos nucleicos tendrá lugar entre ácidos nucleicos con una frecuencia intermedia de las secuencias de bases complementarias (p. ej., la hibridación en condiciones de "rigurosidad media" se puede producir entre homólogos con una identidad de aproximadamente el 50 – 70 %). Por tanto, a menudo se requieren condiciones de rigurosidad "débil" o "baja" con ácidos nucleicos que derivan de organismos que son genéticamente diversos, ya que la frecuencia de las secuencias de complementariedad suele ser menor.
- "Condiciones de rigurosidad alta", cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5 % de SDS, 5X reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón seguido de lavado en una solución que comprende 0,1X SSPE, 1,0 % SDS a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.
- "Condiciones de rigurosidad media", cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5 % de SDS, 5X reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón seguido de lavado en una solución que comprende 1,1X SSPE, 1,0 % SDS a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.
- "Condiciones de rigurosidad baja" comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,1 % SDS, 5X reactivo de Denhardt (50X reactivo de Denhardt contiene por 500 ml: 5 g de Ficoll (Tipo400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fracción V; Sigma) y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una solución que comprende 5X SSPE, 0,1 % SDS a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.
- La presente descripción no se limita a la hibridación de sondas de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. La presente descripción contempla el uso de sondas de entre aproximadamente 10 nucleótidos hasta varios miles (p. ej., al menos 5.000) nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica entiende que las condiciones de rigurosidad se pueden alterar para las sondas de otros tamaños (véase, por ejemplo, Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, en Nucleic Acid Hybridization [1985] y Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY [1989]).
- Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos. "secuencia de referencia", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias;

una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo como segmento de una secuencia de ADNc de longitud completa dada en un listado de secuencias o puede comprender una secuencia génica completa. En general, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos, con frecuencia una longitud de al menos 25 nucleótidos, y a menudo una longitud de al menos 50 nucleótidos. Dado que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos y (2) puede además comprender una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos normalmente se realizan comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en el que una secuencia de polinucleótidos se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación como la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima se secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante el logaritmo de homología local de Smith y Waterman [Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)] mediante el algoritmo de alineación de la homología de Needleman y Wunsch [Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)], mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman [Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988)], mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package, versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que tiene como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada mediante los diversos procedimientos. La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, U o I) se produce en ambas secuencias, para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de las posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Las expresiones "identidad sustancial" como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia de polinucleótidos, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, con frecuencia sobre una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia del polinucleótido que puede incluir delecciones o adiciones que totalizan un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo como un segmento de las secuencias de longitud completa de las composiciones descritas en el presente documento (p. ej., REEP1, RTP1 o RTP2)

Como se aplica a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas ópticamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de huecos por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 80 %, preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 90 %, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más (p. ej., una identidad de secuencia del 99 por ciento). Preferentemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos hacen referencia a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos preferidos para la sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

El término "fragmento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una delección en el amino terminal y/o el carboxi terminal en comparación con la proteína nativa, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las correspondientes posiciones en la secuencia de aminoácidos deducida de una secuencia de ADNc de longitud completa. Normalmente, los fragmentos tienen una longitud de al menos 4 aminoácidos, preferentemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, normalmente una longitud de al menos 50 aminoácidos o mayor, y abarcan la porción del polipéptido requerida para la unión intermolecular de las composiciones (reivindicadas en la presente invención) con sus diversos ligandos y/o sustratos.

La expresión "locus polimórfico" es un locus presente en una población que muestra variación entre miembros de la población (p. ej., el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0,95). Por el contrario, un "locus monomórfico" es un locus genético con pocas o sin variaciones observadas entre miembros de la población (generalmente se asume que es un locus en el que el alelo más común supera una frecuencia de 0,95 en el grupo de genes de la población).

Como se usa en el presente documento, la expresión "información de variación genética" o "información de variante genética" hace referencia a la presencia o ausencia de una o más secuencias de ácido nucleico variantes (p. ej., polimorfismo o mutaciones) en un alelo dado de un gen concreto (p. ej., un gen de REEP y/o RTP).

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "ensayo de detección" hace referencia a un ensayo para detectar la presencia o ausencia de secuencias de ácido nucleico variantes (p. ej., polimorfismos o mutaciones) en un alelo dado de un gen concreto (p. ej., un gen de REEP y/o RTP).

La expresión "natural", como se usa en el presente documento aplicada a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos virus) que se pueden aislar de una fuente de la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio es natural.

10 "Amplificación" es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica especificidad de molde. Se tiene que contrastar con replicación inespecífica del molde (es decir, replicación dependiente de molde pero no dependiente de un molde específico). En el presente documento, especificidad de molde se distingue de fidelidad de la replicación (es decir, síntesis de la secuencia de polinucleótidos adecuada) y especificidad de nucleótidos (ribo o desoxirribo). La especificidad de molde con frecuencia se describe en términos de especificidad de "diana". Las secuencias diana son "dianas" en el sentido de que se buscar separarlas de otros ácidos nucleicos. Las técnicas de amplificación se han diseñado principalmente para esta ordenación.

15 Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se introduce en las condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario a una hebra de ácido nucleico, se induce, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. Preferentemente, el dejador es monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación, pero, como alternativa, puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar las hebras antes de usar para preparar productos de extensión.

20 Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirubonucleótido. El dejador debe ser lo bastante largo como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluidos la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento.

25 Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sean naturales como en un digesto de restricción purificado, o producidos de forma sintética, de forma recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser bicatenaria o monocatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas concretas. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente descripción esté marcada con cualquier "molécula indicadora", de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluidos, entre otros, enzimas (p. ej., ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), sistemas fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente descripción esté limitada a ningún sistema de detección o marcador concreto.

30 Como se usa en el presente documento, el término "diana" se refiere a una secuencia o estructura de ácido nucleico que se va a detectar o caracterizar. Por tanto, se busca separar la "diana" de otras secuencias de ácido nucleico. Un "segmento" se define como una región de ácido nucleico dentro de la secuencia diana.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "reactivos de amplificación" se refiere a los reactivos (desoxirribonucleótidos trifosfato, tampón, etc.) necesarios para la amplificación excepto los cebadores, molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación junto con otros componentes de reacción se colocan y contienen en un vaso de reacción (tubo de ensayo, micropocillo etc.).

40 Como se usa en el presente documento, las expresiones "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ADN recombinante" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que está comprendida por segmentos de ADN unidos entre sí mediante técnicas de biología molecular.

50 Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa con referencia a secuencias de ARN que son complementarias a una secuencia de ARN específica (p. ej., ARNm). Incluidas en esta definición son moléculas de ARN antisentido ("ARNas") implicadas en la regulación génica por las bacterias. El ARN antisentido se puede producir por cualquier procedimiento, incluida la síntesis mediante corte y empalme del o los genes de interés en una orientación inversa a un promotor viral que permite la síntesis de una hebra de codificación. Una vez introducida en un embrión, esta hebra transcrita se combina con el ARNm natural producido por el embrión para formar dúplex. Estos dúplex bloquean después la transcripción posterior del ARNm o su traducción. De este modo se pueden generar fenotipos mutantes. La expresión "hebra antisentido" se usa en referencia a una hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra "sentido". La designación (-) (es decir, "negativa") en ocasiones se usa en

referencia a la hebra antisentido, usándose a veces la designación (+) en referencia a la hebra sentido (es decir, "positiva").

El término "aislado", cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un ácido

5 nucleico contaminante con el que normalmente se asocia en su forma natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o contexto que es diferente del que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, presentes en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN diana (p. ej., un gen) se encuentra en los cromosomas de células huésped en proximidad a los genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARN, específica 10 que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros numerosos ARN, que codifican una multitud de proteínas. No obstante, el ácido nucleico aislado que codifica REEP y/o RTP incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que habitualmente expresan REEP y/o RTP cuando el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales o, por otro lado, está flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente de la encontrada en la naturaleza. El ácido nucleico, 15 oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando un ácido nucleico oligonucleótido o polinucleótido aislado se va a usar para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la hebra sentido o de codificación (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener las hebras sentido y antisentido (Es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

20 Como se usa en el presente documento, una "porción de un cromosoma" se refiere a una pequeña sección del cromosoma. Los citogenetistas dividen los cromosomas en sitios o secciones del siguiente modo: el brazo corto (con respecto al centrómero) de un cromosoma se denomina el brazo "p"; el brazo largo se denomina el brazo "q". Después, cada brazo se divide en 2 regiones denominadas región 1 y región 2 (la región 2 es la más cercana al centrómero). Cada región se divide además en bandas. Las bandas se pueden dividir después en sub-bandas. Por 25 ejemplo, la porción 11p15.5 del cromosoma 11 humano es la porción que se localiza en el cromosoma 11 (11) del brazo corto (p) en la primera región (1) en la quinta banda (5) en la sub-banda 5 (.5). Una porción de un cromosoma se puede "alterar", por ejemplo la totalidad de la porción puede estar ausente debido a una delección o puede reorganizarse (p. ej., inversiones, translocaciones, expandirse o contraerse debido a cambios en las regiones de repetición). En el caso de una delección, un intento de hibridar (es decir, unirse específicamente) una sonda 30 homóloga con una porción concreta de un cromosoma podría tener como resultado un resultado negativo (es decir, la sonda no podría unirse a la muestra que contiene material genético del que se sospecha que contiene la porción que falta del cromosoma). Por tanto, la hibridación de una sonda homóloga a una porción concreta de un cromosoma se puede usar para detectar alteraciones en una porción de un cromosoma.

35 La expresión "secuencias asociadas con un cromosoma" significa preparaciones de cromosomas (p. ej., extensiones de cromosomas en metafase), ácido nucleico extraído de una muestra que contiene ADN cromosómico (p. ej., preparaciones de ADN genómico); el ARN que se produce mediante transcripción de genes localizados en un cromosoma (p. ej., ARNh y ARNm) y copias de ADNc del ARN transcripto del ADN localizado sobre un cromosoma. Las secuencias asociadas con un cromosoma se pueden detectar mediante numerosas técnicas, incluida el sondaje 40 de transferencias Southern y Northern, e hibridación *in situ* a ARN, ADN o cromosomas en metafase con sondas que contienen secuencias homólogas con los ácidos nucleicos en las preparaciones indicadas anteriormente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región de codificación", cuando se usa en referencia a un gen estructural, se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos encontrados en el polipéptido naciente como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región de codificación está unida, en eucariotas, en el lado 5' por el triplete de nucleótidos "ATG" que codifica el iniciador metionina y en el lado 3' por uno 45 de los tres tripletes que especifican codones de terminación (es decir, TAA, TAG, TGA).

Como se usa en este documento, el término "purificado" o "para purificar" se refiere a la retirada de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos de REEP y/o RTP se purifican mediante eliminación de proteínas no inmunoglobulínicas contaminantes; también se purifican mediante eliminación de inmunoglobulina que no se une a un polipéptido de REEP y/o RTP. La eliminación de proteínas no inmunoglobulínicas y/o la eliminación de 50 inmunoglobulinas que no se unen a un polipéptido de REEP y/o RTP tienen como resultado un incremento en el porcentaje de las inmunoglobulinas reactivas a REEP1, RTP1 o RTP2 en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes de REEP y/o RTP se expresan en células huésped bacterianas y los polipéptidos se purifican mediante la eliminación de proteínas de célula huésped; de este modo se incrementa el porcentaje los de polipéptidos recombinantes en la muestra.

55 La expresión "molécula de ADN recombinante" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que está comprendida por segmentos de ADN unidos entre sí mediante técnicas de biología molecular.

La expresión "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" como se usa en este documento se refiere a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante.

60 La expresión "proteína nativa", como se usa en el presente documento, se usa para indicar que una proteína no contiene residuos de aminoácidos codificados por secuencias de vectores; es decir, la proteína nativa contiene

únicamente los aminoácidos encontrados en la proteína como se encuentran en la naturaleza. Una proteína nativa se puede producir por medios recombinantes o se puede aislar de una fuente natural.

Como se usa en este documento, el término "parte" cuando se hace referencia a una proteína (como en "una parte de una proteína dada") se refiere a fragmentos de esa proteína. El tamaño de los fragmentos puede variar desde

5 cuatro restos aminoacídicos consecutivos a toda la secuencia de aminoácidos menos un aminoácido.

La expresión "transferencia Southern" se refiere al análisis de ADN en geles de agarosa o de acrilamida para fraccionar el ADN de acuerdo con el tamaño, seguido de transferencia del ADN del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Después, el ADN inmovilizado se sonda con una sonda marcada para detectar especies de ADN complementarias a la sonda usada. El ADN se puede escindir con enzimas de restricción antes de la electroforesis. Tras la electroforesis, el ADN se puede despurinar y desnaturizar parcialmente antes o durante la transferencia al soporte sólido. Las transferencias Southern son una herramienta estándar de los biólogos moleculares (J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, pp 9,31-9,58 [1989]).

10 La expresión "transferencia Northern", como se usa en el presente documento, se refiere al análisis de ARN mediante la electroforesis de ARN en geles de agarosa para fraccionar el ARN de acuerdo con el tamaño, seguido de transferencia del ARN del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Después, el ARN inmovilizado se sonda con una sonda marcada para detectar especies de ARN complementarias a la sonda usada. Las transferencias Northern son una herramienta estándar de los biólogos moleculares (J. Sambrook y col., anteriormente, pág. 7,39-7,52: [1989]).

15 La expresión "transferencia Western" se refiere al análisis de proteína(s) (o polipéptidos) inmovilizadas sobre un soporte tal como nitrocelulosa o una membrana. Las proteínas se pasan por los geles de acrilamida para separar las proteínas, seguido de transferencia de la proteína del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Después, las proteínas inmovilizadas se exponen a anticuerpos que tiene reactividad contra un antígeno de interés. La unión de los anticuerpos se puede detectar por varios procedimientos, incluido el uso de

20 anticuerpos radiomarcados.

25 La expresión "determinante antigénico", como se usa en el presente documento, se refieren a la porción del antígeno que entra en contacto con un anticuerpo concreto (es decir, un epítopo). Cuando una proteína o fragmento de una proteína se usa para inmunizar un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional sobre la proteína; estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigenicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el "inmunógeno" usado para producir la respuesta inmunitaria) para unirse a un anticuerpo.

30 El término "transgen", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen extraño, heterólogo o autólogo que se introduce en un organismo no humano introduciendo el gen en embriones recién fertilizados o en embriones en fase temprana. La expresión "gen extraño" se refiere a cualquier ácido nucleico (p. ej., una secuencia génica) que se introduce en el genoma de un animal mediante manipulaciones experimentales y puede incluir secuencias génicas encontradas en dicho animal siempre que el gen introducido no resida en la misma localización que el gen natural. Con la expresión "gen autólogo" se pretende abarcar variantes (p. ej., polimorfismos o mutantes) del gen natural. Por tanto, el término transgen abarca la sustitución del gen natural con una forma variante del gen.

35 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se usa con referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra. El término "vehículo" se usa, en ocasiones, de forma intercambiable con "vector".

40 La expresión "vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de codificación deseada y secuencias de ácido nucleico adecuadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación unida operablemente en un organismo huésped concreto. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas normalmente incluyen un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación y de terminación.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula huésped" se refiere a cualquier célula eucariótica o procariótica (p. ej., células bacterianas tal como *E. coli*, células de levadura, células de mamífero, células de ave, células de anfibio, células vegetales, células de peces y células de insecto), localizadas *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células huésped se pueden localizar en un animal transgénico.

50 Los términos "sobreexpresión" y "que sobreexpresa" y sus equivalentes gramaticales se usan en referencia a niveles de ARNm para indicar un nivel de expresión aproximadamente 3 veces mayor que lo que normalmente se observa en un tejido dado en un animal control o no transgénico. Los niveles de ARNm se miden usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas por los expertos en la técnica incluyendo, entre otros, análisis de transferencia Northern (véase el Ejemplo 10, para un protocolo de realización de análisis de transferencia Northern).

El término “transfección”, como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de ADN extraño en células eucariotas. La transfección se puede acompañar de varios medios conocidos en la técnica, incluidos coprecipitación de fosfato cálcico-ADN, transfección mediada por DEAE dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección con retrovirus y biolística.

5 La expresión “transfección estable” o “transfectado de forma estable” se refiere a la introducción e integración de ADN extraño en el genoma de la célula transfectada. La expresión “transfectante estable” se refiere a una célula que ha integrado de forma estable el ADN extraño en el ADN genómico.

10 La expresión “transfección transitoria” o “transfectado de forma transitoria” se refiere a la introducción de ADN extraño en una célula en la que el ADN extraño no se integra en el genoma de la célula transfectada. El ADN extraño se queda en el núcleo de la célula transfectada durante varios días. Durante este tiempo, el ADN extraño está sujeto a los controles reguladores que gobiernan la expresión de genes endógenos en los cromosomas. La expresión “transfectante transitorio” se refiere a una célula que han captado ADN extraño pero que han integrado este ADN.

15 La expresión “coprecipitación con fosfato cálcico” se refiere a una técnica para la introducción de ácidos nucleicos en una célula. La captación de ácidos nucleicos por las células se potencia cuando el ácido nucleico se presenta como coprecipitado de ácido nucleico en fosfato cálcico. La técnica original de Graham y de van der Eb (Graham y van der Eb, Virol., 52:456 [1973]), ha han modificado varios grupos para optimizar las condiciones para tipos de células concretos. La técnica conocen bien estas numerosas modificaciones.

20 Una “composición que comprende una secuencia de polinucleótidos dada”, como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier composición que contiene la secuencia de polinucleótidos dada. La composición puede comprender una solución acuosa. Las composiciones que comprenden secuencias polinucleotídicas que codifican REEP1, RTP1 o RTP2 (p. ej., SEC ID Nº 1, 2 y 3) o fragmentos de las mismas se pueden usar como sondas de hibridación. En este caso, las secuencias polinucleotídicas que codifican REEP y/o RTP normalmente se usan en una solución acuosa que contienen sales (p. ej., NaCl), detergentes (p. ej., SDS) y otros componentes (p. ej., solución de Denhardt, leche seca, ADN de esperma de salmón etc.).

25 La expresión “compuesto de ensayo” se refiere a cualquier entidad química, sustancia farmacéutica, fármaco y similares que se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad, patología, afección o trastorno de la función corporal o, de otro modo, para alterar el estado fisiológico o celular de una muestra. Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Se puede determinar que un compuesto de ensayo es terapéutico mediante detección selectiva usando procedimientos de detección selectiva de la presente descripción. Un “compuesto terapéutico conocido” se refiere a un compuesto terapéutico que se ha demostrado (p. ej., mediante ensayos con animales o experiencia previa con administración a seres humanos) que es eficaz en dicho tratamiento o prevención.

30 35 El término “muestra” como se usa en el presente documento se utiliza en su sentido más amplio. Una muestra que se sospecha que contiene un cromosoma humano o secuencias asociadas con un cromosoma humano puede comprender una célula, cromosomas aislados de una célula (p. ej., una extensión de cromosomas en metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido tal como, por ejemplo, análisis de transferencia Southern), ARN (en solución o unido a un soporte sólido tal como, por ejemplo, análisis de transferencia Nothern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido) y similares. Una muestra que se sospecha que contiene una proteína puede comprender una célula una porción de tejido, un extracto que contiene una o más proteínas y similares.

40 Como se usa el presente documento, el término “respuesta”, cuando se usa en referencia a un ensayo, se refiera a la generación de una señal detectable (p. ej., acumulación de proteína indicadora, incremento de la concentración de iones, acumulación de un producto químico detectable).

45 50 Como se usa en el presente documento, “gen indicador” se refiere a un gen que codifica una proteína que se puede someter a ensayo. Ejemplos de genes indicadores incluyen, entre otros, luciferasa (véase, por ejemplo, de Wet y co., Mol. Cell. Biol. 7:725 [1987] y las patentes de EE.UU. Nº 6,074,859; 5,976,796; 5,674,713; y 5,618,682), la proteína fluorescente verde (p.ej., número de registro en GenBank U43284; una serie de variantes de GFP están disponibles comercialmente en CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA), cloranfenicol acetiltransferasa, β-galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano.

### Descripción general

55 El continuo progreso de la comprensión de la codificación del olfato se ha visto dificultado por la incapacidad de expresar funcionalmente OR en células heterólogas con el fin de identificar ligandos afines. Para superar este problema, experimentos realizados durante el curso de la presente invención han buscado moléculas incluidas en la expresión de superficie celular de OR. Se han identificado tres proteínas transmembrana REEP1, RTP1, and RTP2, así como variantes de las mismas, que estimulan la expresión funcional en la superficie celular de OR en células 293T. REEP y/o RTP se expresan específicamente en las neuronas olfativas en el epitelio olfativo. REEP1 y RTP1 interacciona con proteínas de OR. Usando células que expresan REEP1 y RTP1 y RTP2, se identifican nuevos OR

que responden a olores alifáticos.

La presente invención como se define en las reivindicaciones no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, los experimentos realizados durante el curso de la presente invención demostraron la importancia de las proteínas auxiliares de OR en expresión funcional en la superficie celular y en descodificación de especificidades de ligandos de OR. El documento provisional Saito y col., 2004 [Saito Harumi y col.: "RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors" Cell, vol. 119, nº 5, páginas 679-691] sugiere que RTP1 y RTP2 se podrían usar para identificar ligandos de receptores de olores activos para proporcionar una plataforma para la detección selectiva de la selectividad química de la gran familia de OR. Las ventajas de RTP1-A1 and RTP1-D3 sobre RTP1 (p. ej., expresión y actividad potenciadas en la superficie celular de los receptores de olores) se muestran, en concreto, en el ejemplo 23, en las páginas 105-106 y las figuras 49-52 de la memoria.

La identificación y el uso de proteínas implicadas en la localización de los OR proporciona numerosas aplicaciones de investigación, diagnósticas, de detección de fármacos y terapéuticas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos y proteínas de la presente descripción permiten la presentación selectiva y controlable de OR en las células de ensayo para, entre otras cosas, identificar nuevos OR, caracterizar OR, identificar ligandos de OR, correlacionar las respuestas olfatorias con las interacciones moleculares subyacentes a dicha respuesta, identificar y caracterizar grupos de OR y ligandos responsables de las respuestas olfatorias y condiciones de salud, e identificar, seleccionar y caracterizar reguladores de la respuesta de los OR para estudiar y controlar las respuestas olfatorias. La presente descripción proporciona de este modo medios para manipular las respuestas olfatorias y la base molecular para dicha respuesta *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, se hacen posibles numerosas aplicaciones comerciales, incluyendo la producción, caracterización y de matrices celulares *in vitro* o *in vivo* que expresan los OR localizados deseados para detección (p. ej., detección selectiva de alto rendimiento, compuestos o uso como sistemas olfativos sintéticos. Cualquier industria, incluyendo las industrias alimentarias, industrias sanitarias, industrias cosméticas, militares, agencias sanitarias, animales profesionales del olfateo (p. ej., para drogas, explosivos, víctimas de accidentes etc.) entre muchos otros encontrarán utilidad para las composiciones y procedimientos de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

Los inhibidores (p. ej., anticuerpos, moléculas pequeñas, aptámeros etc.) de interacciones OR/ligando que se identifican mediante los procedimientos de la presente invención encuentran muchos usos. Por ejemplo, la presente invención proporciona un modo sistemático para identificar qué receptores y ligandos son responsables de sensaciones olfativas concretas (p. ej., esencias percibidas).

Por tanto, por ejemplo, bloqueando interacciones concretas (p. ej., mediante un pulverizador nasal que tiene los inhibidores) o potenciando interacciones concretas (p. ej., mediante un pulverizador nasal que proporciona determinados ligandos o un recubrimiento en la superficie de un objeto que emite determinados ligandos), se pueden controlar esencias percibidas. Por tanto, las esencias indeseadas se pueden bloquear, cubrir o alterar (p. ej., se puede tratar a un perro olfateador para que solo huela una diana de interés y ningún otro olor que le distraiga, un trabajador sanitario se puede hacer inmune a la esencia de desperdicios etc.) y se pueden potenciar esencias deseadas.

La presente descripción también proporciona nuevos genes y secuencias de proteínas y procedimientos de su uso. Una descripción detallada de determinadas realizaciones preferidas y usos de la presente invención se describe más adelante. La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y refiere a péptidos capaces de estimular la localización en la superficie celular del receptor de olores y la expresión funcional del receptor de olores. La presente invención proporciona ensayos para la detección de agentes terapéuticos y para la detección de polimorfismos de proteínas auxiliares del receptor de olores y mutaciones asociadas con estados de enfermedad.

La descripción comprende las secciones siguientes: I. Sentido del olfato; II. Polinucleótidos de REEP y RTP; III. Polipéptidos de REEP y RTP; IV. Detección de alelos de REEP y RTP; V. Generación de anticuerpos frente a REEP y RTP; VI. Terapia génica usando REEP y RTP; VII. Animales transgénicos que expresan genes exógenos de REEP y RTP y homólogos, mutantes y variantes de los mismos; VIII. Detección selectiva usando REEP y RTP; IX. Composiciones farmacéuticas que contienen ácido nucleico de REEP y RTP, péptidos y análogos; X. ARN de interferencia (ARNi); XI. ARNi para REEP y RTP; y XII. Identificación de ligandos de receptores de olores.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, farmacología, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura, tal como "Molecular cloning: a laboratory manual" Segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal cell culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); la serie "Methods in enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of experimental immunology" (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.);

"Gene transfer vectors for mammalian cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current protocols in molecular biology" (F.M. Ausubel y col., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: the polymerase chain reaction" (Mullis y col., eds., 1994); y "Current protocols in immunology" (J.E. Coligan y col., eds., 1991).

### I. Sentido del olfato

- 5 El sistema olfativo representa una de las modalidades sensoriales más antiguas de la historia filogenética de los mamíferos. El olfato está menos desarrollado en los seres humanos que en otros mamíferos, como los roedores. Como sensor químico, el sistema olfativo detecta alimentos e influye sobre el comportamiento social y sexual. Las células epiteliales olfativas especializadas caracterizan el único grupo de neuronas capaz de regenerarse. La activación se produce cuando las moléculas odoríferas entran en contacto con prolongaciones especializadas conocidas como vesículas olfativas. Dentro de la cavidad nasal, los cornetes nasales sirven para dirigir el aire inspirado hacia el epitelio olfativo en la región posterior superior. Esta área (de solo unos centímetros de anchura) contiene más de 100 millones de células receptoras olfativas. Estas células epiteliales especializadas dan lugar a las vesículas olfativas que contienen cinocilios, que sirven como puntos de transducción de estímulos.
- 10 Existen tres sistemas neurales especializados dentro de las cavidades nasales en seres humanos. 1) el sistema olfativo principal (par craneal I), 2) sistema somatosensorial trigeminal (par craneal V), 3) el nervio terminal (par craneal 0). El PC I participa en la sensación de olor. Es responsable de determinar los sabores. El PC V participa en las sensaciones somatosensoriales, incluyendo ardor, frío, irritación y hormigueo. El PC 0 es un plexo neural ganglionado. Atraviesa gran parte de la mucosa nasal antes de pasar por la lámina cribosa para entrar en el prosencéfalo interno del pedúnculo olfativo. La función exacta del nervio terminal se desconoce en seres humanos.
- 15 20 El neuroepitelio olfativo es un epitelio columnar seudoestratificado. Las células epiteliales olfativas especializadas son el único grupo de neuronas capaz de regenerarse. El epitelio olfativo está ubicado en el lado superior de cada fosa nasal, incluyendo la lámina cribosa, el cornete superior, el tabique superior y secciones del cornete medio. Aloja receptores sensoriales del principal sistema olfativo y algunas de las terminales nerviosas libres del PC V. El epitelio olfativo pierde su homogeneidad general después del nacimiento y ya las primeras semanas de vida aparecen los islotes metaplásicos del epitelio similar al respiratorio. La metaplasia aumenta su extensión durante la vida. Se piensa que este procedimiento es el resultado de agresiones del ambiente, tales como virus, bacterias y toxinas.
- 25 30 Existen 6 tipos distintos de células en el neuroepitelio olfativo: 1) neuronas receptoras sensoriales bipolares, 2) células microvillares, 3) células de soporte, 4) células basales globosas, 5) células basales horizontales, 6) revestimiento celular de las glándulas de Bowman. Existen aproximadamente 6.000.000 de neuronas bipolares en el neuroepitelio olfativo adulto. Son células dendríticas finas con tubos que contienen cilios en un extremo y prolongaciones centrales largas en el otro extremo formando fletes olfativos. Los receptores olfativos se localizan en los extremos dendríticos ciliados. Los axones amielínicos se unen en 40 haces, denominados filetes olfativos, que están envueltos por células de tipo Schwann. Los filetes atraviesan la lámina cribosa para entrar en la fossa craneal anterior y constituyen el PC I. Las células microvillares están cerca de la superficie del neuroepitelio, pero las funciones exactas de estas células se desconocen. Las células de soporte también están en la superficie del epitelio. Se unen estrechamente a las neuronas y las células microvillares. También proyectan microvellosidades al moco. Sus funciones incluyen células receptoras aislantes unas de otras, lo que regula la composición del moco, desactiva olores y protege el epitelio de agentes extraños. Las células basales se localizan cerca de la membrana basal y se dividen para producir células progenitoras a partir de las cuales surgen otros tipos de células. Las glándulas de Bowman son una fuente principal de moco dentro de la región del epitelio olfativo.
- 35 40 45 Existen 6 tipos distintos de células en el neuroepitelio olfativo: 1) neuronas receptoras sensoriales bipolares, 2) células microvillares, 3) células de soporte, 4) células basales globosas, 5) células basales horizontales, 6) revestimiento celular de las glándulas de Bowman. Existen aproximadamente 6.000.000 de neuronas bipolares en el neuroepitelio olfativo adulto. Son células dendríticas finas con tubos que contienen cilios en un extremo y prolongaciones centrales largas en el otro extremo formando fletes olfativos. Los receptores olfativos se localizan en los extremos dendríticos ciliados. Los axones amielínicos se unen en 40 haces, denominados filetes olfativos, que están envueltos por células de tipo Schwann. Los filetes atraviesan la lámina cribosa para entrar en la fossa craneal anterior y constituyen el PC I. Las células microvillares están cerca de la superficie del neuroepitelio, pero las funciones exactas de estas células se desconocen. Las células de soporte también están en la superficie del epitelio. Se unen estrechamente a las neuronas y las células microvillares. También proyectan microvellosidades al moco. Sus funciones incluyen células receptoras aislantes unas de otras, lo que regula la composición del moco, desactiva olores y protege el epitelio de agentes extraños. Las células basales se localizan cerca de la membrana basal y se dividen para producir células progenitoras a partir de las cuales surgen otros tipos de células. Las glándulas de Bowman son una fuente principal de moco dentro de la región del epitelio olfativo.
- 45 50 Los receptores olfativos se localizan en los cilios de las células receptoras. Cada célula receptora expresa un gen del receptor de olor. En la actualidad existen aproximadamente 1.000 clases de receptores. Los receptores olfativos están unidos a la proteína de unión al nucleótido guanina estimuladora Golf. Cuando se estimulan, pueden activar la adenilato ciclase para producir el segundo mensajero AMPc y los acontecimientos posteriores conducen a la despolarización de la membrana celular y la propagación de la señal. Aunque cada célula receptora solo expresa un tipo de receptor, cada célula responde electrofisiológicamente a una amplia, aunque circunscrita, serie de estímulos. Esto implica que un único receptor acepta una serie de entidades moleculares.
- 55 60 El bulbo olfativo se localiza sobre la lámina cribosa en la base del lóbulo frontal en la fossa craneal anterior. Recibe miles de axones primarios de las neuronas receptoras olfativas. Dentro del bulbo olfativo, estos axones realizan sinapsis con un número mucho menor de neuronas de segundo orden, que forman el pedúnculo olfativo y se proyectan hacia la corteza olfativa. La corteza olfativa incluye los lóbulos frontal y temporal, el tálamo y el hipotálamo.
- Aunque los OR de mamífero se identificaron hace más de 10 años, se conoce poco sobre la selectividad de los diferentes OR para estímulos químicos, principalmente porque ha sido difícil expresar OR en la superficie de células heterólogas y analizar su especificidad de unión al ligando (véase, por ejemplo, Mombaerts, P. (2004) Nat Rev Neurosci 5, 263-278. La razón es que las proteínas OR quedan retenidas en el ER y después se degradan en el proteosoma (véase, por ejemplo, Lu, M., y col., (2003) Traffic 4, 416-433; McClintock, T. S., (1997) Brain Res Mol Brain Res 48, 270-278). A pesar de estas dificultades, se han realizado grandes esfuerzos sobre 20 OR con ligandos afines con varios grados de certidumbre (véase, por ejemplo, Bozza, T., y col., (2002) J Neurosci 22, 3033-3043; Gaillard, I., y col., (2002) Eur J Neurosci 15, 409-418; Hatt, H., y col., (1999) Cell Mol Biol 45, 285-291; Kajiya, K., y

col., (2001) J Neurosci 21, 6018-6025; Krautwurst, D., y col., (1998) Cell 95, 917-926; Malnic, B., y col., (1999) Cell 96, 713-723; Raming, K., y col., (1993) Nature 361, 353-356; Spehr, M., y col., (2003) Science 299, 2054-2058; Touhara, K., y col., (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4040-4045; Zhao, H., y col., (1998) Science 279, 237-242). La adición los 20 aminoácidos en N-terminal de rodopsina (p. ej., Rho-tag) o un péptido señal extraño al extremo N facilita la expresión en la superficie de algunos RO en células heterólogas (véase, por ejemplo, Hatt, H., y col., (1999) Cell Mol Biol 45, 285-291; Krautwurst, D., y col., (1998) Cell 95, 917-926). No obstante, para la mayoría de los OT, las modificaciones no estimulan con fiabilidad la expresión en la superficie celular. Por ejemplo, ODR-4, que se requiere para la localización adecuada de los receptores quimiosensoriales en C. elegans, tiene un efecto pequeño facilitando la expresión en la superficie celular de un OR de rata, pero no otro OR (véase, por ejemplo, Gimelbrant, A. A., y col., (2001) J Biol Chem 276, 7285-7290). Estos hallazgos indican que las neuronas olfativas tienen una maquinaria molecular selectiva que estimula la adecuada dirección de las proteínas OR a la superficie celular, pero no se han identificado complementos de esta maquinaria (véase, por ejemplo, Gimelbrant, A. A., y col., (2001) J Biol Chem 276, 7285-7290; McClintock, T. S., and Sammeta, N. (2003) Neuroreport 14, 1547-1552).

Para algunos GPCR, se requieren proteínas accesorias para una dirección correcta a la membrana de la superficie celular (véase, por ejemplo, Brady, A. E., and Limbird, L. E. (2002) Cell Signal 14, 297-309). Estas proteínas incluyen NinaA para Drosophila Rhodopsin (véase, por ejemplo, Baker, E. K., y col., (1994) Embo J 13, 4886-4895; Shieh, B. H., y col., (1989) Nature 338, 67-70), RanBP2 para la opsina del cono de mamíferos (véase, por ejemplo, Ferreira, P. A., y col., (1996) Nature 383, 637-640), RAMP para el receptor de tipo receptor de la calcitonina de mamíferos (CRLR) (véase, por ejemplo, McLatchie, L. M., y col., (1998) Nature 393, 333-339) y, por último, la familia M10 de las proteínas de MHC de clase I y la microglobulina beta 2 para V2R, los supuestos receptores de feromonas de mamífero (véase, por ejemplo, Loconto, J., y col., (2003) Cell 112, 607-618). Con la excepción de NinaA y RanBP2, ninguna de estas proteínas accesorias comparten ninguna homología de secuencia entre sí; su característica común es su asociación con la membrana.

La presente descripción proporciona nuevas proteínas (p.ej., REEP1, RTP1, RTP2, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6)) que estimulan la localización en la superficie celular de los OR y la expresión funcional de OR y numerosas composiciones y procedimientos relacionados con estos hallazgos.

## II. Polinucleótidos de REEP y RTP

Como se ha descrito anteriormente, la presente descripción proporciona nuevas proteínas que estimulan la superficie celular de los receptores de olor y la expresión funcional de los receptores de olor. En particular, la presente descripción proporciona genes y polipéptidos de REEP (p.ej., REEP1, REEP2, REEP3, REEP4, REEP5, y REEP6) y los genes y polipéptidos de RTP (p. ej., RTP1, RTP2, RTP3, RTP4, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), and RTP4-A1-D1 (Quimera 6)). REEP1, RTP1, RTP2, y variantes de RTP1 (p. ej., RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, y RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6) pueden estimular la localización en la superficie celular de los receptores de olor OR y la expresión funcional de los receptores de olor.

De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican genes, homólogos, variantes (p. ej., polimorfismos y mutantes) de REEP, incluyendo, entre otros, los descritos en las SEC ID Nº 1-12. La presente descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican genes, homólogos, variantes (p. ej., polimorfismos y mutantes) de RTP, incluyendo, entre otros, los descritos en las SEC ID Nº 13-20. La tabla 1 escribe ejemplos de genes de REEP y RTP. La presente descripción proporciona secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridar con las SEC ID Nº 1-20 en condiciones de rigurosidad baja a alta, siempre que la secuencia de polinucleótidos capaz de hibridar codifique una proteína que conserva una actividad biológica de la proteína REEP y/o RTP de origen natural. La proteína que conserva una actividad biológica de un REEP y/o RTP de origen natural puede ser un 70 % homóloga a los REEP y/o RTP silvestres, preferentemente un 80 % homóloga a REEP y/o RTP silvestre, más preferentemente, un 90 % homóloga al REEP y/o RTP silvestres y, lo más preferentemente, un 95 % homólogo a REEP y/o RTP silvestre. Las condiciones de hibridación se pueden basar en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del complejo de unión al ácido nucleico y confieren una "rigurosidad2 definida, como se ha explicado anteriormente (véase, por ejemplo, Wahl, y col., Meth. Enzymol., 152:399-407 (1987).

Se pueden proporcionar alelos adicionales de los genes de REEP y/o RTP. Los alelos pueden ser el resultado de un polimorfismo o mutación (es decir, un cambio en la secuencia de ácido nucleico) y, generalmente, producen ARNm o polipéptidos alterados cuya estructura o función puede o no estar alterada. Cualquier gen dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales frecuentes que dan lugar a alelos generalmente se atribuyen a delecciones, adiciones o sustituciones de ácidos nucleicos. Cada uno de estos tipos de cambios se puede producir solo o en combinación con los demás y a la velocidad de uno o mas veces en una secuencia dada. Ejemplos adicionales incluyen mutaciones por truncamiento (p. ej., de modo que el ARNm codificado no produce una proteína completa).

- Las secuencias nucleotídicas de la presente invención se pueden modificar mediante ingeniería con el fin de alterar una secuencia de codificación de REEP y/o RTP por diversas razones, incluyendo, entre otras, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones usando técnicas bien conocidas en la materia (p. ej., mutagénesis dirigida a sitio para insertar nuevos
- 5 sitios de restricción, para alterar los patrones de glucosilación, para cambiar la preferencia de codones etc.). Las variantes de RTP1 incluyen, entre otros, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, y RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera5), and RTP4-A1-D1 (Quimera 6).
- La secuencia de polinucleótidos de REEP y/o RTP se puede extender usando la secuencia de nucleótidos en varios procedimientos conocidos en la materia para detectar secuencias cadena arriba, tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, se contempla que la reacción en cadena de la polimerasa- sitio de restricción (PCR) encontrará utilidad en los procedimientos de la presente especificación. Este es un procedimiento directo que usa cebadores universales para recuperar la secuencia desconocida adyacente a un locus conocido (Gobinda y col., PCR Methods Applic., 2:318-22 [1993]). En primer lugar, el ADN genómico se amplifica en presencia de un cebador
- 10 hasta una secuencia de unión y un cebador específico de la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador de unión y otro cebador específico interno con respecto al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa adecuada y se secuencias usando la transcriptasa inversa.
- Se puede usar PCR inversa para amplificar o extender las secuencias usando cebadores divergentes basados en una región conocida (Triglia y col., Nucleic Acids Res., 16: 8186 [1988]). Los cebadores se pueden diseñar usando Oligo 4,0 (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.) u otro programa adecuado, de modo que tengan una longitud de 22-30 nucleótidos, un contenido de GC del 50 % o más y que hibriden con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68-72 °C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. A continuación, el fragmento se circulariza mediante ligadura
- 15 intramolecular y se usa como molde para la PCR. También se puede utilizar PCR circulante. La PCR circulante es un procedimiento para genes objetivo circulantes que permite la recuperación de secuencias desconocidas (Parker y col., Nucleic Acids Res., 19:3055-60 [1991]). El kit PROMOTERFINDER (Clontech) usa PCR, cebadores anidados y bibliotecas especiales para "entrar" en el ADN genómico. Este procedimiento evita la necesidad de buscar en bibliotecas y es útil para encontrar uniones intrones/exones.
- Bibliotecas preferidas para la detección selectiva de ADNc de longitud completa incluyen bibliotecas de mamíferos que se han seleccionado según el tamaño de modo que incluyan ADNc de mayor tamaño. Asimismo, se prefieren las bibliotecas cebadas al azar porque contienen más secuencias que las que contienen en las regiones génicas 5' y cadena arriba. Una biblioteca cebada al azar puede ser especialmente útil en el caso en el que una biblioteca de oligo d(T) no da ADNc de longitud completa. Las bibliotecas genómicas de mamífero son útiles para obtener intrones
- 20 y extender la secuencia en 5'.
- Se pueden proporcionar variantes de las secuencias de REEP y/o RTP divulgadas. Las variantes pueden ser el resultado de polimorfismos o mutaciones (es decir, un cambio en la secuencia de ácido nucleico) y, generalmente, producen ARNm o polipéptidos alterados cuya estructura o función puede o no estar alterada. Cualquier gen dado
- 25 puede tener ninguna, una o muchas formas variantes. Los cambios mutacionales habituales que dan lugar a variantes generalmente se atribuyen a delecciones, adiciones o sustituciones de ácidos nucleicos. Cada uno de estos tipos de cambios se puede producir solo o en combinación con los demás y a la velocidad de uno o mas veces en una secuencia dada.
- Parece posible modificar la estructura de un péptido que tiene una función (p. ej., función de REEP y/o RTP) con fines tales como alterar la actividad biológica (p. ej., función REEP y/o RTP alterada). Dichos péptidos modificados
- 30 se consideran equivalentes funcionales de péptidos que tienen actividad de un péptido REEP y/o RTP como se define en el presente documento. Se puede producir un péptido modificado en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se ha alterado, tal como mediante sustitución, delección o adición. Estas modificaciones
- 35 pueden no reducir significativamente la actividad biológica de los genes de REEP y/o RTP modificados. En otras palabras, el constructor "X" se puede evaluar con el fin de determinar si es un miembro del género de REEP y/o RTP
- 40 modificados o variantes de la presente descripción tal como se ha definido funcionalmente más que estructuralmente. La actividad de los polipéptidos variantes de REEP y/o RTP se puede evaluar mediante procedimientos descritos en el presente documento (p. ej., la generación de animales transgénicos o el uso de ensayos de señalización)
- Además, como se ha descrito anteriormente, las formas variantes de los genes de REEP y/o RTP también se
- 45 contemplan como equivalentes de dichos péptidos y las moléculas de ADN que se establecen con más detalle en el presente documento. Por ejemplo, se contempla una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o una sustitución conservadora similar de un aminoácido
- 50 con un aminoácido estructuralmente relacionado (es decir, mutaciones conservadoras), no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. De acuerdo con lo anterior, la descripción
- 55 proporciona variantes de REEP y/o RTP que contienen sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por sus

cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéricamente se pueden dividir en cuatro familias: (1) ácidos (aspartato, glutamato; (2) básicos (lisina, arginina, histidina); (3) no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y (4) polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). En ocasiones, los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican en conjunto como aminoácidos aromáticos. De un modo similar, el repertorio de aminoácidos se puede agrupar como (1) ácidos (Aspartato, glutamato), (2) básicos (lisina, arginina, histidina), (3) alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), estando la serina y la treonina opcionalmente agrupadas por separado como alifáticos-hidroxilo; (4) aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); (5) amida (asparagina, glutamina); y (6) que contienen azufre (cisteína y metionina) (p. ej., Stryer ed., Biochemistry, pág. 17-21, 2<sup>a</sup> ed, WH Freeman y Co., 1981). Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido tiene como resultado un polipéptido funcional se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad del péptido variante para funcionar de un modo similar a la proteína de tipo silvestre. Los péptidos que tienen más de una sustitución se pueden someter a ensayo fácilmente del mismo modo.

Más infrecuentemente, una variante incluye cambios “no conservadores” (p. ej., sustitución de una glicina con un triptófano). Variaciones minoritarias análogas también pueden incluir deletiones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Usando programas informáticos (p. ej., LASERGENE software, DNASTAR Inc., Madison, Wis.) se pueden encontrar guías para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o deletrear sin anular la actividad biológica.

Como se describe con mayor detalle más adelante se pueden producir variantes mediante procedimientos tales como evolución dirigida u otras técnicas para producir bibliotecas combinatorias de variantes, descritas con mayor detalle más adelante. Las secuencias nucleotídicas se modifican mediante ingeniería con el fin de alterar una secuencia de codificación de REEP y/o RTP, incluyendo, entre otras, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento, la localización y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones usando técnicas que son bien conocidas en la técnica (p. ej., mutagénesis dirigida a sitio para insertar nuevos sitios de restricción, para alterar los patrones de glicosilación, para cambiar la preferencia de codones, etc.).

Las variantes de RTP1 incluyen, entre otras, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP 1-D, and RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1- A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5) y RTP4-A1-D (Quimera 6).

**Tabla 1: Las reivindicaciones se refieren solo a las secuencias de RTP1, RTP1-A1, RTP1-D3 y RTP2**

| <b>Tabla 2. Genes moduladores de OR</b> |                                   |                                |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Gen</b>                              | <b>SEC ID N° (ácido nucleico)</b> | <b>SEC ID N° (polipéptido)</b> |
| REEP1 murino                            | 1                                 | 21                             |
| REEP2 murino                            | 2                                 | 22                             |
| REEP3 murino                            | 3                                 | 23                             |
| REEP4 murino                            | 4                                 | 24                             |
| REEP5 murino                            | 5                                 | 25                             |
| REEP6 murino                            | 6                                 | 26                             |
| REEP1 humano                            | 7                                 | 27                             |
| REEP2 humano                            | 8                                 | 28                             |
| REEP3 humano                            | 9                                 | 29                             |
| REEP4 humano                            | 10                                | 30                             |
| REEP5 humano                            | 11                                | 31                             |
| REEP6 humano                            | 12                                | 32                             |
| RTP1 murino                             | 13                                | 33                             |
| RTP2 murino                             | 14                                | 34                             |
| RTP3 murino                             | 15                                | 35                             |
| RTP4 murino                             | 16                                | 36                             |
| RTP1 humano                             |                                   | 37                             |

| <b>Tabla 2. Genes moduladores de OR</b> |                                   |                                |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Gen</b>                              | <b>SEC ID Nº (ácido nucleico)</b> | <b>SEC ID Nº (polipéptido)</b> |
| RTP2 humano                             | 18                                | 38                             |
| RTP3 humano                             | 19                                | 39                             |
| RTP4 humano                             | 20                                | 40                             |

### III. Polipéptidos REEP y RTP

La presente divulgación proporciona secuencias polinucleotídicas de REEP y/o RTP que codifican secuencias polipeptídicas de REEP y/o RTP (p. ej., los polipéptidos de SEC ID Nº 21-40, 41-50 respectivamente). La presente descripción proporciona un polipéptido codificado por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18 y variantes de las mismas que tienen una identidad de al menos 80 % con las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18 o la proteína puede tener una identidad de al menos 90 % con las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18 o la proteína puede tener una identidad de al menos 95 % con las SEC ID Nº 1, 7, 13, 14, 17 y 18. La descripción también divulga fragmentos, proteínas de fusión o equivalentes funcionales de las proteínas REEP y/o RTP (p. ej., RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, and RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5) y RTP4-A1-D1 (Quimera 6)). La presente descripción proporciona mutantes de los polipéptidos de REEP y/o RTP. Las secuencias de ácido nucleico correspondientes a variantes, homólogos y mutantes de REEP y/o RTP para generar moléculas de ADN recombinantes que dirigen la expresión de las variantes homólogas y mutantes de REEP y/o RTP en las células huésped adecuadas. El polipéptido puede ser un producto purificado natural o un producto de procedimientos sintéticos químicos o se puede producir mediante técnicas recombinantes usando un huésped procariota o eucariota (p. ej., usando células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, el polipéptido puede estar glicosilado o no glicosilado. Los polipéptidos pueden también incluir un residuo de aminoácido metionina inicial.

Debido a la degeneración del código genético, dos secuencias de ADN aparte de las secuencias polinucleotídicas de las SEC ID Nº 21-50 que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una funcionalmente equivalente, se pueden usar para clonar y expresar las proteínas REEP y/o RTP. En general, dichas secuencias polinucleotídicas hibridan a una de las SEC ID Nº 21-50 en condiciones de rigurosidad alta a media, como se ha descrito anteriormente. Como los expertos en la técnica entenderán, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifican REEP y/o RTP que poseen codones de origen no natural. Por tanto, los codones preferidos por un huésped procariota o eucariota concreto (Murray y col., Nucl. Acids Res., 17 [1989]) se seleccionan, por ejemplo, para incrementar el índice de expresión de REEP y/o RTP o para producir trascritos de ARN recombinante que posee propiedades deseables tales como una semivida mayor que la de los tránscritos producidos a partir de la secuencia natural.

Los polipéptidos de REEP1, RTP1 y RTP2 pueden estimular la localización en la superficie celular de los receptores de olor y la expresión funcional de los receptores de olor.

#### 1. Vectores para la producción de REEP y RTP

Los polinucleótidos de la presente descripción se pueden usar para producir polipéptidos mediante técnicas recombinantes. Por tanto, por ejemplo, el polinucleótido se puede incluir en uno cualquiera de diversos vectores de expresión para expresar un polipéptido. Los vectores pueden incluir, entre otros, secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético (p. ej., derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y ADN viral, tal como de vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y seudorrabia). Se contempla que se puede usar cualquier vector siempre que sea replicable y viable en la célula huésped.

En concreto, se pudieron proporcionar construcciones recombinantes concretas que comprenden una o más de las secuencias como se ha descrito ampliamente en lo que antecede (p. ej., las SEC ID Nº 1-20). Las construcciones pueden comprender un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el que se ha insertado una secuencia de la invención en orientación directa o inversa. La secuencia estructural heteróloga (p. ej., las SEC ID Nº 1-20 se pueden ensamblar en una fase adecuada con secuencias de inicio y terminación de la traducción. La secuencia de ADN adecuada se puede insertar en el vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio(s) de endonucleasa de restricción adecuado(s) mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Los expertos en la técnica conocen un número elevado de vectores adecuados y comercialmente disponibles. Dichos vectores incluyen, entre otros, los vectores siguientes: 1) Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pBSKS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); y 2) eucarióticas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG

(Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia); y 3) Baculovirus - pPbac y pMbac (Stratagene). Se puede usar otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en la célula huésped. Vectores de expresión en mamíferos pueden comprender un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y, también, cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, sitios de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y de poliadenilación de SV40 se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

La secuencia de ADN en el vector de expresión puede estar unida operablemente a una o más secuencias de control de la expresión (promotores) adecuadas para dirigir la síntesis directa de ARNm. Los promotores incluyen, entre otros, el promotor de LTR o SV40, el *E. coli lac* o *trp*, el *fago lambda*  $P_L$  y  $P_R$ , los promotores de T3 y T7 y los promotores temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), de timidina quinasa del virus del herpes simple (VHS) y de la metalotioneína-I de ratón, y otros promotores conocidos porque controlan la expresión génica en células procariotas y eucariotas o sus virus. Vectores de expresión recombinante pueden incluir orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula huésped (p. ej., resistencia a la dihidrofolato reductasa o a neomicina para cultivo celular eucariótico, o resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*).

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de una longitud de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Potenciadores incluyen, entre otros, el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación, pb 100 a 270 pb, un potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliomavirus en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus.

El vector de expresión también puede contener un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias adecuadas para amplificar la expresión.

## 2. Células huésped para la producción de polipéptidos de REEP y RTP

La presente invención proporciona células huésped que contienen las construcciones descritas en lo que antecede. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior (p. ej., una célula de mamífero o de insecto) o una célula eucariota menor (p. ej., una célula de levadura). La célula huésped puede ser una célula procariota (p. ej., una célula bacteriana). Ejemplos específicos de células huésped incluyen, entre otras, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, y varias especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyce* y *Staphylococcus*, así como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, células de *Drosophila* S2 cells, células de *Spodoptera* Sf9, células de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, (Gluzman, Cell 23:175 [1981]), líneas celulares C127, 3T3, 293, 293T, HeLa y BHK.

Las construcciones en las células huésped se pueden usar de un modo convencional para producir el producto genético codificado por la secuencia recombinante. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección mediada por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación (Véase, por ejemplo, Davis y col., Basic Methods in Molecular Biology, [1986]). Como alternativa, los polipéptidos se pueden producir sintéticamente mediante sintetizadores peptídicos convencionales.

Las proteínas se pueden expresar en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de los promotores adecuados. También se pueden emplear sistemas de traducción acelulares para producir dichas proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN como se describe en el presente documento.

En, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) se describen vectores de clonación y expresión adecuados para usar con huéspedes procariotas y eucariotas. A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., [1989].

Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped hasta una densidad celular adecuada, el promotor seleccionado puede estar inducido por medios adecuados (p. ej., cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Normalmente las células pueden recogerse mediante centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se conserva para su posterior purificación. Las células microbianas usadas en la expresión de proteínas se pueden romper mediante cualquier procedimiento conveniente, incluidos ciclos de congelación-descongelación, sonicación, fragmentación mecánica o uso de agentes de lisis celular.

La presente descripción divulga una línea celular (p. ej., una línea celular heteróloga 293T) que comprende la expresión de un receptor de olor (p. ej., un receptor de olor humano, un receptor de murino, un receptor de olor sintético) localizado en la superficie de la célula, REEP1, RTP1, RTP2, y G<sub>olf</sub>. El receptor de olor puede estar marcado con un agente informador de iluminación (p. ej., glutatión-S-transferasa (GST), c-myc, 6-histidina (6X-His), proteína fluorescente verde (GFP), proteína de unión a la maltosa (MBP), hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), β-galactosidasa y GAL4. La línea celular descrita en el presente documento no se limita a receptores de olor concretos. Los receptores de olor expresados en la línea celular pueden incluir, entre otros, S6/79, S 18, S46, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 and MOR32-11. Las líneas celulares que expresan receptores de olor se

pueden usar en la clasificación de una expresión funcional de receptores de olor (p. ej., especificidad de ligando). Las líneas celulares que expresan receptores de olor se pueden usar en la clasificación del sentido de olfato de un animal.

### 3. Purificación de los polipéptidos REEP y RTP

5 La presente descripción también proporciona procedimientos para recuperar y purificar polipéptidos de REEP y RTP de cultivos de células recombinantes incluidos, entre otros, precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. En otras formas de realización de la presente invención, las etapas de replegamiento de proteínas se pueden usar 10 según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) se puede emplear en las etapas de purificación final.

La presente descripción proporciona además polinucleótidos que tienen una secuencia de codificación de un gen de REEP y RTP (p. ej., las SEC ID Nº 1 - 20) condensada en el marco con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. Un ejemplo no limitante de una secuencia marcadora es una 15 cola de hexahistidina que puede ser suministrada por un vector, preferentemente un vector pQE-9, que proporciona la purificación del polipéptido condensado con el marcador en el caso de un huésped bacteriano o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una cola de hemaglutinina (HA) cuando se usa un huésped mamífero (p. ej., células COS-7). La cola de HA corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell, 37:767 [1984]).

### 20 4. Mutantes de truncamiento de los polipéptidos REEP y RTP

Además, la presente descripción proporciona fragmentos de los polipéptidos de REEP y/o RTP (es decir, mutantes 25 de truncamiento). Cuando se desea la expresión de una porción de la proteína REEP y/o RTP puede ser necesario añadir un codón de iniciación (ATG) al fragmento oligonucleotídico que contiene la secuencia deseada que se va a expresar. En la técnica se conoce bien que una metionina en la posición N-terminal se puede escindir enzymáticamente mediante el uso de la enzima metionina aminopeptidasa (MAP). La MAP se ha clonado en *E. coli* 30 (Ben-Bassat y col., J. Bacteriol., 169:751 [1987]) y *Salmonella typhimurium* y su actividad *in vitro* se ha demostrado en proteínas recombinantes (Miller y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2718-1722 [1990]). Por tanto, la eliminación de una metionina en N-terminal, si se desea, se puede conseguir *in vivo* expresando dichos polipéptidos recombinantes en un huésped que produce MAP (p. ej., *E. coli* o CM89 o *S. cerevisiae*), o *in vitro* mediante el uso de MAP purificada.

### 5. Proteínas de fusión que contienen REEP y RTP

La presente descripción también proporciona proteínas de fusión que incorporan todo o partes de los polipéptidos de **REEP y RTP de la presente invención**. De acuerdo con esto, las secuencias de codificación para el polipéptido se 35 pueden incorporar como parte de un gen de fusión que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido diferente. Se contempla que este tipo de sistema de expresión encontrará utilidad en las condiciones en las que sea deseable producir un fragmento inmunogénico de una proteína REEP y/o RTP. La proteína de la cápside VP6 de rotavirus se puede usar como proteína transportadora inmunológica para porciones del polipéptido REEP y/o RTP, bien en forma monomérica o bien en forma de una partícula viral. Las secuencias de ácido nucleico 40 correspondientes a la porción del polipéptido REEP y/o RTP contra la cual se van a producir anticuerpos se pueden incorporar en una construcción génica de fusión que incluye secuencias de codificación para una proteína estructural tardía del virus vaccinia para producir un conjunto de virus recombinantes que expresan las proteínas de fusión que comprenden una porción de REEP y/o RTP como parte del virión. Se ha demostrado, con el uso de proteínas de fusión inmunogénicas que usan las proteínas de fusión del antígeno de superficie de la hepatitis B, que los viriones de la hepatitis B recombinantes se pueden usar también en esta función. De un modo similar, las construcciones 45 químéricas que codifican proteínas de fusión que contienen una porción del polipéptido REEP y/o RTP y la proteína de la cápside del poliovirus se crean para potenciar la inmunogenicidad del conjunto de antígenos polipeptídicos (véase, por ejemplo, la publicación EP Nº 025949; y Evans y col., Nature 339:385 [1989]; Huang y col., J. Virol., 62:3855 [1988]; y Schlienger y col., J. Virol., 66:2 [1992]).

Se puede usar el sistema peptídico de múltiples agentes para la inmunización basada en péptidos. En este sistema 50 se obtiene una porción deseada de REEP y/o RTP directamente de la síntesis orgánico-química del péptido sobre un núcleo de lisina ramificado oligomérico (véase, por ejemplo, Posnett y col., J. Biol. Chem., 263:1719 [1988]; y Nardelli y col., J. Immunol., 148:914 [1992]). Los determinantes antigenicos de las proteínas REEP y/o RTP también se pueden expresar y ser presentados por las células bacterianas.

Además de usar proteínas de fusión para potenciar la inmunogenicidad, está ampliamente apreciado que las 55 proteínas de fusión pueden también facilitar la expresión de proteínas, tales como la proteína REEP y/o RTP de la presente invención. De acuerdo con esto, los polipéptidos de REEP y/o RTP se pueden generar como glutatión-S-transferasa (es decir, proteína de fusión GST). Se contempla que dichas proteínas de fusión GST permitirán una fácil purificación de los polipéptidos de REEP y/o RTP, tal como mediante el uso de matrices derivadas de glutatión (véase, por ejemplo, Ausabel y col., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY [1991]).

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia del sitio de escisión de la poli-(His)enteroquinasa en el extremo N de la porción deseada de un polipéptido de REEP y/o RTP, puede permitir la purificación de la proteína de fusión REEP y/o RTP expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina metálica de Ni<sup>2+</sup>. La secuencia líder de purificación se puede eliminar después mediante tratamiento con enteroquinasa (véase, por ejemplo, Hochuli y col., J. Chromatogr., 411:177 [1987]; y Janknecht y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972).

Las técnicas para fabricar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifica diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales usando extremos romos o escalonados para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos adecuados, llenado con extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseadas y ligadura enzimática. El gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales, incluidos sintetizadores de ADN automáticos.

Como alternativa, se puede llevar a cabo la amplificación de fragmentos génicos usando cebadores de ancla que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que después se pueden hibridar para generar una secuencia génica químérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, anteriormente).

#### 6. Variantes de REEP y RTP

En el presente documento también se describen formas mutantes o variantes de los polipéptidos de REEP y/o RTP (**es decir, luteínas**). Es posible modificar la estructura de un péptido que tiene una actividad de REEP y/o RTP de la presente descripción para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica o profiláctica, inactivando la proteína, o la estabilidad (p. ej., duración *ex vivo* y/o resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos péptidos modificados se consideran equivalentes funcionales de péptidos que tienen una actividad de las proteínas REEP y/o RTP objeto como se define en el presente documento. Se puede producir un péptido modificado en el que la secuencia de aminoácidos se ha alterado, tal como mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos.

25 Las formas variantes de RTP1 incluyen, entre otros, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, and RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP9-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1D2 (Quimera 5), and RTP4-A1-D1 (Quimera 6).

Además, como se ha descrito anteriormente, las formas variantes (p. ej., secuencias mutantes o polimórficas) de las proteínas REEP y/o RTP objeto también se contemplan como equivalentes de dichos péptidos y las moléculas de ADN que se establecen con más detalle en el presente documento. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, la presente descripción abarca proteínas mutantes y variantes que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras.

35 La presente descripción contempla adicionalmente un procedimiento de generar conjuntos de mutantes combinatorias de las presentes proteínas REEP y/o RTP, así como mutantes de truncamiento, y es especialmente útil para identificar potenciales secuencias variantes (es decir, mutantes o secuencias polimórficas) que están implicadas en trastornos neurológicos (p. ej., trastornos olfativos) o resistencia a trastornos neurológicos. El objetivo de la detección selectiva de dichas bibliotecas combinatorias es generar, por ejemplo, nuevas variantes de REEP y/o RTP que pueden actuar como agonistas o antagonistas, o, como alternativa, poseen nuevas actividades en conjunto.

40 Por tanto, las variantes de REEP y/o RTP se pueden modificar mediante ingeniería a través del presente procedimiento para proporcionar una actividad biológica alterada (p. ej., aumentada o disminuida). Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva con respecto a un REEP y/o RTP de origen natural. Dichas proteínas, cuando se expresan en construcciones de ADN recombinantes, se pueden usar en protocolos de terapia génica.

45 Se pueden proporcionar variantes de REEP y/o RTP que tienen semivididas intracelulares espectacularmente diferentes a la correspondiente proteína silvestre. Por ejemplo, la proteína alterada se puede dar más estable o menos estable a la degradación proteolítica o a otros procesos celulares que tengan como resultado la destrucción de los polipéptidos de REEP y/o RTP o su inactivación. Dichas variantes, y los genes que las codifican, se pueden usar para alterar la localización de la expresión de REEP y/o RTP mediante modulación de la semividida de la proteína. Por ejemplo, una semividida corta puede dar lugar a efectos biológicos de REEP y/o RTP más transitorios y, cuando son parte de un sistema de expresión inducible, pueden permitir un control más estrecho de los niveles de REEP y/o RTP dentro de la célula. Como se ha indicado anteriormente, dichas proteínas, y particularmente sus construcciones de ácido nucleico recombinante, se pueden usar en protocolos de terapia génica.

55 Las variantes de REEP y/o RTP se pueden generar mediante el abordaje combinatorio para actuar como antagonistas, en cuanto a que son capaces de interferir en la capacidad de la correspondiente proteína silvestre para regular la función celular.

En el abordaje de mutagénesis combinatoria, las secuencias de aminoácidos para una población de homólogos,

variantes de REEP y/o RTP u otras proteínas relacionadas se pueden alinear, preferentemente para estimular la mayor homología posible. Dicha población de variantes puede incluir, por ejemplo, homólogos de REEP y/o RTP de una o más especies o variantes de REEP y/o RTP de la misma especie pero que difieren debido a mutación o polimorfismos. Los aminoácidos que aparecen en cada posición de las secuencias alineadas se seleccionan para crear un conjunto degenerado de secuencias combinatorias.

La biblioteca combinatoria de REEP y/o RTP se puede producir mediante una biblioteca degenerada de genes que codifica una biblioteca de polipéptidos cada uno de los cuales incluye al menos una porción de posibles secuencias de las proteínas REEP y/o RTP. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se pueden ligar enzimáticamente en secuencias génicas de modo que el conjunto degenerado de posibles secuencias de REEP y/o RTP se puedan expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (p. ej., para expresión en fagos) que contienen el conjunto de secuencias de REEP y/o RTP en las mismas.

Hay muchos modos por los que se puede generar la biblioteca de posibles homólogos y variantes de REEP y/o RTP a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Por ejemplo, la síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático y los genes sintéticos se ligan en un gen adecuado para expresión. El fin de un conjunto degenerado de genes es proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de potenciales secuencias de REEP y/o RTP. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, *Tetrahedron Lett.*, 39:39 9 [1983]; Itakura y col., *Recombinant DNA*, en Walton (ed.), *Proceedings of the 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules*, Elsevier, Amsterdam, pp 273-289 [1981]; Itakura y col., *Annu. Rev. Biochem.*, 53:323 [1984]; Itakura y col., *Science* 198:1056 [1984]; Ike y col., *Nucl. Acid Res.*, 11:477 [1983]). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, p. ej., Scott y col., *Science* 249:386 [1980]; Roberts y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2429 [1992]; Devlin y col., *Science* 249: 404 [1990]; Cwirla y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378 [1990] así como las patentes de EE.UU. Nº 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Se contempla que los ácidos nucleicos de REEP y/o RTP de la presente descripción (p. ej., SEC ID Nº 1-20 y fragmentos y variantes de los mismos) se pueden usar como ácidos nucleicos de partida para la evolución dirigida. Esas técnicas se pueden usar para desarrollar variantes de REEP y/o RTP que tienen propiedades deseables, tales como una actividad biológica incrementada o disminuida.

La evolución artificial se puede realizar mediante mutagénesis aleatoria (p. ej., usando PCR propensa a error para introducir mutaciones aleatorias en una secuencia de codificación dada). Este procedimiento requiere un ajuste fino de la frecuencia de mutación. Como norma general, las mutaciones beneficiosas son raras, mientras que las mutaciones perjudiciales son infrecuentes. Esto es porque la combinación de una mutación perjudicial y una mutación beneficiosa a menudo tiene como resultado una enzima inactiva. El número ideal de sustituciones de bases para genes objetivo normalmente está entre 1,5 y 5 (Moore y Arnold, *Nat. Biotech.*, 14, 458-67 [1996]; Leung y col., *Technique*, 1:11-15 [1989]; Eckert y Kunkel, *PCR Methods Appl.*, 1:17-24 [1991]; Caldwell y Joyce, *PCR Methods Appl.*, 2:28-33 [1992]; y Zhao y Arnold, *Nuc. Acids. Res.*, 25:1307 [1997]). Tras la mutagénesis, los clones resultantes se seleccionan según la actividad deseable (p. ej., detección selectiva según la actividad de REEP y/o RTP). A menudo son necesarias rondas sucesivas de mutagénesis y selección para desarrollar enzimas con propiedades deseables. Cabe destacar que solo las mutaciones útiles se pasan a la siguiente ronda de mutagénesis.

Los polinucleótidos de la presente descripción se pueden usar en procedimientos de transposición génica o PCR sexual (p. ej., Smith, *Nature*, 370:324-25 [1994]; patentes de EE.UU. nº 5.837.458; 5.830.721; 5.811:238; 5.733.731). La transposición genética implica fragmentación aleatoria de varios ADN mutantes, seguido de su reensamblaje mediante PCR en moléculas de longitud completa. Ejemplos de varios procedimientos de transposición genética incluyen, entre otros, ensamblaje tras tratamiento con ADNasa, el procedimiento de extensión escalonada (STEP) y cebado aleatorio en recombinación *in vitro*. En el procedimiento mediado por la ADNasa, los segmentos de ADN aislados de un conjunto de mutantes positivos se escinden en fragmentos aleatorios con ADNasa I y se someten a múltiples rondas de PCR sin cebador añadido. Las longitudes de fragmentos aleatorios se acercan a las del segmento sin escindir a medida que progresan los ciclos de PCR, lo que tiene como resultado la mezcla de mutaciones presentes en clones diferentes y la acumulación en algunas de las secuencias resultantes. Múltiples ciclos de selección y SHUFFLING han conducido a la potenciación funcional de una serie de enzimas (Stemmer, *Nature*, 370:398-91 [1994]; Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10747-51 [1994]; Crameri y col., *Nat. Biotech.*, 14:315-19 [1996]; Zhang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4504 [1997]; y Crameri y col., *Nat. Biotech.*, 15: 436 [1997]). Las variantes producidas mediante evolución dirigida se puede someter a detección selectiva según la actividad de REEP y/o RTP mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En la materia se conoce una amplia gama de técnicas para la detección selectiva de productos génicos de bibliotecas combinatorias fabricados mediante mutaciones puntuales y para la detección selectiva de bibliotecas de ADNc de productos génicos que tienen una propiedad determinada. En general, dichas técnicas serán adaptables para una detección selectiva rápida de bibliotecas génicas generadas mediante la mutagénesis combinatoria o recombinación de homólogos o variantes de REEP y/o RTP. Las técnicas más usadas para la detección selectiva de grandes bibliotecas génicas habitualmente comprende la clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión

replicables, transformando las células adecuadas con la biblioteca de vectores resultante y expresando los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita un aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó.

#### 7. Síntesis química de los polipéptidos de REEP y/o RTP

- 5 La secuencia que codifica un REEP y/o RTP se puede sintetizar, completamente o en parte, usando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Caruthers, y col., Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 7:215 [1980]; Crea and Horn, Nucl. Acids Res., 9:2331 [1980]; Matteucci y Caruthers, Tetrahedron Lett., 21:719 [1980]; y Chow y Kempe, Nucl. Acids Res., 9:2807 [1981]). La propia proteína se puede producir usando procedimientos químicos para sintetizar la totalidad de la secuencia de aminoácidos de REEP y/o RTP o una porción de la misma. Por  
10 ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante técnicas de fase sólida, se escinden de la resina y se purifican mediante cromatografía de líquidos preparativa de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins Structures And Molecular Principles, W H Freeman y Co, New York N.Y. [1983]). La composición de los péptidos sintéticos se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de los aminoácidos (véase, p. ej., Creighton, anteriormente).
- 15 La síntesis peptídica directa se puede realizar usando varias técnicas en fase sólida (Roberge Roberge y col., Science 269:202 [1995]) y se puede realizar síntesis automática usando, por ejemplo, el sintetizador peptídico ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Adicionalmente, durante la  
20 síntesis directa, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de REEP y/o RTP, o cualquier parte de la misma, se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinar mediante procedimientos químicos con otras secuencias para producir una variante del polipéptido.

#### IV. Detección de los alelos de REEP y RTP

La presente descripción proporciona procedimientos de detección de la presencia de ácidos nucleicos o polipéptidos de REEP y/o RTP silvestres o variantes (p. ej., mutantes o polimórficos). La detección de polipéptidos de REEP y/o RTP mutantes encuentra utilidad en el diagnóstico de enfermedad (p. ej., trastorno olfativo).

##### A. Detección de alelos variantes de REEP y/o RTP

- La presente descripción proporciona alelos de REEP y/o RTP que aumentan la sensibilidad de un paciente a trastornos olfativos (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington).
- 30 De acuerdo con lo anterior, la presente descripción proporciona procedimientos para determinar si un paciente tiene una sensibilidad mayor a trastornos olfativos (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington) determinando, directa o indirectamente, si el individuo tiene un alelo variante de REEP y/o RTP o no. La presente descripción proporciona procedimientos para proporcionar un pronóstico de un riesgo incrementado de sufrir un trastorno olfativo a un individuo basándose en la presencia o ausencia de uno o más alelos variantes de REEP y/o RTP.

Se dispone de numerosos procedimientos para el análisis de las secuencias de ácido nucleico o polipéptidos variantes (p. ej., mutantes o polimórficas). Los ensayos para la detección de variantes (p. ej., polimorfismos o mutaciones) mediante análisis de los ácidos nucleicos entran dentro de varias categorías, incluidos, entre otros, ensayos de secuenciación directa, ensayos de polimorfismos de fragmentos, ensayos de hibridación y análisis de datos por ordenador. Se dispone de protocolos y kits o servicios comercialmente disponibles para realizar múltiples variaciones de estos ensayos. Se pueden realizar ensayos en combinación o en híbridos (p. ej., diferentes reactivos o tecnologías de varios ensayos se combinan para dar un ensayo). Los siguientes ejemplos de ensayos son ensayos de secuenciación directa útiles, ensayos de PCR, análisis mutaciones mediante dHPLC (p. ej., disponible en Transgenomic, Omaha, NE o Varian, Palo Alto, CA), ensayos de polimorfismos de longitud de fragmento (p. ej., RFLP o CFLP (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.843.654; 5.843.669; 5.719.208; y 5.888.780), ensayos de hibridación (p. ej., detección directa de hibridación, detección de hibridación usando ensayos de circuitos de ADN (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 6.045.996; 5.925.525; 5.858.659; 6.017.696; 6.068.818; 6.051.380; 6.001.311; 5.985.551; 5.474.796; las publicaciones PCT WO 99/67641 y WO 00/39587, detección enzimática de la hibridación (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº. 5.846.717. 6.090.543; 6.001.567; 5.985.557; 5.994.069; 5.962.233; 5.538.848; 5.952.174 y 5.919.626), polimorfismos detectados directa o indirectamente (p. ej., detección de secuencias (otros polimorfismos) que están en desequilibrio de unión con el polimorfismo que se va a identificar; por ejemplo, se pueden usar otras secuencias en el locus SPG-6; este procedimiento se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.612.179) y ensayos de espectrometría de masas.

- 55 Además, los ensayos para la detección de las proteínas REEP y/o RTP variantes pueden encontrar utilidad (p. ej., procedimientos de traducción sin células, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.303.337) y ensayos de unión a anticuerpos. La generación de anticuerpos que reconocen específicamente proteínas mutantes frente a silvestres se trata a continuación.

B. Kits para analizar el riesgo de trastornos olfativos

La presente descripción también proporciona kits para determinar si un individuo contiene o no un alelo o polipéptido de REEP y/o RTP silvestre o variante (p. ej., polimórfico o mutante). Los kits pueden ser útiles para determinar si el sujeto están en riesgo de desarrollar un trastorno olfativo (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores

5 de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington). Los kits para diagnóstico se producen de diversos modos. Los kits pueden contener al menos un reactivo para detectar específicamente un alelo o proteína mutante de REEP y/o RTP. El reactivo es un ácido nucleico que hibrida con ácidos nucleicos que contienen la mutación y que no se une a ácidos nucleicos que no contienen la mutación. Los reactivos pueden ser cebadores para amplificar la región del

10 ADN que contiene la mutación. Los reactivos pueden ser anticuerpos que se unen, preferentemente, a las proteínas de REEP y/o RTP silvestres o mutantes.

El kit puede contener instrucciones para determinar si el sujeto está en riesgo de sufrir un trastorno olfativo (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington). Las instrucciones 15 pueden especificar dicho riesgo de desarrollar un trastorno olfativo y dicho riesgo se puede determinar detectando la presencia o ausencia de un alelo mutante de REEP y/o RTP en el sujeto, en el que los sujetos que tienen un alelo mutante tienen un mayor riesgo de desarrollar un trastorno olfativo.

20 La presencia o ausencia de una mutación asociada con la enfermedad en un gen de REEP y/o RTP se puede usar para tomar decisiones terapéuticas u otras de tipo médico. Por ejemplo, se pueden elegir pares con antecedentes familiares de enfermedades relacionadas con los receptores de olores para concebir un niño a través de fertilización *in vitro* y detección selectiva genética previa a la implantación. En este caso, los embriones fertilizados se someten a 25 detección selectiva de alelos mutantes (p. ej., asociados con una enfermedad) de un gen de REEP y/o RTP y solo se implantan en el útero los embriones con alelos silvestres.

25 La detección selectiva en útero se puede realizar en un feto en desarrollo (p. ej., amniocentesis o detección selectiva de vellosidades coriónicas). Se puede efectuar una detección selectiva genética de neonatos o de niños muy pequeños. La detección precoz de un alelo de REEP y/o RTP que se sabe que está asociado con un trastorno olfativo permite una intervención temprana (p. ej., terapias genéticas o farmacéuticas).

30 Los kits pueden incluir reactivos auxiliares tales como agentes tampón, reactivos de estabilización de ácido nucleico, reactivos de estabilización de proteínas y sistemas de producción de señal (p. ej., sistemas de generación de fluorescencia como sistemas Fret). El kit de ensayo puede estar envasado de cualquier manera adecuada, normalmente con los elementos en un único contenedor o varios contenedores según sea necesario, junto con una hoja de instrucciones para llevar a cabo el ensayo. Preferentemente, los kits pueden también incluir una muestra de control positivo.

C. Bioinformática

35 La presente descripción proporciona procedimientos para determinar el riesgo de un individuo de desarrollar un trastorno olfativo (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington) basándose en la presencia de uno o más alelos variantes de un gen de REEP y/o RTP. El análisis de 40 los datos de las variantes se puede procesar con un ordenador usando la información almacenada en un ordenador (p. ej., en una base de datos). Por ejemplo, se proporciona un sistema de investigación de bioinformática que comprende una pluralidad de ordenadores que dirigen un objeto multiplataforma de programación de idioma orientada (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.125.383). En algunas realizaciones, uno de los ordenadores almacena los datos genéticos (p. ej., el riesgo de poner en contacto un trastorno olfativo relacionado con REEP y/o RTP asociado con un polimorfismo dado, así como las secuencias). Uno de los ordenadores puede 45 almacenar programas de aplicación (p. ej., para analizar los resultados de los ensayos de detección). Después, los resultados se entregan al usuario (p. ej., mediante uno de los ordenadores o mediante Internet).

Por ejemplo, un programa de análisis basado en ordenador se puede usar para traducir los datos brutos generados por el ensayo de detección (p. ej., la presencia, ausencia o cantidad de un alelo o polipéptido de REEP y/o RTP dado) en datos de valor predictivo para un clínico. El clínico puede acceder a los datos predictivos usando cualquier medio adecuado. Por tanto, la presente descripción proporciona el beneficio adicional de que el clínico, que no es probable que esté formado en genética o en biología molecular, no necesita entender los datos brutos. Los datos se presentan directamente al clínico en su forma más útil. Después, el clínico podrá usar inmediatamente la información con el fin de optimizar los cuidados del sujeto.

55 La presente descripción contempla cualquier procedimiento capaz de recibir, procesar y transmitir la información a y desde los laboratorios que realizan los ensayos, proveedores de información, personal médico y sujetos. Por ejemplo, se puede obtener una muestra (p. ej., una muestra de biopsia o de suero o de orina) de un sujeto y someterla a un servicio de perfiles (p. ej., el laboratorio clínico en un centro médico, negocios de perfil genómico etc.) localizado en cualquier parte del mundo (p. ej., en un país diferente al país en el que reside el sujeto o en el que la información se va a usar en última instancia) para generar los datos brutos. Cuando la muestra comprende un

tejido u otra muestra biológica, el sujeto puede acudir a un centro médico para que se le extraiga la muestra, que se enviará al centro de realización del perfil, o los sujetos pueden obtener ellos mismos la muestra (p. ej., una muestra de orina) y enviarla directamente a un centro de realización de perfiles. Cuando la muestra comprende información biológica determinada previamente, el sujeto puede enviar la información se puede enviar directamente al servicio de realización de perfiles (p. ej., un ordenador puede escanear una tarjeta de información que contiene la información y transmitir los datos a un ordenador del centro de realización de perfiles usando un sistema de comunicación electrónica). Una vez recibida por el servicio de realización de perfiles, la muestra se procesa y se produce un perfil (es decir, la presencia de genes o polipéptidos de REEP y/o RTP silvestres o mutantes), específico para la información diagnóstica o pronóstica deseada por el sujeto.

10      Despues, los datos del perfil se preparan en un formato adecuado para su interpretación por un clínico encargado del tratamiento. Por ejemplo, en lugar de proporcionar datos brutos, el formato preparado puede representar un diagnóstico o evaluación de riesgos (p. ej., la probabilidad de desarrollar un trastorno olfativo relacionado con REEP y/o RTP) para el sujeto, junto con recomendaciones de opciones terapéuticas concretas. Los datos se pueden mostrar al clínico mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, el servicio de realización de perfiles genera un informe que se puede imprimir para el clínico (p. ej., en el centro de atención) o mostrar al clínico en un monitor de ordenador.

15      La información se puede analizar primero en el centro de atención o en una instalación regional. Despues, los datos brutos se envían a una instalación de procesamiento central para su posterior análisis y/o para convertir los datos brutos en información útil para un clínico o un paciente. La instalación de procesamiento central proporciona la ventaja de privacidad (todos los datos se almacenan en una instalación central con protocolos de seguridad uniformes), velocidad y uniformidad de los análisis de datos. A continuación, la instalación de procesamiento central puede controlar el destino de los datos tras el tratamiento del sujeto. Por ejemplo, usando un sistema de comunicación electrónica, la instalación central puede proporcionar datos al clínico, al sujeto o a los investigadores.

20      El sujeto puede ser capaz de acceder directamente a los datos usando el sistema de comunicación electrónica. Segun los resultados, el sujeto puede elegir intervención o asesoramiento adicionales. Los datos se pueden usar para fines de investigación. Por ejemplo, los datos se pueden usar para optimizar además la asociación de un alelo de REEP y/o RTP dado con trastornos olfativos.

#### V. Generación de anticuerpos frente a REEP y RTP

25      La presente descripción proporciona anticuerpos aislados o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos FAB). Los anticuerpos se pueden generar para permitir la detección de proteínas REEP y/o RTP (p. ej., silvestres o mutantes) de la presente invención. Los anticuerpos se pueden preparar usando varios inmunógenos. El inmunógeno puede ser un péptido de REEP y/o RTP humano para generar anticuerpos que reconocen REEP y/o RTP humano. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, policlonales, monoclonales, químicos, de cadena sencilla, fragmentos Fab, bibliotecas de expresión de Fab o anticuerpos recombinantes (p. ej., químicos, humanizados etc.), siempre que puedan reconocer la proteína. Los anticuerpos se pueden producir usando una proteína de la presente invención como antígeno de acuerdo con un procedimiento convencional de preparación de anticuerpos o de antisuero.

30      Se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra un polipéptido de REEP y/o RTP. Para la producción de un anticuerpo se pueden inmunizar varios animales huéspedes mediante inyección con el péptido correspondiente al epítopo de REEP y/o RTP, incluidos, entre otros, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras etc. El péptido se puede conjugar con un vehículo inmunogénico (por ejemplo, toxoide diftérico, seroalbúmina bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH)). Se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica dependiendo de la especie huésped, incluidos, entre otros, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias de superficie activa (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol) y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de *Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

35      Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a REEP y/o RTP, se contempla que cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante cultivos continuos de líneas celulares encontrarán utilidad con la presente invención (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estas incluyen, entre otras, la técnica del hibridoma inicialmente desarrollada por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein 1975, *Nature* 256:495-497 [1975]), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (véase, por ejemplo, Kosbor, y col., *Immunol. Tod.* 4:72 [1983]) y la técnica del hibridoma con EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96 [1985]).

40      Los anticuerpos monoclonales se pueden producir en animales sin gérmenes usando la tecnología como la descrita en el documento PCT/US90/02545. Adicionalmente, se contempla que los anticuerpos humanos se generen mediante hibridomas humanos (Cote y col., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030[1983]) o transformando linfocitos B humanos con el virus de EBV *in vitro* (Cole y col., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96 [1985]).

Además, se contempla que las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de EE.UU. 4.946.778) encontrarán utilidad en la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos de REEP y/o RTP. Se pueden usar las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse, y col., Science, 246:1275-1281 [1989]) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fb monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de REEP y/o RTP.

La presente descripción contempló anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos frente a las proteínas de la presente descripción. Los anticuerpos recombinantes incluyen, entre otros, anticuerpos humanizados o químéricos. En la técnica se conocen procedimientos para generar anticuerpos recombinantes (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.180.370 y 6.277.969 y "Monoclonal Antibodies" H. Zola, BIOS Scientific Publishers Limited 2000. Springer-Verlay New York, Inc., New York ).

Se contempla que cualquier técnica adecuada para producir fragmentos de anticuerpos encontrarán utilidad en la generación de fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo (región de unión al antígeno) de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, entre estos fragmentos se incluyen: El fragmento F(ab')2 que se puede producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que se pueden generar mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')2 , y los fragmentos Fab que se pueden generar tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, se contempla que la detección selectiva del anticuerpo deseado se efectuará mediante técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencias de tipo western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (p. ej., ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis etc.

La unión del anticuerpo se puede detectar mediante detección de un marcador en el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se puede detectar detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo frente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario puede estar marcado. En la técnica se conocen muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo. Como es bien conocido en la técnica, el péptido inmunogénico debería proporcionarse sin la molécula vehículo usada en cualquier protocolo de inmunización. Por ejemplo, si el péptido estaba conjugado con KLH, se puede conjugar con BSA o usarse directamente en un ensayo de detección selectiva).

Los anteriores anticuerpos de la divulgación se pueden usar en procedimientos conocidos en la técnica en relación con la localización y la estructura de REEP y/o RTP (p. ej., para transferencia de tipo Western), medición de los niveles de los mismos en muestras biológicas adecuadas etc. Los anticuerpos se pueden usar para detectar REEP y/o RTP en una muestra biológica de un individuo. La muestra biológica puede ser un fluido biológico tal como, entre otros, sangre, suero, plasma, fluido intersticial, orina, líquido cefalorraquídeo y similares, que contienen las células.

Después, las muestras biológicas se pueden analizar directamente para determinar la presencia de REEP y/o RTP humano usando una estrategia (p. ej., ELISA o radioinmunoensayo) y un formato adecuados (p. ej., micropocillos, tira reactiva (p. ej., como se describe en la publicación de patente internacional WO 93/03367), etc. Como alternativa, las proteínas en la muestra se pueden separar por tamaño (p. ej., mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia o no de dodecilsulfato sódico (SDS) y la presencia de REEP y/o RTP se puede detectar mediante inmunotransferencia (transferencia de tipo Western). Las técnicas de inmunotransferencia son, en general, más eficaces con anticuerpos generados contra un péptido correspondiente a un epítopo de una proteína y, por tanto, son particularmente adecuadas para la presente invención.

Otro procedimiento usa anticuerpos como agentes para alterar la transducción de la señal. Se pueden usar anticuerpos específicos que se unen a los dominios de unión de REEP y/o RTP u otras proteínas implicadas en la señalización intracelular para inhibir la interacción entre las diversas proteínas y su interacción con otros ligandos. Los anticuerpos que se unen al complejo también se pueden usar terapéuticamente para inhibir las interacciones del complejo proteico en las vías de transducción de señal que conducen a los diversos efectos fisiológicos y celulares de REEP y/o RTP.

Dichos anticuerpos también se pueden usar en diagnóstico para medir la expresión anómala de REEP y/o RTP o la formación aberrante de complejos proteicos, que puede ser indicativo de un estado de enfermedad.

#### VI. Terapia génica usando REEP y RTP

La presente invención también proporciona procedimientos y composiciones adecuadas para terapia génica para alterar la expresión, producción o función de REEP y/o RTP, para investigación, generación de animales transgénicos y/u otras aplicaciones terapéuticas. Como se ha descrito en lo que antecede, la presente descripción proporciona genes de REEP y/o RTP humanos y proporciona procedimientos de obtención de genes de REEP y/o RTP de otras especies. Por tanto, los procedimientos que se describen más adelante son, en general, aplicables en muchas especies. Se contempla que la terapia génica se realiza proporcionando a un sujeto un alelo silvestre de un

gen de REEP y/o RTP (es decir, un alelo que no contiene un alelo de enfermedad de REEP y/o RTP (p. ej., libre de polimorfismos o mutaciones que causan enfermedad)). Los sujetos que necesitan dicha terapia se identifican mediante los procedimientos descritos en lo que antecede. Se pueden usar ácidos nucleicos terapéuticos estables o transitorios (p. ej., oligonucleótidos antisentido, ARNsi) para reducir o prevenir la expresión de proteínas mutantes.

5 Los genes se pueden eliminar para reducir o bloquear los sentidos de olfato deseados.

Los vectores virales que normalmente se usa para los procedimientos dirigidos y de terapia *in vivo* o *ex vivo* son vectores basados en ADN y vectores retrovirales. Los procedimientos para construir y usar vectores virales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Miller y Rosman, BioTech., 7: 980-990 [1992]). Preferentemente, los vectores virales son defectuosos en la replicación, es decir son incapaces de replicarse de forma autónoma en la célula diana. En general, el genoma de los vectores virales de replicación defectuosa que se usan carece de al menos una región que es necesaria para la replicación de los virus en la célula infectada. Estas regiones se pueden eliminar (en su totalidad o en parte) o se pueden hacer no funcionales por cualquier técnica conocida por un experto en la técnica. Estas técnicas incluyen la eliminación total, sustitución (por otras secuencias, en particular por el ácido nucleico insertado), delección parcial o adición de una o más bases en una región esencial (para replicación). Dichas técnicas pueden realizarse *in vitro* (es decir, en el ADN aislado) o *in situ*, usando las técnicas de manipulación genética o mediante tratamiento con agentes mutagénicos.

Preferentemente, el virus de replicación defectuosa conserva las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsidar las partículas virales. Los vectores virales de ADN incluyen virus de ADN atenuados o defectuosos, incluidos, entre otros, el virus del herpes simple (VHS), el papilomavirus, el virus de Epstein Barr (EBV), el adenovirus, el virus adenoasociado (AAV) y similares. Se prefieren virus defectuosos que carecen completamente o casi completamente de genes virales, ya que los virus defectuosos no son infecciosos después de su introducción en una célula. El uso de vectores virales defectivos permite la administración a las células en un área localizada específica, sin tener que preocuparse de que el vector pueda infectar a otras células. Por tanto, un tejido específico puede ser una diana específica. Ejemplos de vectores concretos incluyen, entre otros, vector del virus del herpes 2 defectivo (HSV1) [Kaplitt y col., Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330 (1991)], vector del virus del herpes defectivo que carece del ge de la glicoproteína L (véase, por ejemplo, la publicación de patente RD 371005 A), u otros vectores del virus del herpes defectivo (véase, por ejemplo, los documentos WO 94/21807 y WO 92/05263); un vector adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col. (J. Clin. Invest. 90:626-630 [1992]; véase también La Salle y col., Science 259:988-990 [1993]); y un vector de virus adenoasociado defectivo (Samulski y col., J. Virol. 61:3096-3101 [1987]; Samulski y col., J. Virol. 63:3822-3828 [1989]; Lebkowski y col., Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 [1988]).

Preferentemente, para la administración *in vivo*, se empela un tratamiento inmunosupresor adecuado junto con le vector viral, por ejemplo vector adenovirus, para evitar la immunodesactivación del vector viral y las células transfectadas. Por ejemplo, las citocinas inmunosupresoras, como la interleucina-12 (IL12), el interferón gamma (IFN-γ) o el anticuerpo anti-CD4, se pueden administrar para bloquear las respuestas humorales o celulares a los vectores virales. Además, es ventajoso emplear un vector viral que se ha sometido a ingeniería para expresar un número mínimo de antígenos.

El vector puede ser un vector adenovirus. Los adenovirus son virus de ADN eucarióticas que se pueden modificar para liberar de forma eficiente un ácido nucleico de la invención a diversos tipos celulares. Existen varios serotipos de adenovirus. De estos serotipos se da preferencia, dentro del alcance de la presente invención, a los adenovirus humanos de tipo 2 o de tipo 5 (Ad 2 o Ad 5), o adenovirus de origen animal (véase, por ejemplo, el documento WO 94/26914). Estos adenovirus de origen animal que se pueden usar incluyen adenovirus de origen canino, bovino, murino (p. ej., Mav1, Beard y col., Virol., 75-81 [1990]), ovino, porcino, aviar y simio (p. ej., SAV). Preferentemente, el adenovirus de origen animal es un adenovirus canino, más preferentemente un adenovirus CAV2 (p. je., la cepa Manhattan o A26/61 (ATCC VR-800)).

Preferentemente, los vectores adenovirus de replicación defectuosa como se describen en el presente documento comprenden los ITR, una secuencia de encapsidación y el ácido nucleico de interés. Todavía más preferentemente, al menos la región E1 del vector adenovirus es no funcional. La delección en la región E1 se extiende, preferentemente, desde los nucleótidos 455 a 3329 en la secuencia del adenovirus Ad5 (fragmento Pvull-BgII) o de 382 a 3446 (fragmento *Hinf*I-Sau3A). Otras regiones también se pueden modificar, en concreto la región E3 (p. ej., el documento WO95/02697), la región E2 (p. ej., el documento WO94/28938), la región E4 (p. ej., los documentos WO94/28152, WO94/12649 y WO95/02697), o en cualquiera de los genes tardíos L1-L5.

El vector adenoviral puede tener una delección en la región E1 (Ad 1,0). Ejemplos de adenovirus con delección de E1 se divulgán en el documento EP 185,573. El vector adenoviral puede tener una delección en las regiones E1 y E4 (Ad 3,0). Ejemplos de adenovirus con delección en E1/E4 se divulgán en los documentos WO95/02697 y WO96/22378. El vector adenoviral puede tener una delección en la región E1 en la que se insertan la región E4 y la secuencia de ácido nucleico.

Los adenovirus recombinantes de replicación defectuosa como se describen en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica (véase por ejemplo, Levrero y col., Gene 101:195 [1991]; documento EP 185 573; y Graham, EMBO J., 3:2917 [1984]). En particular, se pueden preparar

mediante recombinación homóloga entre un adenovirus y un plásmido que porta, entre otros, la secuencia de ADN de interés. La recombinación homóloga se consigue tras la cotransfección del adenovirus y el plásmido en una línea celular adecuada. La línea celular que se usa deberá ser, preferentemente, (i) transformable por los elementos que se van a usar y (ii) contener las secuencias que son capaces para complementar la parte del genoma del adenovirus de replicación defectuosa, preferentemente en forma integrada con el fin de evitar los riesgos de recombinación. Ejemplos de líneas celulares que se pueden usar son la línea de células renales embrionarias humanas 293 (Graham y col., J. Gen. Virol., 36:59 [1977]), que contiene la porción izquierda del genoma de un adenovirus Ad5 (12 %) integrada en su genoma, y líneas celulares que son capaces de complementar las funciones de E1 y E4, como se ha descrito en las solicitudes WO 94/26914 y WO 95/02697. Los adenovirus recombinantes se recuperan y purifican usando técnicas de biología molecular estándar que son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los virus adenoasociados (AAV) son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que se pueden integrar, de un modo estable y específico de sitio, en el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, su morfología o diferenciación, y no parecen estar implicados en enfermedades humanas. El genoma de AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Abarca aproximadamente 4.700 bases y contiene una región de repetición terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve como origen de replicación para el virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que portan las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen *rep* implicado en la replicación viral y la expresión de los genes virales; y la parte derecha del genoma, que contiene el gen *cap* que codifica las proteínas de la cápside del virus.

Se ha descrito el uso de vectores derivados de los AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* (véase, por ejemplo, los documentos WO 91/18088; WO 93/09239; la patente de EE.UU. Nº 4.797.368; la patente de EE.UU. Nº 5.139.941; y EP 488 528). Estas publicaciones describen varias construcciones derivadas de AAV en las que los genes *rep* y/o *cap* se delecionan y sustituyen con un gen de interés, y el uso de estas construcciones para transferir el gen de interés *in vitro* (en células cultivadas) o *in vivo* (directamente en un organismo). Los AAV recombinantes de replicación defectuosa de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante cotransfección de un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminal invertidas (ITR) de AAV y un plásmido portador de los genes de encapsidación del AAV (genes *rep* y *cap*) en una línea celular que se infecta con un virus colaborador humano (por ejemplo un adenovirus). Los AAV recombinantes que se producen se purifican después mediante técnicas estándar.

El gen se puede introducir en un vector retroviral (p. ej., como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.399.346. 4.650.764. 4.980.289 y 5.124.263 Mann y col., Cell 33:153 [1983]; Markowitz y col., J. Virol., 62:1120 [1988]; PCT/US95/14575; EP 453242; EP178220; Bernstein y col. Genet. Eng., 7:235 [1985]; McCormick, BioTechnol., 3:689 [1985]; el documento WO 95/07358; y Kuo y col., Blood 82:845 [1993]). Los retrovirus son virus de integración que infectan las células en división. El genoma del retrovirus incluye dos LTR, una secuencia de encapsidación y tres regiones de codificación (*gag*, *pol* y *env*). En los vectores retrovirales recombinantes, los genes *gag*, *pol* y *env* normalmente se delecionan, completamente o en parte, y se sustituyen con una secuencia de ácido nucleico heterólogo de interés. Estos vectores se pueden construir a partir de diferentes tipos de retrovirus, tales como, VIH, MoMuLV ("virus Moloney de la leucemia murina" MSV ("virus del sarcoma Moloney murino"), HaSV ("virus del sarcoma de Harvey virus"); SNV ("virus de la necrosis del bazo"); RSV ("virus del sarcoma de Rous") y virus Friend.

Vectores retrovirales defectuosos también se divulan en el documento WO95/02697.

En general, con el fin de construir retrovirus recombinantes que contienen una secuencia de ácido nucleico, se construye un plásmido que contiene las LTR, la secuencia de encapsidación y la secuencia de codificación. Esta construcción se usa para transfectar una línea celular concentrada, en la que la línea celular puede suministrar en trans las funciones retrovirales que son deficientes en el plásmido. En general, las líneas celulares concentradas son, por tanto, capaces de expresar los genes *gag*, *pol* y *env*. Dichas líneas celulares concentradas se han descrito en la técnica anterior, en particular la línea celular PA317 (patente de EE.UU. Nº 4.861.719, la línea celular PsiCRIP (véase el documento WO90/02806) y la línea celular GP+envAm-12 (véase el documento WO89/07150). Además, los vectores retrovirales recombinantes pueden contener modificaciones dentro de las LTR para suprimir la actividad transcripcional, así como secuencias de encapsidación extensas que pueden incluir una parte del gen *gag* (Bender y col., J. Virol., 61:1639 [1987]). Los vectores retrovirales recombinantes se purifican mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Como alternativa, el vector se puede introducir *in vivo* mediante lipofección. Durante la última década se ha producido un uso creciente de liposomas para encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas se pueden usar para preparar liposomas para la transfección *in vivo* o un gen que codifica un marcador (Feigner, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417 [1987]; véase también Mackey, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031 [1988]; Ulmer y col., Science 259:1745-1748 [1993]). El uso de lípidos catiónicos puede estimular la encapsulación de ácidos nucleicos con carga negativa y también promueve la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner and Ringold, Science 337:387-388 [1989]). Compuestos y composiciones lipídicas particularmente útiles para transferir ácidos nucleicos se describen en los documentos WO95/18863 y WO96/17823, y en la patente de EE.UU. Nº 5.459.127.

Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (p. ej., el documento WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (p. ej., el documento WO96/25508), o un polímero catiónico (p. ej., el documento WO95/21931).

5 También es posible introducir el vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo. Procedimientos para formular y administrar ADN desnudo al tejido muscular de mamífero se divultan en las patentes de EE.UU. Nº 5.580.859 y 5.589.466.

10 Los vectores de ADN para terapia génica se pueden introducir en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación en fosfato cálcico, el uso de una pistola génica o el uso de un transportador del vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem., 267:963 [1992]; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 263:14621 [1988]; y Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726 [1991]). La liberación de ADN mediada por receptores también se pueden usar [Curiel y col., Hum. Gene Ther., 3:147 [1992]; y Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429 [1987]].

15 VII. Animales transgénicos que expresan genes exógenos de REEP y RTP y homólogos, mutantes y variantes de los mismos

20 La presente descripción contempla la generación de animales transgénicos que comprenden un gen exógeno de REEP y/o RTP u homólogos, mutantes o variantes de los mismos. El animal transgénico puede exhibir un fenotipo alterado en comparación con los animales silvestres. El fenotipo alterado puede ser la sobreexpresión de ARNm para un gen de REEP y/o RTP en comparación con los niveles de expresión de REEP y/o RTP silvestres. El fenotipo alterado puede ser la expresión disminuida de ARNm para un gen de REEP y/o RTP endógeno en comparación con los niveles de expresión de REEP y/o RTP silvestres. Los animales transgénicos pueden comprender alelos mutantes de REEP y/o RTP. Los procedimientos para analizar la presencia o ausencia de dichos fenotipos incluyen transferencia Northern, ensayos de protección de ARNm y RT-PCR. Los ratones transgénicos pueden tener una mutación defectiva de un gen de REEP y/o RTP. Los animales transgénicos pueden exhibir una sensibilidad alterada a los trastornos olfativos (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington).

25 Dichos animales encuentran utilidad en aplicaciones de investigación (p. ej., identificación de vías de señalización en las que participa una proteína de REEP y/o RTP), así como en aplicaciones de detección selectiva de un fármaco (p. ej., para detectar fármacos que previenen o tratan trastornos olfativos). Por ejemplo, los compuestos de ensayo (p. ej., un fármaco que se sospecha que es útil para tratar un trastorno olfativo) se pueden administrar a los animales transgénicos y a los animales control con un alelo de REEP y/o RTP silvestre y se pueden evaluar los efectos. Después, se evalúan los efectos de los compuestos de ensayo y control sobre los síntomas de enfermedad.

30 Los animales transgénicos se pueden generar mediante diversos procedimientos. Se pueden usar células embrionarias en varias etapas del desarrollo para introducir transgenes para la producción de animales transgénicos. Se usan diferentes procedimientos en función de la etapa de desarrollo de la célula embrionaria. El cigoto es la mejor diana para la microinyección. En el ratón, el pronúcleo masculino alcanza el tamaño de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro que permite la inyección reproducible de 1-2 picolitros (pl) de solución de ADN. El uso de cigotos como diana para la transferencia génica tiene una gran ventaja en cuando a que, 35 en la mayoría de los casos, el ADN inyectado se incorporará en el genoma del huésped antes de la primera escisión (Brinster y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 [1985]). Como consecuencia, todas las células del animal transgénico no humano portarán el transgen incorporado. En general, esto también se reflejará en la transmisión eficiente del transgen a la descendencia del fundador, dado que el 50 % de las células germinales alojarán el transgen.

40 45 La patente de EE.UU. Nº 4.873.191 describe un procedimiento para la microinyección de cigotos.

50 Se puede usar la infección retroviral para introducir transgenes en un animal no humano. El vector retroviral se puede utilizar para transfectar oocitos inyectando el vector retroviral en el espacio perivitelino del oocito (patente de EE.UU. Nº 6.080.912). El embrión no humano en desarrollo se puede cultivar *in vitro* hasta la etapa de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260 [1976]). Una infección eficiente de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para eliminar la zona pelúcida (Hogan y col., en Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1986]). El sistema de vector viral usado para introducir el transgen normalmente es un retrovirus de replicación defectuosa portador del transgen (Jahner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927 [1985]). La transfección se obtiene fácil y eficientemente mediante cultivo de los blastómeros en una monocapa de las células productoras de virus (Van der Putten, anteriormente; Stewart, y col., EMBO J., 6: 383 [1987]). Como alternativa, la infección se puede realizar en una etapa posterior. El virus o las células productoras de virus se pueden inyectar en el blastocele (Jahner y col., Nature 298: 623 [1982]). La mayoría de los fundadores será mosaico para el transgen, ya que la incorporación solo se produce en una subpoblación de células que forman el animal transgénico. Adicionalmente, el fundador puede contener varias inserciones retrovirales del transgen en diferentes posiciones en el genoma, que generalmente se segregarán en la descendencia. Además, también es posible

introducir transgenes en la línea germinal, pero con baja eficiencia, mediante infección retroviral intrauterina del embrión a mitad de la gestación (Jahner y col., anteriormente [1982]). Medios adicionales de usar retrovirus o vectores retrovirales para crear animales transgénicos conocidos en la técnica implican la microinyección de partículas retrovirales o células tratadas con mitomicina C que producen retrovirus en el espacio perivitelino de huevos fertilizados o embriones tempranos (solicitud internacional de PCR WO 90/08832 [1990], y Haskell y Bowen, Mol. Reprod. Dev., 40:386 [1995]).

El transgen se puede introducir en células madre embrionarias y las células madre transfectadas se usan para formar un embrión. Las células ES se obtienen cultivando embriones de preimplantación *in vitro* en las condiciones adecuadas (Evans y col., Nature 292:154-156 [1981]; Bradley y col., Nature 309:255-258 [1984]; Gossler y col., Proc. Acad. Sci. USA 83:9065-9069 [1986]; y Robertson y col., Nature 322:445 [1986]) Los transgenes se pueden introducir de forma eficiente en las células ES mediante transfección de ADN a través de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos coprecipitación en fosfato cálcico, fusión de protoplastos y esferoplastos, lipofección y transfección mediada por DEAE-dextrano. Los transgenes también se pueden introducir en células ES no humanas mediante transducción mediada por retrovirus o mediante microinyección. Dichas células ES transfectadas pueden colonizar después un embrión tras su introducción en el blastocele de un embrión en estadio de blastocisto y contribuye a la línea germinal del animal químérico resultante (para revisión, véase Jaenisch, Science 240:1468 [1988]). Antes de la introducción de células ES transfectadas en el blastocele, las células ES transfectadas pueden someterse a varios protocolos de la selección para enriquecer las células ES que tienen integrado el transgen suponiendo que el transgen proporciona un medio para dicha selección. Como alternativa, la reacción en cadena de la polimerasa se puede usar para la detección selectiva de células ES que tienen integrado el transgen. Esta técnica obvia la necesidad de crecimiento de las células ES transfectadas en condiciones selectivas adecuadas antes de la transferencia al blastocele.

Se puede usar recombinación homóloga para inactivar la función génica o crear mutantes de delección (p. ej., mutantes en los que se ha delecionado un dominio concreto de REEP y/o RTP). Los procedimientos para la recombinación homóloga se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 5.614.396.

#### VIII. Detección selectiva de compuestos usando REEP y RTP

El ácido nucleico y los polipéptidos aislados de los genes de REEP y/o RTP de la presente descripción (p. ej., SEC ID N° 1-50) y proteínas y ácidos nucleicos relacionados se pueden usar en aplicaciones de detección selectiva de fármacos para compuestos que alteran (p. ej., potencian o inhiben) la actividad y la señalización de REEP y/o RTP. La presente descripción también proporciona procedimientos de identificación de ligandos y vías de señalización de las proteínas de REEP y/o RTP de la presente invención.

La presente descripción no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario comprender el mecanismo para ponerla en práctica. No obstante, basándose en los experimentos de análisis de la expresión de OR realizados durante el transcurso de la presente invención, se contempla que las proteínas de la familia de REEP y/o RTP funcionan estimulando la localización en la superficie celular del receptor del olor y la expresión funcional.

La presente descripción proporciona procedimientos de detección selectiva de compuestos según su capacidad para alterar la actividad de REEP y/o RTP mediada por ligandos naturales (p. ej., identificados usando los procedimientos descritos anteriormente). Dichos compuestos encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades mediadas por REEP y/o RTP (p. ej., trastornos olfativos), la alteración de las respuestas sensoriales olfativas y similares.

La presente descripción proporciona procedimientos de detección selectiva de compuestos según su capacidad para interaccionar con ácido nucleico mutante de REEP y/o RTP y/o polipéptidos mutantes de REEP y/o RTP, al mismo tiempo que no interaccionan simultáneamente con el ácido nucleico silvestre de REEP y/o RTP (p. ej., las SEC ID N° 1-20) y/o polipéptidos silvestres de REEP y/o RTP (p. ej., las SEC ID N° 21-50).

Dichos compuestos encuentran utilidad en el tratamiento de trastornos olfativos facilitados por la presencia de formas mutantes de ácidos nucleicos y/o proteínas de REEP y/o RTP.

La actividad de los OR localizados en la superficie celular en células que expresan polipéptidos exógenos de REEP y/o RTP se puede evaluar e respuesta a los compuestos (p. ej., candidatos o ligandos o inhibidores).

Una técnica usa anticuerpos frente a REEP, RTP, u OR generados como se ha tratado anteriormente. Dichos anticuerpos son capaces de unirse específicamente a los péptidos de REEP, RTP, u OR y compiten con un compuesto de ensayo por la unión a los péptidos de REEP, RTP, u OR. Se pueden llevar a cabo detecciones selectivas similares con bibliotecas de moléculas pequeñas, aptámeros etc.

La presente descripción contempla el uso de líneas celulares transfectadas con genes de REEP y/o RTP y variantes de los mismos para la detección selectiva de compuestos según su actividad y, en particular, para la detección selectiva de alto rendimiento de compuestos de bibliotecas combinatorias (p. ej., bibliotecas que contienen más de  $10^4$  compuestos). Las líneas celulares de la presente invención se pueden usar en diversos procedimientos de detección selectiva. Las células se pueden usar en ensayos de segundo mensajero que monitorizan la transducción de señal tras la activación de receptores de superficie celular. Las células se pueden usar en ensayos de gen

indicador que monitorizan las respuestas celulares a nivel de transcripción/traducción.

En ensayos de segundo mensajero, las células huésped se transfecstan, preferentemente, como se ha descrito anteriormente con vectores que codifican REEP y/o RTP o variantes o mutantes de los mismos. Después, las células huésped se tratan con un compuesto o pluralidad de compuestos (p. ej., de una biblioteca combinatoria) y se

- 5 analiza la presencia o ausencia de una respuesta. Se contempla que al menos algunos de los compuestos de la biblioteca combinatoria pueden servir como agonistas, antagonistas, activadores o inhibidores de la proteína o proteínas codificadas por los vectores o de los OR localizados en la membrana celular. También se contempla que al menos algunos de los compuestos de la biblioteca combinatoria pueden servir como agonistas, antagonistas, activadores o inhibidores de la proteína que actúa antes o después de la proteína codificada por el vector en una vía de transducción de señal.

10 Los ensayos de segundo mensajero pueden medir las señales fluorescentes de moléculas indicadoras que responden a cambios intracelulares (p. ej., concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , potencial de membrane, pH,  $\text{IP}_3$ , AMPc', liberación de ácido araquidónico) debido a la estimulación de los receptores de membrana y canales iónicos (p. ej., canales iónicos dependientes de ligando; véase Denyer y col., Drug Discov. Today 3:323 [1998]; y Gonzales y col., 15 Drug. Discov. Today 4:431-39 [1999]). Ejemplos de moléculas indicadoras incluyen, entre otras, sistemas FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) (p. ej., Cuo-lípidos y oxonoles, EDAN/DABCYL), indicadores sensibles a calcio (p. ej., Fluo-3, FURA 2, INDO 1, and FLUO3/AM, BAPTA AM), indicadores sensibles a cloruro (p. ej., SPQ, SPA), indicadores sensibles a potasio (p. ej., PBFI), indicadores sensibles a sodio (p. ej., SBFI) e indicadores sensibles a pH (p. ej., BCECF).

- 20 En general, las células huésped se cargan con el indicador antes de la exposición al compuesto. Las respuestas de las células huésped al tratamiento con los compuestos se pueden detectar mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, microscopia de fluorescencia, microscopia confocal (p. ej., sistemas FCS), citometría de flujo, dispositivos microfluídicos, sistemas FLIPR (véase, por ejemplo, Schroeder and Neagle, J. Biomol. Screening 1:75 [1996]), y sistemas de lectura de placas. La respuesta (p. ej., incremento de la intensidad de la 25 fluorescencia) producida por el compuesto de actividad desconocida se puede comparar con la respuesta generada por un agonista conocido y se expresa como un porcentaje de la respuesta máxima del agonista conocido. La respuesta máxima producida por un agonista conocido se define como una respuesta de 100 %. Asimismo, la respuesta máxima registrada tras la adición de un agonista a una muestra que contiene un antagonista conocido o de ensayo es detectablemente menor que la respuesta del 100 %.

- 30 Las células también son útiles en ensayos génicos indicadores. Los ensayos génicos indicadores implican el uso de células huésped transfectadas con vectores que codifican un ácido nucleico que comprende elementos de control de la transcripción de un gen diana (es decir, un gen que controla la expresión biológica y la función de una enfermedad diana) sometidas a corte y empalme a una secuencia de codificación para un gen indicador. Por tanto, la activación del gen diana tiene como resultado la activación del producto genético indicador.

- 35 Los compuestos de ensayo de la presente descripción se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos abordajes en procedimientos de bibliotecas combinatorias combinados en la técnica, uncluyend bibliotecas biológicas, bibliotecas peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de los péptidos pero con una nueva estructura no peptídica, que son resistentes a la degradación enzimática pero que, no obstante, siguen siendo bioactivos; véase, por ejemplo, Zuckennann y col., J. Med. Chem. 37: 2678-85 [1994]); bibliotecas de fase en 40 solución o de fase sólida paralela absorbable espacialmente; procedimientos de biblioteca sintética que requiere desconvolución; el procedimiento de biblioteca de "una perla un compuesto", y procedimientos con bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. Se prefieren los abordajes de la biblioteca biológica y la biblioteca peptoide para usar con bibliotecas peptídicas, mientras que los otros cuatro abordajes son aplicables a bibliotecas de oligómeros peptídicos, no peptídicos o de moléculas pequeñas de compuestos (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145).

- 45 También se puede evaluar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión de REEP y/o RTP a un compuesto, por ejemplo un receptor de olor. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante el acoplamiento del compuesto, por ejemplo el sustrato, con un radioisótopo o marcador enzimático de modo que la unión del compuesto, por ejemplo el sustrato, a REEP y/o RTP se puede determinar detectando el compuesto marcado, por 50 ejemplo el sustrato, en un complejo.

- Como altrnativa, REEP y/o RTP se acopla con un radioisótopo o marcador enzimático para monitorizar la capacidad de un compuesto de ensato para modular la unión de REEP y/o RTP al sustrato de REEP y/o RTP en un complejo. Por ejemplo, los compuestos (p. ej., sustratos) se pueden marcar con  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^3\text{H}$ , bien directa o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento por centelleo. Como alternativa, los compuestos se pueden marcar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático se puede detectar mediante la determinación de la conversión de un sustrato adecuado en el producto.

- 55 Se puede evaluar la capacidad de un compuesto (p. ej., un receptor de olor) para interaccionar con REEP y/o RTP con o sin el marcaje de ninguno de los componentes que interaccionan. Por ejemplo, s epuede usar un microfisiómetro para detectar la interacción de un compuesto con REEP y/o RTP sin el marcaje del compuesto ni de

REEP y/o RTP (McConnell y col. Science 257:1906-1912 [1992]). Como se usa en el presente documento, un microfisiómetro (p. ej., Cytosensor) es un instrumento analítico que mide el índice al cual una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico dirigible por luz (LAPS). Los cambios en este índice de acidificación se pueden usar como indicador de la interacción entre un compuesto y un polipéptido de REEP y/o RTP.

- 5 Se puede proporcionar un ensayo sin células en el que la proteína REEP y/o RTP o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se evalúa la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a la proteína REEP y/o RTP o una porción biológicamente activa de la misma. Las porciones biológicamente activas preferidas de las proteínas REEP y/o RTP que se van a usar en ensayos de la presente invención incluyen fragmentos que participan en interacciones con sustratos u otras proteínas, por ejemplo fragmentos con puntuaciones altas de probabilidad en superficie.

10 Los ensayos sin células implican la preparación de una mezcla de reacción de la proteína del gen diana y el compuesto de ensayo en las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos componentes interactúen y se unan, de modo que formen un complejo que pueda eliminarse y/o detectarse.

15 La interacción entre dos moléculas también se puede detectar, por ejemplo, usando transferencia de energía de fluorescencia (FRET) (véase, por ejemplo, Lakowicz y col., patente de EE.UU. N° 5.631.169; Stavrianopoulos y col., patente de EE.UU. N° 4.968.103). Se selecciona un marcador fluoróforo de modo tal que la energía de fluorescencia emitida por una molécula del primer donante sea absorbida por un marcador fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez es capaz de brillar debido a la energía absorbida.

20 Como alternativa, la molécula proteica "donante" puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se eligen marcadores que emiten diferentes longitudes de onda de luz, de forma tal que la molécula "aceptora" se pueda diferenciar de la del "donante". Dado que la eficiencia de la transferencia de energía entre los marcadores está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se puede evaluar la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que se produce unión entre las moléculas, la emisión de fluorescencia de la molécula "aceptora" marcador en el ensayo deberá ser máxima. Un acontecimiento de unión

25 FRET se puede medir de forma conveniente a través de medios de detección fluorométrica estándar bien conocidos en la técnica (p. ej., usando un fluorímetro).

30 También se pueden identificar los moduladores de la expresión de REEP y/o RTP. Por ejemplo, una célula o una mezcla sin células se pone en contacto con un compuesto candidato y se evalúa la expresión del ARNm o la proteína de REEP y/o RTP respecto al nivel de expresión del ARNm o la proteína de REEP y/o RTP en ausencia del compuesto candidato. Cuando la expresión del ARNm o la proteína de REEP y/o RTP es mayor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como estimulador de la expresión de la proteína o el ARNm de REEP y/o RTP. Como alternativa, cuando la expresión de la proteína o el ARNm de REEP y/o RTP es inferior (estadística y significativamente menor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como inhibidor de la expresión de la proteína o el ARNm de REEP y/o RTP. El nivel de expresión de la proteína o el ARNm de REEP y/o RTP se puede determinar mediante procedimientos descritos en el presente documento para detectar el ARNm o la proteína de REEP y/o RTP.

35 Se puede identificar un agente modulador usando un ensayo basado o células o sin células y la capacidad del agente para modular la actividad de una proteína de REEP y/o RTP se puede confirmar *in vivo*, por ejemplo en un animal tal como un modelo de animal de enfermedad (p. ej., un animal con un trastorno olfativo relacionado con REEP y/o RTP).

#### B. Agentes terapéuticos

40 La presente descripción ataña adicionalmente a agentes nuevos identificados mediante los ensayos de detección selectiva descritos en lo que antecede. De acuerdo con esto, es de interés usar además un agente identificado como se describe en el presente documento (p. ej., un agente modulador o mimético de REEP y/o RTP, un anticuerpo específico de REEP y/o RTP, una pareja de unión de REEP y/o RTP o un agonista o inhibidor de OR) en un modelo animal adecuado (tal como los que se describen en el presente documento) para determinar la eficacia, toxicidad, efectos secundarios o mecanismo de acción del tratamiento con dicho agente. Además, como se ha descrito anteriormente, agentes nuevos identificados mediante los ensayos de detección selectiva descritos anteriormente se pueden usar para, por ejemplo, tratamientos de trastornos olfativos (p. ej., incluyendo, entre otros, trastornos olfativos).

#### IX. Composiciones farmacéuticas que contienen ácido nucleico, péptidos y análogos de REEP y RTP

45 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que pueden comprender todas o porciones de secuencias polinucleotídicas de REEP y/o RTP, polipéptidos de REEP y/o RTP, inhibidores o antagonistas de la bioactividad de REEP y/o RTP, incluidos anticuerpos solos o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, y pueden administrarse en cualquier transportador farmacéutico estéril biocompatible, incluidos, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua.

50 Los procedimientos de la presente invención encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades o estados

- fisiológicos alterados caracterizados por alelos mutantes de REEP y/o RTP (p. ej., infecciones de las vías respiratorias altas, tumores de la fosa craneal anterior, síndrome de Kallmann, síndrome de Foster Kennedy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington). Los péptidos se pueden administrar al paciente por vía intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución fisiológica salina. Se 5 pueden usar procedimientos estándar para la liberación intracelular de péptidos (p. ej., liberación mediante liposomas). Dichos procedimientos son bien conocidos para los expertos habituales en la técnica. Las formulaciones de la presente invención son útiles para administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. La administración terapéutica de un polipéptido intracelularmente también se puede conseguir usando terapia génica como se ha descrito en lo que antecede.
- 10 Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para un paciente cualquiera pueden depender de muchos factores, incluidos el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se va a administrar, el sexo, la hora y la vía de administración, el estado de salud general y la interacción con otros fármacos que se estén administrando de forma concurrente.
- 15 De acuerdo con lo anterior, las secuencias de nucleótidos de REEP y/o RTP y de aminoácidos de REEP y/o RTP se pueden administrar a un paciente en monoterapia o en combinación con otras secuencias de nucleótidos, fármacos u hormonas o en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con excipiente(s) u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser farmacéuticamente inerte. Las secuencias de polinucleótidos de REEP y/o RTP o las secuencias de aminoácidos de REEP y/o RTP se pueden administrar en monoterapia a un sujeto individual o que padece una enfermedad.
- 20 Dependiendo de la afección que se esté tratando, estas composiciones farmacéuticas se pueden formular y administrar por vía sistémica o local. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.). Las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral o transmucosa, así como liberación parenteral, incluida la administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o 25 intranasal.
- 30 Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración tisular o celular, en la formulación se usan penetrantes adecuados para atravesar la barrera concreta. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.
- 35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular usando soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica con posologías adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y similares, para ingestión oral o nasal por el paciente que se va a tratar.
- 40 Composiciones farmacéuticas adecuadas para usar incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto.. Por ejemplo, una cantidad eficaz de REEP y/o RTP puede ser la cantidad que suprime los síntomas relacionados con el trastorno olfativo. La determinación de las cantidades eficaces entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación proporcionada en el presente documento.
- 45 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden fabricarse de un modo conocido en la técnica, por ejemplo por medio de procedimientos convencionales mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, trituración, emulsificación, encapsulación, atropamiento o liofilización.
- 50 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- 55 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son cargas de hidratos de carbono o de proteínas, tales como azúcares, incluidos

lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas, incluidas arábiga y de tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

- 5 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentrado, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenlglol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación de productos o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (es decir dosificación).
- 10 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenlglol líquido con o sin estabilizantes.
- 15 Las composiciones que comprenden un compuesto de la descripción formulado en un vehículo farmacéutico aceptable se pueden preparar, introducir en un contenedor adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección para la que están indicadas. Para secuencias de polinucleotidos o de aminoácidos de REEP y/o RTP, las afecciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de una afección relacionada con trastornos olfativos.
- 20 La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de una sal y se puede formar con ácidos, incluidos, entre otros, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, mónico, succínico etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que son las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo lioflizado en histidina 1 mM-50 mM, sacarosa, un 0,1 %-2 % de sacarosa, un 2 %-7 % de manitol a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5 que se combina con tampón antes de usar.
- 25 Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la descripción, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Después, preferentemente, la dosis se puede formular en modelos animales (particularmente modelos murinos) para conseguir un intervalo de concentración circulante deseable que ajuste los niveles de REEP y/o RTP.
- 30 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de REEP y/o RTP que alivia los síntomas del estado de enfermedad. La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE<sub>50</sub>/DL<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios animales adicionales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. Las dosis de tales compuestos están, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o nula toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.
- 35 Cada médico escoge la dosificación exacta según el paciente que va a tratar. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Entre los factores adicionales que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada podrían administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento de la formulación concreta.
- 40 Las cantidades de dosificación normales varían de 0,01 a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, en función de la vía de administración. En la literatura se proporcionan guías en cuanto a dosificaciones y procedimientos de liberación (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 4.657.760, 5.206.344 o 5.225.212). Los expertos en la técnica usarán diferentes formulaciones para REEP y/o RTP y para los inhibidores de REEP y/o RTP. La administración en la médula ósea puede requerir liberación de un modo diferente de inyecciones intravenosas.
- 45 X. ARN de interferencia (ARNi)
- 50 El ARNi representa una defensa celular conservada en la evolución para controlar la expresión de genes extraños en la mayoría de los eucariotas, incluidos los seres humanos. El ARNi procede del ARN bicatenario (dsARN) y produce degradación del ARNm específica de secuencia de ARN monocatenarios diana homólogos en respuesta al dsARN. Los mediadores de la degradación del ARNm son dúplex de ARN de interferencia pequeño (siARN) que

normalmente se producen a partir de dsARN largo mediante escisión enzimática en la célula. Generalmente, los siARN tienen una longitud de aproximadamente veintiún nucleótidos (p. ej., 21-23 nucleótidos) y tienen una estructura de bases pareadas que se caracteriza por dos salientes de nucleótidos en 3'. Tras la introducción de un ARN pequeño, o ARNi, en la célula, se cree que la secuencia se libera a un complejo enzimático denominado RISC (complejo de silenciación inducido por ARN). El RISC reconoce la diana y la escinde con una endonucleasa. Se observa que si se liberan secuencias de ARN más grandes en una célula, la enzima RNAsa III (Dicer) convierte el dsARN más largo en fragmentos de siARN ds de 21-23 nucleótidos.

Los siARN sintetizados químicamente se han convertido en potentes reactivos para el análisis amplio del genoma de función génica de mamífero en células somáticas cultivadas. Más allá de su valor para la validación de la función génica, los siARN también poseen gran potencial como agentes terapéuticos específicos de gen (Tuschl and Borkhardt, Molecular Intervent. 2002; 2(3):158-67).

La transfección de los siARN en células animales tiene como resultado una potente silenciación postranscripcional y duradera de genes específicos (Caplen et al, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001; 98: 9742-7; Elbashir y col., Nature. 2001; 411:494-8; Elbashir y col., Genes Dev. 2001;15: 188-200; and Elbashir y col., EMBO J. 2001; 20: 6877-88).

Los procedimientos y composiciones para realizar ARNi con siARN se describen en la patente de EE.UU. Nº 6.506.559.

Los siARN son extraordinariamente eficaces en la disminución de cantidades del ARN objetivo y, por extensión, de las proteínas, a con frecuencia niveles indetectables. El efecto de silenciación puede durar varios meses y es extraordinariamente específico, ya que un apareamiento erróneo de nucleótidos entre el ARN diana y la región central del siARN con frecuencia es suficiente para prevenir la silenciación Brummelkamp et al, Science 2002; 296:550-3; and Holen et al, Nucleic Acids Res. 2002; 30:1757-66.

#### XI. ARNi para REEP y RTP

Como se ha tratado anteriormente, la presente descripción proporciona ARNi para inhibir la expresión del polipéptido de REEP y/o RTP en las células, los OR o los componentes de las vías implicadas en la expresión de la actividad de dichos componentes.

##### A. Diseño y análisis del ARNi para REEP y/o RTP

Con el fin de diseñar siARN para REEP y/o RTP (p. ej., dirigido al ARNm de REEP y/o RTP) en la técnica se dispone de herramientas de diseño de software (p. ej., en internet). Por ejemplo, la página web de Oligoengine tiene una de estas herramientas e diseño que encuentra candidatos de ARNi basándose en los criterios de Elbashir (Elbashir et al, Methods 2002; 26: 199-213). También se pueden usar otras herramientas de diseño, tal como la herramienta de diseño Cenix Bioscience ofrecida por Ambion. Además, también existe el dúplex de silenciación de Si2 ofrecido por Oligoengine.

También hay programas de software de plegamiento del ARN que permiten determinar si el ARNm tiene una tendencia a plegarse por sí mismo y formar una "horquilla" (que en el caso del dsARNi no es tan deseable, ya que un objetivo es tener el ARNi unido al ARNm y no a sí mismo) Una configuración preferida es una configuración abierta con tres o menos enlaces. En general, es deseable una G delta postiva para mostrar que no tendería a plegarse sobre sí mismo de forma espontánea.

Las moléculas de siARN candidatas que se generan se pueden someter a detección selectiva, por ejemplo, en un modelo animal de un trastorno olfativo para la evaluación cuantitativa de la expresión de REEP y/o RTP *in vivo* usando técnicas similares como se ha descrito anteriormente.

##### B. Casetes de expresión

Los siARN específicos de REEP y/o RTP de la presente descripción se pueden sintetizar químicamente. La síntesis química se puede conseguir mediante cualquier procedimiento conocido o descubierto en la técnica. Como alternativa, los siARN específicos de REEP y/o RTP de la presente descripción se pueden sintetizar mediante procedimientos que comprenden la síntesis mediante transcripción. La transcripción se puede producir *in vitro*, como a partir de un molde de AND y el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago o, *in vivo*, como a partir de un gen y un promotor.

El siARN dúplex de hebras separadas, en el que las dos hebras se sintetizan por separado y se hibridan, también se puede sintetizar químicamente por cualquier procedimiento conocido o descubierto en la técnica.

Como alternativa, los siARN ds se sintetizan mediante procedimientos que comprenden síntesis por transcripción. Las dos hebras de la región bicatenaria de un siARN se pueden expresar por separado mediante dos casetes de expresión diferentes, bien *in vitro* (p. ej., en un sistema de transcripción) o *in vivo* en una célula huésped y, después, se unen para formar un dúplex.

Por tanto, en otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición que comprende un casete de expresión que comprende un promotor y un gen que codifica un siARN específico de REEP y/o RTP. El siARN

transcrito puede formar una sola hebra de un siARN dúplex de hebras separadas (o bicatenario o ds) de una longitud de aproximadamente 18 a 25 pares de bases; por tanto, la formación de siARN ds requiere la transcripción de cada una de las dos hebras diferentes de un siARN ds. El término "gen" en el casete de expresión se refiere a una secuencia de ácido nucleico, que comprende secuencias de codificación necesarias para la producción de un siARN. Por tanto, un gen incluye, entre otros, secuencias de codificación de una hebra de un siARN ds.

En general, un casete de expresión de ADN comprende una molécula de ADN recombinante o sintetizada químicamente que contiene al menos un gen, o la secuencia de codificación deseada para una sola hebra de un siARN ds, y secuencias de ácido nucleico adecuadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación unida operablemente, bien *in vitro* o bien *in vivo*. La expresión *in vitro* puede incluir la expresión en sistemas de

transcripción y en sistemas de transcripción / traducción. La expresión *in vivo* puede incluir la expresión en una célula y/u organismo huésped concreto. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en células procariotas o en un sistema de expresión *in vitro* son bien conocidas y normalmente incluyen un promotor, un operador y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que los sistemas y células eucariotas de transcripción *in vitro* utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación y de terminación.

Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión mediante ARN pomimerasas bacterianas (tales como T3, T7, y SP6), a las que en la técnica se hace referencia como molde de transcripción, incluyen una hebra de ADN molde que tiene una región promotora de la polimerasa seguida de la complementaria de la secuencia de ARN deseada (o la secuencia de codificación o gen para el siARN). Con el fin de crear un molde de transcripción, una hebra complementaria se hibrida con la porción promotora de la hebra molde.

En cualquiera de los cassetes de expresión descritos anteriormente, el gen puede codificar un transcripto que contiene al menos un sitio de escisión, de un modo tal que cuando se escinde tiene como resultado al menos dos productos de escisión. Dichos productos pueden incluir las dos hebras opuestas del siARN ds. En un sistema de expresión para la expresión en una célula eucariota, el promotor puede ser constitutivo o inducible; el promotor también puede ser específico de tejido o de órgano (p. ej., específico del ojo) o específico de una fase del desarrollo. Preferentemente, el promotor se localiza en el extremo 5' de la región transcrita. También se contemplan otros promotores; dichos promotores incluyen otros promotores de la polimerasa III y promotores de microARN.

Preferentemente, un casete de expresión eucariota comprende además una señal de terminación de la transcripción adecuada para usar con el promotor; por ejemplo, cuando el promotor es reconocido por la ARN polimerasa III, la señal de terminación es una señal de terminación de la ARN polimerasa III. El casete también puede incluir sitios para la integración estable en el genoma de una célula huésped.

### C. Vectores

Las composiciones pueden comprender un vector que comprende un gen que codifica un siARN específico de REEP y/o RTP o, preferentemente, al menos un casete de expresión que comprende un promotor y un gen que codifica una secuencia necesaria para la producción de un siARN específico de REEP y/o RTP (un gen de siARN).

Los vectores pueden comprender además genes marcadores, genes indicadores, genes de selección o genes de interés, tales como genes experimentales. Los vectores pueden incluir vectores de clonación y vectores de expresión. Los vectores de expresión se pueden usar en sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, así como *in vivo* en una célula huésped. Los vectores de expresión usados *in vivo* en una célula huésped se pueden transfectar en una célula huésped, bien transitoriamente o bien de forma estable.

Por tanto, un vector también puede incluir sitios para la integración estable en el genoma de una célula huésped.

Podría ser útil para clonar un gen de siARN cadena debajo de un promotor de ARN polimerasa de bacteriófago en un plásmido multicopias. De dispone de diversos vectores de transcripción que contienen promotores de la ARN polimerasa de bacteriófago (tal como los promotores de T7). Como alternativa, la síntesis de ADN se puede usar para añadir un promotor de ARN polimerasa de bacteriófago cadena arriba de una secuencia de codificación de siARN. El ADN plasmídico clonado, linealizado con una enzima de restricción, se puede usar después como molde para la transcripción (véase, por ejemplo, Milligan, JF and Uhlenbeck, OC (1989) Methods in Enzymology 180: 51-64).

Los vectores pueden incluir, entre otros, secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético (p. ej., derivados de ADN viral, tal como de vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y seudorrabia). Se contempla que cualquier vector se puede usar siempre que se exprese en el sistema adecuado (bien *in vitro* o bien *in vivo*) y viable en el huésped cuando se usa *in vivo*; estos dos criterios son suficientes para la transfección transitoria. Para una transfección estable, el vector también es replicable en el huésped.

Los expertos en la técnica conocen un número elevado de vectores adecuados y comercialmente disponibles. Vectores de expresión en mamíferos pueden comprender un origen de replicación, promotores y potenciadores adecuados, y, también, cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, sitios de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y de poliadenilación de SV40 se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Una secuencia génica en un vector de expresión que no es parte de un casete de expresión que comprende un gen de siARN (específico de REEP1, RTP1, RTP2, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D y RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6)) puede estar operablemente unida a una o más secuencias control de la expresión adecuadas para dirigir la síntesis directa de ARNm. La secuencia génica puede ser un gen marcador o un gen de selección. Los promotores pueden incluir, entre otros, los promotores temprano intermedio del citomegalovirus (CMV), de la timidina quinasa del virus del herpes simple (VHS) y de la metalotioneína de ratón y otros promotores conocidos para controlar la expresión de un gen en células de mamífero o sus virus. Los vectores de expresión recombinantes pueden incluir orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula huésped (p. ej., resistencia a la dihidrofolato reductasa o a neomicina para cultivo celular eucariótico).

La transcripción del ADN que codifica un gen se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de una longitud de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores pueden incluir, entre otros, un potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliomavirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores del adenovirus.

Preferentemente, el diseño de un vector está configurado para liberar el ARNi para una inhibición más permanente. Por ejemplo, el vector de expresión de siARN pSilencer ofrecido por Ambion, el sistema del ARNi pSuper ofrecido por Oligoengine y el sistema GneSilencer ofrecido por IMGENEX. Estos son todos ellos ARNi basados en vectores plasmídicos. BD Biosciences ofrecen los vectores RNAi-Ready pSIREN Vectors, que permiten que los vectores basados en plásmidos y formatos de liberación en adenovirus o retrovirus. Se espera que en breve Ambion lance un vector adenoviral para siARN. Para el diseño de un vector, no existen limitaciones respecto al patrón de plegamiento, ya que no hay motivos de preocupación en relación con la formación de una horquilla o al menos no hay estudios en los que se encontraran diferencias en el funcionamiento relacionado con el patrón de plegamiento del ARNm. Por tanto, las SEQ ID N° 1-20, por ejemplo, se pueden usar en sistemas de liberación de un vector (tanto plasmídico como viral).

Cabe observar que Ambion ofrece una herramienta de diseño para un vector en su página web y BD Biosciences ofrece un manual para el diseño de un vector, ambos útiles para diseñar vectores para siARN.

#### D. Transfección de células

En otros aspectos más, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden células transfectadas con un casete de expresión de la presente invención como se ha descrito anteriormente o con un vector de la presente invención, en el que el vector comprende un casete de expresión (o simplemente el gen de siARN) de la presente invención, como se ha descrito anteriormente. La célula huésped puede ser una célula de mamífero. Una célula transfectada puede ser una célula cultivada o un tejido, órgano o célula del organismo. Ejemplos específicos de células huésped cultivadas incluyen, entre otros, células de ovario de hámster chino (CHO), líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, líneas celulares 293T, C127, 3T3, HeLa, y BHK. Ejemplos específicos de células huésped *in vivo* incluyen tejido tumoral y tejido ocular.

Las células se pueden transfectar de forma transitoria o estable (p. ej., ADN que expresa siARN está integrado de forma estable y es expresado por el genoma de la célula huésped). Las células también se pueden transfectar con un casete de expresión como se ha descrito en el presente documento o se transfectan con un vector de expresión descrito en el presente documento. Las células transfectadas son células de mamífero cultivadas, preferentemente células humanas. Pueden ser células de tejido, órgano u organismo.

Las células que se van a transfectar *in vitro* normalmente se cultivan antes de la transfección de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica, como, por ejemplo, mediante los procedimientos preferidos como se define en la Colección Americana de Cultivos Tisulares. Las células se pueden transfectar con siARN que se sintetizan exógenamente (o *in vitro* o mediante procedimientos químicos o procedimientos de transcripción *in vitro*) o se pueden transfectar con cassetes o vectores de expresión, que expresan siARN dentro de la célula transfectada.

Las células se pueden transfectar con siARN mediante cualquier procedimiento conocido o descubierto en la técnica que permite a una célula captar el ARN exógeno y seguir viable. Ejemplos no limitantes incluyen electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación en fosfato cálcico, uso de una pistola génica, choque osmótico, choque térmico y electroporación, y tratamiento con presión. En realizaciones alternativas, los siARN se introducen *in vivo* mediante lipofección, como han notificado (como, por ejemplo, Elbashir y col. (2001) Nature 411: 494-498).

Los cassetes o vectores de expresión que comprenden al menos un casete de expresión se pueden introducir en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación en fosfato cálcico, el uso de una pistola génica o el uso de un transportador del vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu y col., (1992) J. Biol. Chem., 267: 963; Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem. , 263: 14621; and Williams y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 88:272). También se usan abordajes de liberación de ADN mediada por receptores (Curiel y col., (1992) Hum. Gene Ther., 3: 147; y Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem., 262: 4429). Se pueden usar varios procedimientos para potenciar la transfección de las células. Estos procedimientos incluyen, entre otros, choque osmótico, choque térmico y electroporación, y tratamiento con presión.

- 5 Como alternativa, el vector se puede introducir *in vivo* mediante lipofección. Durante la última década se ha producir un uso creciente de liposomas para encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas se pueden usar para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador. El uso de lípidos catiónicos puede estimular la encapsulación de ácidos nucleicos con carga negativa y también promueve la fusión con membranas celulares cargadas negativamente. Composiciones y compuestos lipídicos particularmente útiles para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en los documentos WO95/18863 y WO96/17823, y en la patente de EE.UU. Nº 5.459.127. Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (p. ej., el documento WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (p. ej., el documento WO96/25508), o un polímero catiónico (p. ej., el documento WO95/21931).

También es posible introducir una secuencia que codifique un siARN *in vivo* como un ADN desnudo, bien como vector o como casete de expresión. Procedimientos para formular y administrar ADN desnudo al tejido muscular de mamífero se divulan en las patentes de EE.UU. Nº 5.580.859 y 5.589.466.

- 20 Normalmente, la transfección estable requiere la presencia de un marcador seleccionable en el vector usado para la transfección. Después, las células transfectadas se someten a un procedimiento de selección. Generalmente, la selección implica cultivar las células en una sustancia tóxica, tal como G418 o higromicina B, de modo que solo las células que expresan un gen marcador transfectado que confiere resistencia a la sustancia tóxica tras la célula transfectada sobreviven y crecen. Dichas técnicas de selección son bien conocidas en la materia. Los marcadores seleccionables típicos son bien conocidos e incluyen genes que codifican resistencia a G418 o higromicina B.

- 25 El agente de transfección puede ser OLIGOFECTAMINE. OLIGOFECTAMINE es un reactivo de transfección basado en lípidos. Ejemplos adicionales de reactivos de transfección basados en lípidos diseñados para la transfección de ARN ds son el reactivo Transit-TKO, suministrado por Mirus (Madison, WI) y jetSI, que se introdujo mediante Polyplus-trasfección SAS. Además, el kit de transfección Silencer siRNA Transfection Kit proporcionado por Ambion incluye agentes de transfección de amina siPORT de lípidos siPORT. Roche ofrece los reactivos de transfección 30 Fugene 6 que también están basados en lípidos. Existe una opción de usar electroporación en un cultivo celular. Preferentemente, un sistema de liberación de vector plasmídico se transfecía en la célula con el agente de transfección OLIGOFECTAMINE suministrado por Invitrogen o con siPORT XP-1 suministrado por Ambion.

- 35 Se pueden usar determinadas modificaciones químicas de los ARNds, tal como el cambio de lipofilia de la molécula, (p. ej., unión de los residuos lipofílicos en los extremos 3' del dsARN). La liberación de los ARNds en los organismos se puede conseguir también mediante procedimientos desarrollados previamente para la aplicación de oligonucleótidos antisentido, tal como inyección de moléculas encapsuladas en liposomas.

#### E. Kits

- 40 La presente descripción también proporciona kits que comprenden al menos un casete de expresión que comprende un gen de siARN específico de REEP y/o RTP. En algunos aspectos, un transcripto del casete de expresión forma un siARN bicatenario de una longitud de aproximadamente 18 a 25 pares de bases. El casete de expresión puede estar contenido en un vector, como se ha descrito anteriormente, cuando el vector se puede usar en sistemas de transcripción o transcripción/traducción *in vitro* o usar *in vivo* para transfectar células, bien de forma transitoria o bien estable.

- 45 En otros aspectos, el kit comprende al menos dos cassetes de expresión, cada uno de los cuales comprende un gen de siAR, de forma que al menos un gen codifica una hebra de un siARN que combina con una hebra codificada por un segundo casete para formar un siARN ds; el siARN ds producido de este modo es cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. Estos cassetes pueden comprender un promotor y una secuencia que codifica una hebra de un siARN ds. Los dos cassetes de expresión pueden estar presentes en un vector sencillo o los dos cassetes de expresión pueden estar presentes en dos vectores diferentes. Un vector con al menos un casete de expresión o dos vectores diferentes, comprendiendo cada uno un único casete de expresión, se puede usar en sistemas *in vitro* de transcripción o transcripción/traducción o se pueden usar *in vivo* para transfectar células, bien de forma transitoria o bien estable.

- 55 En otros aspectos más, el kit comprende al menos un casete de expresión que comprende un gen que codifica dos hebras separadas de un siARN ds y un sitio de procesamiento entre las secuencias que codifican cada hebra, de un modo tal que cuando el gen se transcribe, el transcripto se procesa tal como mediante escisión, para dar como resultado dos hebras separadas que se pueden combinar para formar un siARNds, como se ha descrito anteriormente.

La presente descripción proporciona kits que comprenden: a) una composición que comprende dúplex de ARN de

interferencia pequeños (siARN) configurados para inhibir la expresión de la proteína REEP y/o RTP, y b) material impreso con instrucciones para usar la composición para tratar una célula diana que expresa la proteína de REEP y/o RTP mediante la expresión del ARNm de REEP y/o RTP en condiciones tales que el ARNm de REEP y/o RTP se escinde o, por el contrario, se inactiva. El material impreso puede comprender instrucciones para usar la composición para tratar enfermedades oculares.

5 F. Generar siARN específico de REEP y/o RTP

La presente descripción también proporciona procedimientos de sintetizar siARN específicos de REEP y/o RTP (p. ej., TEEP y/o RTP humanos) o específicos de formas mutantes o silvestres de REEP y/o RTP. Los siARN se pueden sintetizar *in vivo* o *in vitro*. En la síntesis *in Vitro* se incluyen síntesis química y síntesis mediante transcripción *in vitro*,  
10 La transcripción *in Vitro* se consigue mediante un sistema de transcripción, como de una ARN polimerasa de bacteriófago o en un sistema de transcripción/traducción, como ocurre una ARN polimerasa de eucariota. Se produce síntesis *in vivo* en una célula huésped transfectada.

15 Los siARN sintetizados *in vitro*, bien químicamente o mediante transcripción, se usan para transfectar células. Por tanto, la presente descripción también proporciona procedimientos de transfectar células huésped con siARN sintetizados *in Vitro* mediante transcripción. La presente descripción también proporciona procedimientos de silenciacón del gen de the REEP y/o RTP *in vivo* transfectando células con siARN sintetizados *in Vitro*. Los siARN se pueden expresar *in vitro* en un sistema de transcripción/traducción de un casete de expresión o vector de expresión, junto con un vector de expresión que codifica y expresa un gen indicador.

20 La presente descripción también proporciona procedimientos de expresión de siARN *in vivo* transfectando células con cassetes o vectores de expresión que dirigen la síntesis de siARN *in vivo*. La presente descripción también proporciona procedimientos de silenciar genes *in vivo* transfectando células con cassetes o vectores de expresión que dirigen la síntesis de siARN *in vivo*.

XII. Identificación de ligandos de receptores de olores

25 La presente descripción proporciona procedimientos para ideentificar ligandos específicos de receptores de olor. La presente invención se define en las reivindicaciones y no está limitada a un procedimiento concreto para identificar ligandos específicos de receptores de olor. La presente descripción divulga una línea celular (p. ej., una línea celular heteróloga 293T) que comprende la expresión de un receptor de olor de interés (p. ej., un receptor de olor humano) localizado en la superficie de la célula, REEP1, RTP1, o una variante del mismo RTP2, y G<sub>olf</sub>. La activación de un receptor de olor tiene como resultado un incremento del AMPc. Como tal, en algunas realizaciones, la línea celular  
30 comprende además un elemento respondedor al AMPc unido a un agente indicador (p. ej., luciferasa) para detectar activación del receptor de olor. Una molécula odorífera (p. eje., eugenol) se expone a la línea celular. Si la molécula odorífera es un ligando específico del receptor de olor, se puede detectar la expresión de luciferasa o un cambio en la expresión de la luciferasa (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7).

**Ejemplos**

35 Para identificar las proteínas auxiliares que están implicadas en dirigir los OR a la superficie celular se realizó detección selectiva de los genes para inducir la expresión en la superficie celular funcional de OR en células HEK293T (293T). Se descubrió que REEP1, RTP1, RTP2, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, and RTP1-E, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP-D2, RTP-D3, RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1- A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP4-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6) estimulaban la expresión en la superficie celular de OR. Estas proteínas son expresadas en neuronas olfativas, interaccionan con las proteínas OR y potencian las respuestas a los olores cuando se coexpresan con los OR en células 293T.  
40

Además, se ha permitido la construcción de un sistema de expresión heterólogo para identificar nuevos OR que responden a los olores alifáticos.

Las reivindicaciones se refieren solo a RTP1, RTP1-A1, RTP1-D3 y RTP2.

45 **Ejemplo 1. Identificación de proteínas auxiliares de los receptores de olor**

Después de postular la hipótesis de que los OR de mamífero requieren expresión en la superficie celular de proteína(s) auxiliar(es) funcional(es) se instauró una búsqueda para detectar dicha(s) molécula(s). Se construyeron bibliotecas Long-SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (véase, por ejemplo, Saha, S., y col., (2002) Nat Biotechnol 20, 508-512;) a partir de neuronas olfativas sencillas así como de neuronas del órgano vomeronasal y se recogieron los genes que se expresan en estas neuronas. Para identificar los genes candidatos expresados por las neuronas olfativas también se usó un Digital Differential Display (véase, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/info.dcc.shtml>). Los genes candidatos se investigaron según los ORF que codifican las proteínas asociadas a la membrana. Se seleccionaron los genes con similitudes con chaperonas conocidas y se clonaron los ADNc de los ADNc del epitelio olfativo. La expresión del ARNm de cada gen se verificó mediante hibridación *in situ*. Después de aislar y subclonar en vectores de expresión de mamífero, cada ADNc junto con un OR de ratón (MOR203-1) marcado con 20 aminoácidos en N-terminal de la rodopsina (Rho-tag), se transfecaron en células 293T. Las mediciones se realizaron evaluando si estos clones tenían algún efecto sobre la expresión en la

superficie celular de los OR mediante tinción de las células vivas usando anticuerpos contra la Rho-tag (véase, por ejemplo, Laird, D. W., and Molday, R. S. (1988) Invest Ophthalmol Vis Sci 29, 419-428;) Cuando MOR203-1 se transfeció solo, la tinción de anticuerpos solo detectó expresión ligera en la superficie celular en menos del 1 % de las células. En la Figura 1 se proporciona un diagrama esquemático que indica el procedimiento de detección selectiva usado en la presente invención.

#### **Ejemplo 2. REEP y/o RTP potencian la expresión de OR en la superficie celular**

Dos clones no relacionados (de 61 analizados) potenciaban el número y la intensidad de la tinción de la expresión en la superficie celular de MOR203-1 (véase la Figura 2A). Las proteínas codificadas por estos clones se denominaron REEP1, por proteína 1 de potenciación de la expresión del receptor (Receptor Expression Enhancing Protein 1) y RTP1, por proteína 1 transportadora del receptor (Receptor Transporting Protein 1). Después se encontró RTP2, un pariente cercano de RTP1. RTP2 también potenció la expresión en la superficie celular de MOR203-1. Despues, se analizaron REEP1, RTP1, y RTP2 para detectar un efecto similar en la estimulación de la expresión en la superficie celular de otros OR. Cuatro OR diferentes (OREG de ratón, olfr62 de ratón, OR-S46 de ratón y I7 de rata) se expresaron en células 293T con o sin REEP1, RTP1 o RTP2. La cotransfección de BFP o GFP demostró que la eficiencia de la transfección era consistente (~70 %). Adicionalmente, los OR transfectados con REEP y/o RTP generaron células más inmunofluorescentes y señales más fuertes en las células positivas en comparación con los OR sin REEP y/o RTP (véase la Figura 2A). La intensidad de la señal y el número de células inmunopositivas varió al usar diferentes OR en cada condición. Por ejemplo, en el caso de I7 de rata, la expresión en superficie fue significativamente menor que la de los otros OR analizados. Sin embargo, las células inmunopositivas ocasionales solo se observaron cuando se coexpresaron las proteínas auxiliares. Los efectos de RTP1 o RTP2 fueron consistentemente más sólidos que los de REEP1. La potenciación de la expresión en la superficie celular fue específica de OR y no de otros GPCR: ni REEP y/o RTP potenciaban la expresión del receptor  $\beta 2$  adrenérgico, mT2R5 (un receptor del gusto amargo de ratón) (véase, por ejemplo, Chandrashekhar, J., y col. (2000) Cell 100, 703-711), o un receptor de feromonas V2R (VR4) (véase, por ejemplo, Matsunami, H., y Buck, L. B. (1997) Cell 90, 775-784) (véase la Figura 2A y la Figura 3). Por último, no se observó potenciación de la expresión en la superficie celular de MOR203-1 cuando se coexpresaban otros miembros de las familias de REEP y RTP (REEP2 y RTP4).

Con el fin de cuantificar los números y la intensidad de las células inmunopositivas, se realizó análisis de clasificación celular activadas por fluorescencia (FACS). Para monitorizar la transfección y la eficiencia de la tinción se usó el receptor  $\beta 2$  adrenérgico marcado con HA como control. Más células se marcaron y la señal fluorescente fue más alta cuando se expresaban los OR con las proteínas auxiliares (véanse las Figuras 2B y 2C y la Figura 4).

#### **Ejemplo 3. Los genes de REEP y/o RTP codifican las proteínas transmembrana**

El gen de REEP1 codifica una proteína de 201 aminoácidos que contiene dos supuestos dominios transmembrana (véase la Figura 5A). La inmunotinción de la proteína REEP1 marcada en el extremo C indican que el extremo C es extracelular. Las búsquedas BLAST identificaron genes homólogos en diversas especies eucariotas. TEEP1 mostró similitudes limitadas con YOP1 de levadura, HVA22 de cebada y DP1/TB2 humana (véase la Figura 5B). YOP1 está implicada en el transporte de vesículas (véase, por ejemplo, Brands, A., and Ho, T. H. (2002) Plant Physiol 130, 1121-1131). La expresión de HVA22 se induce mediante ácido abscísico y está regulada por varias agresiones ambientales, como temperaturas extremas o deshidratación (véase, por ejemplo, Chen, C. N., y col. (2002) Plant Mol Biol 49, 633-644; Shen, Q., y col. (1993) J Biol Chem 268, 23652-23660). DP1/TB2 están codificados por un gen delecionado en cánceres de colon (véase, por ejemplo, Kinzler, K. W., y col. (1991) Science 253, 661-665) y un homólogo de ratón DP1 (REEP5) está regulada por disminución cuando los mastocitos se desencadenan mediante IgE más antigénico (véase, por ejemplo, Prieschl, E., y col. (1996) Gene 169, 215-218). En el genoma de ratón, REEP1 tiene al menos 5 genes homólogos adicionales (designados REEP2-6) (véase la Figura 5B).

Los genes de RTP1 y RTP2 codifican proteínas con 263 y 223 aminoácidos, respectivamente, y comparten una identidad de secuencia del 73 % a nivel de aminoácidos (véase la Figura 5C). No parece que ninguna proteína tenga una secuencia señal, pero todas tienen un único supuesto dominio transmembrana localizado cerca del extremo C. La inmunotinción de RTP 1 marcada en el extremo C indica que el extremo C es extracelular. Las búsquedas en BLAST del genoma de ratón identificó dos miembros adicionales, RTP3 y RTP4. No se observaron homólogos de RTP obvios fuera de las especies de vertebrados. No obstante, ODR-4 de *C. elegans* (véase, por ejemplo, Dwyer, N. D., y col. (1998) Cell 93, 455-466) parece tener la misma topología de membrana que las RTP.

#### **Ejemplo 4. REEP y/o RTP se expresan específicamente en las neuronas olfativas**

El análisis de transferencia de tipo Northern con ARN extraído de varis tejidos de ratón reveló que REEP 1 y especialmente RTP1 y RTP2 se expresan más prominentemente en los órganos olfativos y vomeronasal. El ARN de REEP1 también se detectó a niveles significativos en el cerebro (véase la Figura 6A). La exposición prolongada reveló leves señales de RTP1 y RTP2 en el cerebro. No se observó expresión en los testículos, en los que se expresa una subpoblación de OR (véase, por ejemplo, Parmentier, M., y col. (1992) Nature 355, 453-455; Spehr, M., y col. (2003) Science 299, 2054-2058).

En el epitelio olfativo, REEP y/o RTP se expresaron específicamente en las neuronas olfativas, que es evidente a partir de la comparación con la expresión de OMP, un marcador de las neuronas sensoriales olfativas maduras

(véase la Figura 6B). Para evitar la hibridación cruzada entre el ARN de RTP1 y RTP2, que son un 87 % idénticos a nivel de nucleótidos en la secuencia de codificación, se usaron las regiones UTR en 3' no homólogas como sondas, además de las sondas correspondientes a los marcos de lectura abiertos. Las señales fueron idénticas. No se detectó expresión de otros genes de REEP o RTP en las neuronas olfativas, con la excepción de RTP4, que se expresó a niveles menores (véase la Figura 6B). Por último, REEP1 fue expresada por una subpoblación de células cerebrales (véase la Figura 6C).

#### **Ejemplo 5. REEP1 y RTP1 pueden interaccionar con los OR**

Dada la capacidad de REEP y/o RTP para estimular la expresión en la superficie celular de OR, se postuló la hipótesis de que también pueden interaccionar con proteínas de OR. Esto se evaluó usando ensayos de coimmunoprecipitación. MOR203-1 marcado con HA y REEP1 marcado con Flag, RTP1 o ICAP-1, un control negativo (véase, por ejemplo, Zawistowski, J. S., y col. (2002) *Hum Mol Genet* 11, 389-396) se transfecaron en células 293T. Después de precipitar los extractos celulares con anticuerpos anti-Flag, las proteínas se eluyeron en tampón de muestra-SDS a temperatura, tras lo cual se realizó análisis de transferencia de tipo Western para detectar las proteínas de OR. Las proteínas de OR se detectaron como bandas de alto peso molecular después de la precipitación de REEP1 o RTP1 (véase la Figura 7B, calles 1 y 2). La mayoría de un GPCR control, el receptor  $\beta 2$  adrenérgico, no formaron oligómeros de alto peso molecular usando estas condiciones de elución. De un modo similar, cuando las proteínas HA-MOR203-1 se precipitaron, las proteínas REEP1 o RTP1 se coprecipitaron, mientras que ICAP-1 no se podía detectar (véase la Figura 7C, calles 1, 2 y 3). La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. Sin embargo, estos resultados indican que REEP1 y RTP1 forman un complejo con OR.

Basándose en la interacción de las proteínas, se hipotetizó que la expresión funcional de las proteínas auxiliares podría estar regulada por las proteínas de OR. Cuando solo se transfeció en las células 293T RTP1 marcado con Flag en el extremo C, se detectó poca señal en la superficie celular, lo que indica que la mayoría de las proteínas RTP estaban dentro de las células. Por el contrario, la cotransfección de RTP1 y OR potenciaba considerablemente la RTP1 en la superficie celular (véase la Figura 7D). La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. Sin embargo, estos resultados demostraron una dependencia mutua de los OR y RTP1 para la expresión en la superficie celular e indicaron que la expresión eficaz en la superficie celular de los OR y RTP1 requiere la formación de un complejo receptor relativamente estable entre los dos. Cuando se expresó REEP1 marcado en el extremo C se observó una pequeña cantidad de REEP1 en la superficie celular. Al contrario que RTP1, la coexpresión de las proteínas OR no facilitó la expresión en la superficie celular de REEP1 (véase la Figura 7E).

#### **Ejemplo 6. REEP y/o RTP potencian la función de los OR**

El mal olor provocó una actividad de señalización en sistemas de cultivos celulares heterólogos que expresan OR se han atribuido a una mala expresión en la superficie celular de los OR. La identificación de REEP y/o RTP permitió una evaluación directa de este tejido. Se usó un ensayo de gen indicador de la luciferasa en la que un elemento respondedor a AMPc (CRE) midió en la expresión del gen de la luciferasa (véase la Figura 8A). Dado que la activación de OR conduce a un incremento en el AMPc, la activación del receptor de olor de ratón OREG por su ligando eugenol se midió en presencia y ausencia de REEP y/o RTP (véase, por ejemplo, Kajiyama, K., y col. (2001) *J Neurosci* 21, 6018-6025; Touhara, K., y col., (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4040-4045). Como se ha indicado anteriormente, el eugenol aumentó los niveles de actividad de la luciferasa dependiente de OREG (véase, por ejemplo, Katada, S., y col. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 305, 964-969). La coexpresión de OREG con REEP y/o RTP potenció marcadamente la actividad de la luciferasa dependiente de olor (Figura 8B). Se obtuvieron resultados similares cuando se aplicaron vainilla o etilvainilla, otros dos ligandos de OREG. Dado que RTP4 también se expresa a niveles bajos en el epitelio olfativo, esta proteína se coexpresó con OREG, pero esto no produjo un incremento significativo de la actividad del gen indicador de la luciferasa.

Otros GPCR pueden exhibir un cambio en la especificidad del ligando dependiendo de las proteínas auxiliares (véase, por ejemplo, McLatchie, L. M., y col. (1998) *Nature* 393, 333-339). (McLatchie y col., 1998). Para investigar si REEP1, RTP1, o RTP2 alteran la selectividad del ligando de los OR, se usaron OREG y OR-S46 con sus agonistas y sustancias químicas relacionadas. No se observaron cambios sustanciales en la selectividad química relativa cuando los receptores se coexpresaron con las proteínas auxiliares (véase la Figura 8C).

#### **Ejemplo 7. Construcción de un ensayo funcional para identificar las interacciones receptor-olor**

Para facilitar el análisis de las interacciones olor-OR, se establecieron líneas celulares 293T que expresan de forma estable REEP1, RTP1, RTP2 y  $G_{\alphaolf}$ , la subunidad alfa de la proteína G que se acopla a OR (véase, por ejemplo, Belluscio, L., y col. (1998) *Neuron* 20, 69-81; Jones, D. T., y Reed, R. R. (1989). *Science* 244, 790-795). Para establecer estas células, vectores de expresión linealizados que contienen REEP1, RTP1, RTP2 y ORF de  $G_{\alphaolf}$  se transfecaron en células 293T con PGK-Pac (gen de resistencia a puromicina) (véase, por ejemplo, Watanabe, S., y col. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 213, 130-137). Entre los clones de resistencia a puromicina, el clón 3A mostró una gran respuesta al eugenol cuando OREG se transfeció y se denominó Hana3A. El análisis RT-PCR indicó que las células Hana3A expresan REEP1, RTP1, RTP2 y  $G_{\alphaolf}$  exógenos (véase la Figura 9). Se observó expresión potenciada en la superficie celular cuando OREG u otros OT se transfecaron en células Hana3A y se

inmunotíñeron (véase la Figura 10). Para analizar si las células Hana3A también aumentaban la respuesta del ligando en el ensayo de la luciferasa, el gen indicador de luciferasa-CRE junto con OREG (marcado con HA), OR-S46 o OR-S50 se cotransfectaron y estimularon las células con sus ligandos, eugenol, ácido nonanoico y ácido nonanodioico, respectivamente (véase, por ejemplo, Malnic, B., y col. (1999) Cell 96, 713-723; Touhara, K., y col. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4040-4045). Se observó poca inducción de luciferasa cuando se expresó HA-OREG en células 293T. Por el contrario, cuando se usaron células Hana3A, se observó una potenciación de la actividad de la luciferasa tras la estimulación con eugenol (véase la Figura 8D). Se obtuvieron resultados similares usando dos OR adicionales, OR-S46 y OR-S50 El gen de OR-S50 no produjo una respuesta de la luciferasa en células 293T, mientras que el mismo receptor transfundido en las células Hana3A produjo una sólida actividad de luciferasa (véase la Figura 8D). La expresión de  $G_{\alpha\text{olf}}$  solo en células 293T tuvo poco o ningún efecto sobre la activación de OR usando este ensayo.

Con el fin de confirmar el incremento de la función de OR en presencia de REEP1, RTP1 y RTP2, la cantidad de AMPc tras la estimulación con ligando se midió usando células 293T que expresan  $G_{\alpha\text{olf}}$  y células Hana3A. Cuando se transfundió OREG y se añadió eugenol para estimular los OR, se produjo más AMPc en células Hana3A. Por el contrario, cuando se expresó el receptor  $\beta 2$  adrenérgico y se usó isoproterenol no se observaron diferencias significativas en la producción de AMPc (véase la Figura 8E). La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, esto respalda adicionalmente un papel específicos de las proteínas auxiliares en la expresión de OR funcional.

En estudios previos se demostró que neuronas olfativas sencillas que se activan con alcoholes y ácidos alifáticos expresan OR específicos, principalmente OR de clase I (de tipo fish) (véase, por ejemplo, Malnic, B., y col. (1999) Cell 96, 713-723; Zhang, X. y Firestein, S. (2002) Nat Neurosci 5, 124-133). Cuatro OR (S6/79, S18, S46 and S50) analizados previamente usando otras técnicas (véase, por ejemplo, Malnic, B., y col. (1999) Cell 96, 713-723) se analizaron contra un panel de ensayos de alcoholes alifáticos, aldehídos y ácidos, y algunos otros olores. Adicionalmente, se analizaron cinco OR "huérfanos" de clase I (MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y MOR32-11) cuyos ligandos afines se desconocían. A una concentración superior al umbral de 100 uM, todos estos OR eran selectivos del olor, respondiendo a únicamente una pequeña subpoblación de los olores analizados (véase la Figura 11A). Esta especificidad se retuvo a concentraciones menores más fisiológicamente relevantes. Muchos de estos OR respondieron a olores presentes a concentraciones micromolares. La expresión en la superficie celular de estos OR se evaluó mediante immunofluorescencia de células vivas. Algunos OR (S18, MOR31-4, MOR31-6 y MOR32-5) se expresaron fuertemente, mientras que otros OR (S6, S50, MOR23-1, MOR32-11) se expresaron débilmente (véase la Figura 12). La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados sugieren que una expresión débil fue suficiente para producir una respuesta significativa a los olores a concentraciones fisiológicamente relevantes. Por último, se analizaron dos OR huérfanos de clase II adicionales, MOR203-1 y olfr62, contra un panel de 139 olores. MOR203-1 respondió a concentraciones altas de ácido nonanoico (véase la Figura 11B). Olfr62 respondió a cumarina y piperonal (véase la Figura 11C). Después se analizaron varios compuestos aromáticos relacionados y se identificó la 2-coumaranona como ligando preferido para olfr62 (véase la Figura 11C). Cuando se usaron células 293T parentales para estos OR en este ensayo de luciferasa, se observó poca o ninguna respuesta a los olores. La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados también demuestran la importancia de REEP y/o RTP en la expresión funcional de OR.

#### **Ejemplo 8. Función de REEP y/o RTP durante el plegamiento, transporte y/o reconocimiento del olor por el receptor**

La expresión de GPCR es un proceso complejo que incluye plegamiento de la proteína, modificaciones postraduccionales y transporte a través de los compartimentos celulares, incluyendo el RE y el aparato de Golgi. Adicionalmente, las pruebas indican que dirigir adecuadamente los GPCRs a la membrana plasmática puede implicar homodimerización (véase, por ejemplo, Angers, S., y col. (2002) Annu Rev Pharmacol Toxicol 42, 409-435). La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, aunque REEP y/o RTP pueden funcionar en cualquiera de estas etapas de expresión de OR, se presentan tres posibilidades en la Figura 13 con respecto a su posible interacción.

En primer lugar, REEP y/o RTP estimulan el correcto plegamiento de los OR en el RE. NinaA, un homólogo de la ciclocifilina de Drosophila, se identificó como una proteína chaperona para la rodopsina y se pensó que facilitaba el correcto plegamiento (véase, por ejemplo, Baker, E. K., y col. (1994) Embo J 13, 4886-4895; Shieh, B. H., y col. (1989) Nature 338, 67-70). Los homólogos en plantas de REEP1, HVA22, son genes inducidos por estrés y pueden permitir que las plantas toleren condiciones adversas (véase, por ejemplo, Chen, C. N., y col. (2002) Plant Mol Biol 49, 633-644; Shen, Q., y col. (1993) J Biol Chem 268, 23652-23660). La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, aunque no se conocen los papeles precisos de HVA22, dado que una serie de proteínas inducidas por estrés, tales como las proteínas del choque térmico, funcionan como chaperonas, se puede concebir

que HVA22 y, por analogía quizá REEP1, actúan como chaperonas para estimular el crecimiento.

En segundo lugar, REEP1, RTP1, and RTP2 facilitan el transporte de vesículas/cargas específicos que incluyen OR. Compatible con esta idea, un homólogo de REEP1 en levadura, YOP1, se ha implicado en el transporte de vesículas mediado por Rab (véase, por ejemplo, Brands, A., and Ho, T. H. (2002) *Plant Physiol* 130:1131; Calero, M. (2001) *J Biol Chem* 276, 12100-12112). En *C. elegans* una subunidad adaptadora de la clatrina, UNC-101, participa en el tráfico de receptores quimiosensoriales a los cilios olfativos (véase, por ejemplo, N. D., y col., (2001) *Neuron* 31, 277-287).

En tercer lugar, REEP1, RTP1, y RTP2 actúan como coreceptores con los OR. Como se muestra en la Figura 7D, la expresión en la superficie celular de RTP1 se potencia mediante la coexpresión de OR. Los OR pueden contener señales de retención en el RE que están enmascaradas por la asociación con RTP (o REEP1), un mecanismo similar a la regulación de la expresión en la superficie celular del receptor GABA(B)R1 mediante la asociación de GABA(B)R2 (véase por ejemplo, Jones, K. A., y col. (1998) *Nature* 396, 674-679; Kaupmann, K., y col. (1998) *Nature* 396, 683-687; White, J. H., y col. (1998) *Nature* 396, 679-682). Los REEP y RTP pueden tener papeles diferentes o complementarios, una hipótesis que es compatible con la ausencia de cualquier similitud de la secuencia de aminoácidos o motivos de secuencia específicos.

La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, los tres papeles indicados anteriormente son razonables para REEP 1, RTP 1 and RTP2; sin embargo no se excluyen otras posibles funciones. Aunque no se observaron cambios en la especificidad de ligando de OREG o OR-S46 cuando se expresan con REEP1, RTP1 o RTP2, es posible que sí desempeñen un papel en la modulación de los perfiles de reconocimiento de algunos OR. Por ejemplo, diferentes miembros de RAMP cambian la especificidad de ligando del receptor de tipo receptor de la calcitonina (CRLR), un miembro de los GPCR. CRLR expresado con RAMP1 funciona como receptor de CGRP, mientras que CRLR expresado con RAMP2 funciona como receptor de la adrenomedulina (véase, por ejemplo, McLatchie, L. M., y col. (1998) *Nature* 393, 333-339).

La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, muchos GPCR, incluyendo los receptores de feromonas V1R (véase, por ejemplo, Dulac, C., y Axel, R (1995) *Cell* 83, 195-206), T2R taste receptors (see, e.g., Adler y col. (2000) *Cell* 100, 693-702; Matsunami, H., Montmayeur, J. P., y Buck, L. B. (2000) *Nature* 404, 601-604), el receptor α2C adrenérgico (véase, por ejemplo, Hurt, C. M., y col. (2000) *J Biol Chem* 275, 35424-35431), y el receptor de la hormona liberaodra de tirotropina (véase, por ejemplo, Yu, R., y Hinkle, P. M. (1997) *Mol Pharmacol* 51, 785-793), parecen requerir cofactor(es) para su expresión en la superficie celular. Por tanto, los miembros de REEP y RTP pueden regular el tráfico de dichos GPCR. Los análisis de hibridación *In situ* han mostrado que REEP3, REEP5, RTP1 y RTP2 se expresan en las neuronas VNO. Además, los miembros de REEP se expresan de forma diferencial en una subpoblación de células cerebrales (M.M. and H.M., observaciones no publicadas). La estrategia para crear una lista de genes expresados en tipos celulares específicos usando SAGE y/o Digital Differential Display y detección selectiva de los genes que estimulan la expresión en la superficie celular de los receptores podría aplicarse en dichos casos.

#### **Ejemplo 9. REEP y/o RTP permiten investigaciones de las interacciones receptores de olores-olores**

Se ha establecido un sistema de expresión que permite la identificación rápida de los ligandos para OR. Este sistema se analizó con doce OR. Cuatro de los OR analizados (S6/18, S18, S46 y S50) se expresaron en neuronas olfativas sencillas que responden a olores alifáticos (véase, por ejemplo, Malnic, B., y col. (1999) *Cell* 96, 713-723). Los perfiles de respuesta de OR-550, pero no los de OR-S18, estaban de acuerdo con el informe previo (véase, por ejemplo, Malnic, B., y col. (1999) *Cell* 96, 713-723). En estudios previos, las neuronas olfativas S6 and S79 expresaron el mismo OR (OR-S6/S79) y ambos respondieron al ácido nonanodioico, aunque solo la neurona olfativa S79 respondió a dos olores, ácido heptanoico y ácido octanoico (véase, por ejemplo, Malnic, B., y col. (1999) *Cell* 96, 713-723). En experimentos realizados durante el curso de la presente invención, OR-S6/S79 respondió al ácido nonanodioico peor al ácido heptanoico o al ácido octanoico. La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados respaldan el perfil de respuesta S6 de la neurona olfatoria. Las diferencias pueden deberse a la variación de las respuestas cuando se registran de neuronas olfativas sencillas. Cuando se registraron múltiples neuronas olfativas sencillas que expresaban el mismo OR contra el mismo conjunto de olores usando imágenes de calcio, sus perfiles de respuesta fueron similares pero diferentes (véase, por ejemplo, Bozza, T., y col. (2002) *J Neurosci* 22, 3033-3043).

Se identificaron siete nuevos OR que respondieron a diferentes olores en los paneles de ensayo. La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados demuestran la aplicabilidad de este sistema para descodificar la especificidad de ligando de los OR. Los perfiles de los OR en respuesta a varios olores son comparables con la idea de "código receptor combinatorio", en el que un OR responde a múltiples olores relacionados y un olor activa múltiples receptores (véase, por ejemplo, Kajiyama, K., y col. (2001) *J Neurosci* 21, 6018-6025; Malnic, B., y col. *Cell* 96, 713-723).

En los experimentos realizados durante el curso de la presente invención, no solo tres OR de clase I (S46, MOR23-1, MOR31-4) sino que también MOR203-1, un OR de clase II, respondieron al ácido nonanoico. La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados indican que OR muy diferentes pueden responder a la misma sustancia química, como MOR203-1 y otros OR de ácido nonanoico (MOR23-1, MOR31-4 y S46) son solo un 29-32 % idénticos. Olfr62 es uno de los OR estrechamente relacionados localizados cerca de o en el locus IVA, implicado en la sensación del ácido isovalérico, (véase, por ejemplo Griff, I. C., y Reed, R. R. (1995) Cell 83, 407-414; Zhang, X., and Firestein, S. (2002) Nat Neurosci 5, 124-133). En experimentos realizados durante el curso de la presente invención, olfr62 no respondió al ácido isovalérico pero sí respondió a la coumarina y a otros compuestos aromáticos relacionados (véase la Figura 11C). También se analizaron otros ocho OR localizados cerca del locus IVA, pero ninguno de ellos respondió al ácido isovalérico. La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados sugieren que estos OR no están implicados en la detección con ácido isovalérico.

La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, el sistema de expresión funcional de OR junto con la anotación de prácticamente todos los OR en los genomas de ratón y humano (véase, por ejemplo, Glusman, G., y col. (2001) Genome Res 11, 685-702; Young, J. M., y col. (2002) Hum Mol Genet 11, 535-546; Zhang, X., y Firestein, S. (2002) Nat Neurosci 5, 124-133; Zozulya, S., y col. (2001) Genome Biol 2, 18), proporciona una plataforma para investigar la interacción OR-olor de mamífero de un modo exhaustivo.

#### **Ejemplo 10. Análisis Long-SAGE de una célula**

Se realizó una RT-PCR de una célula como se ha descrito (véase, por ejemplo, Brady, G., e Iscove, N. N. (1993) Methods Enzymol 225, 611-623; Dulac, C., y Axel, R. (1995) Cell 83, 195-206; Matsunami, H., y Buck, L. B. (1997) Cell 90, 775-784) con modificaciones. Brevemente, los tejidos olfativos de ratón adulto se disociaron con dispasa (Invitrogen) y colagenasa (Invitrogen). Células únicas se escogieron con un microscopio invertido usando un micromanipulador y se transfirieron a 4,75 ul de mezcla de lisis (1 x tampón para PCR (Roche), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 50uM, 200 ng/mg del cebador de anclaje (biotina-TATAGAATTCTGGGCCGCTCGCGA (T) 24), 0,3 U/ul del inhibidor de la Prime RNasa (Eppendorf), y 0,4U/ul de rRNasin (Promega). Los tubos de PCR que contenían las células lisadas se calentaron hasta 65 grados durante 1 minutos, se enfriaron a 4 grados C y se añadieron 0,25 ul de mezcla de RT (170 U/ul de Superscript II (Invitrogen), 35 U/ul de inhibidor de Prime RNasa y 45 U/ul de rRNasin.) y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos, después a 65 °C durante 10 minutos. Se añadieron 5 ul de la mezcla de TdT mix (1 x tampón para PCR (Roche), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, , dATP 1,5mM , 1,25 U/ul de TdT (Roche), 0,05 U de RNasa H (Roche)) a cada tubo a 37 °C durante 20 minutos, después a 65 °C durante 10 minutos. Se añadieron 5 ul del producto a 50 ul de mezcla de PCR (1 x tampón EX Taq (Takara), dNTP 0,2 5mM, 20 ng/ul del cebador de ancla, 2,5 U de EX Taq HS polimerasa (Takara)) y se incubaron a 95 °C durante 2 minutos, a 37 °C durante 5 minutos, a 72 °C durante 20 minutos, después ciclos a 95 °C durante 30 s, a 67 °C 1 min, a 72 °C durante 6 min más una extensión de 6 segundos para cada ciclo, después a 72 °C durante 10 minutos. El contenido de los productos amplificados por PCR se analizó usando los protocolos de long SAGE (véase por ejemplo., Saha, S., y col. (2002) Nat Biotechnol 20, 548-512). Brevemente, los productos de PCR de una sola célula se cortaron con NlaIII (NEB). Después, el ADN biotinilado se unió a perlas magnéticas con estreptavidina (Dynal), se ligaron los ligadores. El ADN ligado se cortó con Mmel (NEB). Las marcas escindidas se ligaron para formar demarcas y se amplificaron mediante PCR. El producto de la PCR se cortó con NlaIII y las dimarcas se ligaron para formar concatámeros. Se ligaron en el vector pZero-1 (Invitrogen) y se transformaron. Se escogieron y secuenciaron colonias únicas. Las secuencias de las marcas se analizaron usando el software SAGE2002 y búsquedas en BLAST del NCBI.

#### **Ejemplo 11. Construcción del vector**

Los ADNc se amplificaron a partir de ADNc del epitelio olfativo usando la Taq ADN polimerasa HotstarT (Qiagen) o ADN polimerasa KOD (Toyobo/Novagen) y se subcloraron en vetores de expresión pCI (Promega). Los marcos de lectura abiertos de los OR se amplificaron a partir del ADN genómico de C57BL6 (MOR203-1 y S46), 129 (S18) o DBA2 (o1fr62, S6/S79, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y MOR32-11) y se subclonaron el pCI que contiene la marca de Rho.

#### **Ejemplo 12. Cultivo de células e inmunocitoquímica**

Las células 293T se mantuvieron en medio mínimo esencial que contenía 10 % de suero bovino fetal (M10). Para la transfección se usó Lipofectamine 2000 (Invitrogen). En la tinción de células vivas, 16 horas después de la transfección, las células se incubaron en M10 que contiene anticuerpos anti-rodopsina, 4D2 (véase, por ejemplo, Laird, D. W., y Molday, R. S. (1988) Invest Ophthalmol Vis Sci 29,419-428) y NaN<sub>3</sub> 15mM a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar, las células se incubaron con IgG anti-ratón conjugada con Cy3 (Jackson Immunologicals), se lavaron y se montaron. Para el análisis FACS, 4D2 e IgG anti-ratón conjugada con PE (Jackson Immunologicals) se usaron para monitorizar la expresión del receptor marcado con Rho. Se usaron anticuerpos de conejo anti-HA (Sigma) e IgG anti-conejo conjugada con Alexa 488 (Molecular Probes) para teñir el receptor β2 adrenérgico-HA. Para establecer las células Hana3a, se usó 1 ug/ml de puromicina para la selección. Se escogieron 96 colonias y se analizaron usando el ensayo de la luciferasa usando OREG.

**Ejemplo 13. Análisis de REEP y RTP**

Para la predicción del péptido señal y las regiones transmembrana de REEP y RTP, se usó SignalP (véase, por ejemplo, Nielsen, H., y col. (1997) Protein Eng 10, 1-6) y TMHMM, respectivamente. Con el fin de crear un árbol filogenético, se usó ClustalW.

5   **Ejemplo 14. Hibridación Northern e *In Situ***

Los ARN totales de varios tejidos se extrajeron usando reactivo Trizol (Invitrogen) o ARN total de Aurum (Biorad). Los ARN se sometieron a electroforesis en gel de formaldehído-agarosa y se transfirieron a una membrana de HybondN (Amersham). Las sondas marcadas con Dig se hibridaron con la membrana en solución Dig easyhyb (Roche) a 65 °C. Después de lavar, se aplicaron anti-Dig AP (Roche) y se lavaron las membranas. Las señales se detectaron con CDP-Star (Roche). Se usó la misma membrana para las tres sondas. La hibridación *in situ* se realizó como se ha descrito (véase, por ejemplo, Matsunami, H., y Buck, L. B. (1997) Cell 90, 775-784; Matsunami, H., y col. (2000) Nature 404, 601-604; Schaeeren-Wiemers, N., y Gerfm-Moser, A. (1993) Histochemistry 100, 431-440). Brevemente, las sondas de ARN marcadas con Dig se hibridaron con secciones frescas congeladas de ratones CD-1 de tres semanas de edad. Después de lavar, las sondas DIG se hicieron reaccionar con AP anti-Dig y se detectaron las señales usando NBT-BCIP.

10   **Ejemplo 15. Inmunoprecipitación**

20   Células 293T en placas de 100 mm se transfecionaron con OR, ADNC de REEP1 y/o RTP1. 16 horas después de la transfección se lisaron las células en tampón de lisis (Tris 50mM (7,4), NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, PMSF 0,5 mM, Benzamideno 2 mM, 0,5 ug/ml de Leupeptina, 1,4 ug/ml de pepstatina A, 2,4 ug/ml de quimostatina, 15 ug/ml de aprotinina, ortovanadato sódico 1mM). La lisis se incubó con gel de afinidad M2 anti-Flag (Sigma) o matriz de afinidad anti-HA (Roche) durante 2 horas a 4 °C y se lavó con tampón de lisis. Después, las proteínas unidas se luyeron mediante incubación con tampón de muestra de SDS a temperatura ambiente durante 2 horas. La SDS-PAGE y la transferencia de tipo Western se realizaron de acuerdo con el manual de instrucciones Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad). Se usó ECL (Amersham) para detectar proteínas sobre membranas.

25   **Ejemplo 16. Ensayo de luciferasa**

30   Se usó el sistema Dual-Glo (Promega) para el ensayo de la luciferasa. Se usó CRE-Luciferasa (Stratagene) para medir las actividades del receptor. Se usó luciferasa de renilla dirigida por el promotor constitutivamente activo de SV40 (pRL-SV40: Promega) como control interno. Las células se sembraron en placas sobre placas de 96 pocillos revestidos con D-lisia (BIOCOAT, Beckton Dickinson). Tras 8 horas (para los experimentos mostrados en las Figuras 8B y 8C) o 12 horas (para los experimentos mostrados en las Figuras 8B y 11) tras la transfección, el medio se sustituyó con medio químicamente definido CD293 (Invitrogen) y las placas se incubaron durante una hora a 37 °C. El medio se sustituyó con 50 ul de soluciones de olor disueltas en CD293 y se incubó durante 10 horas (para los experimentos mostrados en las Figuras 8B y 8C) o 4 horas (para los experimentos mostrados en las Figuras 8B y 11) a 37 °C. Se siguió el protocolo del fabricante para medir las actividades de luciferasa y luciferasa de renilla. La luminiscencia se midió usando Wallac Victor 1420 (PerkinElmer). La actividad normalizada de la luciferasa se calculó como [Luc (N)-Luc (0)]/RL (N), en la que Luc (N) = recuento luminiscente de un determinado pocillo, Luc (0) = recuento luminiscente sin olor para cada OR, y RL (N) = recuento luminiscente de la luciferasa de renilla de cada pocillo. Para los ensayos del AMPc, las células se sembraron en placas de 24 pocillos. El ADNC de OREG o OREG / Golf se transfeció a células Hana3a o HEK293-T, respectivamente. 14 horas después de la transfección, las células se incubaron en CD293 durante 2 horas y se expusieron a eugenol o isoproterenol en MEM que contiene Hepes 10 mM y IBMX 500 uM durante 5 minutos. Se usó cAMP-Screen Direct System (Applied Biosystems) para medir los niveles de AMPc. Para el análisis de datos se usó el software Prism (Graphpad).

35   **Ejemplo 17. Sustancias químicas**

40   Todos los olores se adquirieron de Sigma, a excepción del ácido octanoico que era de Calbiochem. Las sustancias químicas usadas en el hallazgo de los ligandos afines para MOR203-1 y olfr62 se proporcionan en el ejemplo 19.

45   **Ejemplo 18. Números de acceso a Genbank**

Los números de acceso a genbank de REEP1-6 and RTP1-4 de ratón y de REEP1-6 and RTP1-A1, RTP2, RTP3 y RTP4 humanos: AY562225-AY562244.

50   **Ejemplo 19. Materiales complementarios**

55   Las sustancias químicas que se usan para la detección selectiva de ligandos inicial para MOR203-1 y olfr62 son las siguientes: 1 (+)-Carvona, 2 L-Carvona, 3 (-)-Fenchona, 4 Citral, 5 (1R)-(-)-Fenchona, 6 (+)-Fenchona, 7 aceite de romero, 8 (-)-óxido de rosa, 9 (+)-óxido de rosa, 10 (-)-alcánfor, 11 (S)-(-)-Limoneno, 12 (R)-(+)-1-feniletilanol, 13 (S)-(+)-2-ácido fenilbutírico, 14 (R)-(-)-2-ácido fenilbutírico, 15 2-Hexanona, 16 1-Pentanol, 17 1-Heptanol, 18 (±)-2-Butanol, 19 1-propanol, 20 1-Hexanol, 21 (-)-Mentol, 22 (R)-(-)-2-Heptanol, 23 (-)- $\alpha$ -Terpineol, 24 (+)-Mentol, 25 2-metil-2-heptanol, 26 (S)-(+)-2-Octanol, 27 (S)-(+)-2-Butanol, 28 (S)-(+)-2-Heptanol, 29 (R)-(-)-2-Octanol, P(+)-2-Octanol, 30 1-Decanol, 31 (-)- $\beta$ -Citronelol, 32 (S)-(-)-1-Feniletanol, 33 Propionaldehído, 34 Undecanal, 35

Octanal(aldehido caprílico), 36 trans-Cinnamaldehído, 37 Nonanal (Pelargonaldehido), 38 Heptaldehido, 39 Decanal, 40 ácido Hexanoico, 41 ácid Hexanoico, 42 ácido Heptanoico(ácido Oenántico), 43 ácido Pentanoico, 44 ácido Propiónico, 45 ácido butírico, 46 ácido nonanoico, 47 propionato de metilo, 48 butirato de etilo, 49 butirato de butilo, 50 propionato de terc-Butilo, 51 butirato de metilo, 52 butirato de propilo, 53 acetato de pentilo, 54 5 Dimetilpirazina, 55 Isobutilamina, 56 Geraniol, 57 2-Pentanona, 58 2-Butanona, 59 (1S)-(-)-a-Pineno, 60 1,4-Cineol, 61 Fenol, 62 éter butilmético, 63 (R)-(+)-Pulegona, 64 Benceno, 65 alcohol bencílico, 66 Guaiacol, 67 Isopentilamina, 68 g-Caprolactona, 69 g-Caprolactona, 70 octeno, 71 heptanoato de alilo, 72 a-Amilcinnamaldehido, 73 hexanoato de amilo, 74 butirato de amilo, 75 Anetol, 76 Anisaldehido, 77 Benzofenona, 78 acetato de bencilo, 79 salicilato de bencilo, 80 heptanoato de butilo, 81 alcanfor ((+)-alcanfor, 82 acetato de cedrilo, 83 alcohol cinamílico, 84 Cinnamaldehido, 85 (R)-(+)-Citronelal, 86 (S)-(-)-Citronelal, 87 citronelol, 88 Coumarina, 89 Ciclohexanona, 90 p-cimeni, 91 5,5-Dimetil-1,3-ciclohexanodiona (Dimedone), 92 etilamilcetona (3-Octanona), 93 Eucaliptol, 94 isobutirato de heptilo, 95 acetato de hexilo, 96 a-Hexylcinnamaldehido, 97 acetato de isobomilo, 98 Linalool, 99 Lyral (a-Amilcinnamaldehido dimetil acetal), 100 Hidroxicitronelal, 101 isobutirato de p-Tolilo, 102 isobutirato de o-Tolilo, 103 fenilacetato de p-Tolilo, 104 2-Metoxi-3-Metil-pirazina, 105 2-Metoxipirazina, 106 salicilato de metilo, 107 10 Mircene, 108 w-Pentadecalactona, 109 prenilacetato, 110 2-Feniletanol, 111 acetato de 2-Fenilo, 112 Piperonal, 113 Pirazina, 114 aceite de sasafrás 115 timol, 116 Trietilamina, 117 2-Heptanona, 118 Metil eugenol, 119 eugenol, 120 éter metílico de eugenol, 121 Butiraldehido, 122 Hexanal, 123 1-Pentanol, 124 valeraldehido, 125 dicloruro de ácido azelaico, 126 ácido azelaico, 127 ácido isovalérico, 128 ácido decanoico, 129 ácido vanílico, 130 1-Octanol, 131 4-Etilfenol, 132 Heptaldehido, 133 1-Nonanol, 134 Nonanal, 135 Etil vanillina, 136 Vanillina, 137Acetofenona, 20 138 2-Etilfenol, 139 Octanal.

Las sustancias químicas relacionadas con coumarina y piperonal (usadas para olfr62) son las siguientes: 140 Benzaldehido, 141 alcohol piperónílico, 142 4-Hidroxicoumarina, 143 4-Cromanona, 144 2-Coumaranona.

#### Ejemplo 20. Patrones de activación de los receptores de olores humanos.

Se usaron células Hana3A (células 293T que expresan REEP1, RTP1, RTP2, y G<sub>olf</sub> de ratón) Se usó CRE-Luciferasa (Stratagene) para medir las actividades del receptor de olor. En los siguientes receptores de olores humanos se analizaron los patrones de expresión en respuesta a varios agentes odoríferos: 36, 35, 11, 57, 58, 9, 3, 42, 81, 82, 66, 13, 87, 33, 44, 43, 77, 75, 64, 59, 12, 62, 60, 120, 90, 95, 160, y 106. Los siguientes agentes odoríferos se usaron para analizar los patrones de expresión del receptor de olor humano: Piridina, 2,2' -(Ditiodimetilen)difurano, 1-Decanol, 1-Hexanol, (-)-Fenchona, (+)-Fenchona, Geraniol, 2-Pentanona, salicilato de bencilo, (+)-Mentol, (-)-Mentol, Benceno, Undecanal, butilato de metilo, isobutirato de heptilo, isobutirato de p-Tolilo, amilbutirato, butirato de etilo, acetato de hexilo, acetato de pentilo, acetato de piperonilo, (-)-b-Citronelol, citronelol, éter metílico de eugenol, Metil Eugenol, a-Amilcinnamaldehido, a-Amilcinnamaldehido dimetil acetal, Cinnamaldehido, a-Hexylcinnamaldehido, Hidroxicitronelal, Citral, (R)-(+)-Citronelal, (S)-(-)-Citronelal, fenilacetato de p-Tolilo, fenilacetato de alilo, ácido propiónico, dicloruro de ácido azelaico, ácido isovalérico, ácido (R)-(-)-2-fenilbutírico, ácido (S)-(+)-2-fenilbutírico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido valérico, ácido hexanoico y butirato de butilo. Se usó luciferasa de renilla dirigida por el promotor constitutivamente activo de SV40 (pRL-SV40: Promega) como control interno. Se usó el sistema Dual-Glo (Promega) para el ensayo de la luciferasa. Las células se sembraron en placas sobre placas de 96 pocillos revestidos con D-lisia (BIOCOAT, Beckton Dickinson). 12.16 horas después de la transfección, el medio se sustituyó con medio definido químicamente CD293 (Invitrogen) y las placas se incubaron durante una hora a 37 °C. El medio se sustituyó con 50 µl de soluciones de olor disueltas en CD293 y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Se siguió el protocolo del fabricante para medir las actividades de luciferasa y de luciferasa de renilla. La luminiscencia se midió usando Wallac Victor 1420 (Perkin-Elmer). La actividad normalizada de la luciferasa se calculó como [Luc (N)-Luc (0)]/RL (N), en la que Luc (N) = recuento luminiscente de un determinado pocillo, Luc (0) = recuento luminiscente sin olor para cada OR, y RL (N) = recuento luminiscente de la luciferasa de renilla de cada pocillo. La Figura 34 muestra los patrones de activación de los receptores de olor humanos en respuesta a la exposición al agente odorífero.

#### Ejemplo 21. Expresión en la superficie celular de V1RE11 en células Hana3A y 293T

Los ADNc que codifican un supuesto receptor de feromonas (V1RE11) se transfecaron a células Hana3A (células HEK293T que expresan REEP1, RTP1, RTP2 y G<sub>olf</sub>) o células 293T. V1RE11 es un supuesto receptor de feromonas en ratón y es completamente diferente de los receptores de olor en las secuencias de aminoácidos. Las células Hana3A soportaron la expresión en la superficie celular de V1RE11. La presente invención no está limitada a ningún mecanismo concreto. De hecho, no es necesario conocer el mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, estos resultados indican que REEP1, RTP1, y RTP2 pueden respaldar la expresión funcional de receptores aparte de los receptores de olor.

#### Ejemplo 22. La capacidad de RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D y RTP1-E para potenciar la expresión en la superficie celular de OLFR62 y la actividad-referencia

Este ejemplo describe la generación de las variantes de RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D y RTP1-E y su capacidad para potenciar la expresión en la superficie celular de OLFR62 y su actividad. Se generaron variantes de RTP1 delecionando porciones de RTP1. La Figura 35 muestra esquemáticamente los segmentos de aminoácidos de RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, y RTP1-E en comparación con RTP1. pCI fue el vector control. La Figura 36

muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-A ((SEC ID Nº 41). La Figura 37 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-B ((SEC ID Nº 42). La Figura 38 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-C ((SEC ID Nº 43). La Figura 39 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-D ((SEC ID Nº 44) y la Figura 40 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-E ((SEC ID Nº 45).

5 La Figura 41 muestra la expresión en la superficie celular de OLFR62 en células Hana3A y 293T. Los ADNc que codifican RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E y pCI como control se transfecaron en células Hana3A o 293T. Se observó un incremento de la tinción en la superficie celular en células Hana3A y 293T que expresan RTP1-D.

10 La Figura 42 muestra esquemáticamente un ensayo de luciferasa usado para monitorizar la actividad de OLFR62. El elemento respondedor a AMPc (CRE) y la luciferasa se usaron para monitorizar la activación de OLFR62. La activación de OLFR62 aumenta el AMPc, que potencia la expresión del gen indicador de luciferasa a través de CRE.

La Figura 43 muestra la actividad de OLFR62 como indica la expresión de la luciferasa en células Hana3A y 293T. que expresan RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-D, RTP1-E y pCI como control. Se observó una mayor potenciación de la actividad de OLFR62 en células Hana3A y 293T que expresan RTP1-D.

15 **Ejemplo 23. La capacidad de RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2 y RTP1-D3 para potenciar la expresión en la superficie celular de OLFR62 y la actividad**

Este ejemplo describe la generación de las variantes de RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, and RTP1-D3 y su capacidad para potenciar la expresión en la superficie celular de OLFR62 y su actividad. Las variantes de RTP1 se generaron delecionando porciones de RTP1-A and RTP1-D. En concreto, se expusieron pares de cebadores en 20 localizaciones específicas correspondientes a segmentos de delección deseados y se amplificaron mediante PCR con KOD polimerasa. La Figura 44 muestra esquemáticamente los segmentos de aminoácidos de RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3 en comparación con RTP1-A y RTP1-D, respectivamente. La Figura 45 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-A1 ((SEC ID Nº 46) y la secuencia de aminoácidos humana para RTP1-A1 ((SEC ID Nº 47). La Figura 46 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP1-D1 (SEC ID Nº 48). La 25 Figura 47 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP-D2 (SEC ID Nº 49). La Figura 48 muestra la secuencia de aminoácidos murina para RTP-D3 (SEC ID Nº 50).

La Figura 49 muestra la expresión en la superficie celular de OLFR62 en células 293T. Los ADNc que codifican RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3 y pCI como control se transfecaron en células 293T. Se observó un incremento de la tinción en la superficie celular en células 293T que expresan RTP1-A1, RTP1-D1 y RTP1-D3.

30 La Figura 50 muestra la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-1 como indica la expresión de la luciferasa en células 293T que expresan RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3, y pCI como control. Se observó una mayor potenciación de la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-en células 293T que expresan RTP1-A1.

La Figura 51 muestra la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-1 como indica la expresión de la luciferasa en células Hana3A que expresan RTP1, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, y RTP1-D3, y pCI como control.

35 La Figura 52 muestra la expresión en la superficie celular de OLFR62, OREG, MOR203-1, S6, y 23-1 en células 293T cotransfectedas con RTP1, RTP1-A1 o pCI control. Los ADNc que codifican RTP1, RTP1-A1 y pCI como control se transfecaron en células. Se observó un incremento de la tinción en la superficie celular en células que expresan RTP1-A1.

**Ejemplo 24. Quimeras de RTP1 y RTP4- Referencia**

40 Este ejemplo describe las quimeras de RTP1 y RTP4 generadas con PCR químérica. En concreto, los cebadores de quimeras complejos se diseñaron en los puntos de conexión de las secuencias RTP1 y RTP4. Para cada quimera, primero se amplificaron dos pares de cebadores (p. ej., cebador directo y cebador complejo, cebador complejo y cebador inverso). Después, los dos productos de la PCR se usaron como moldes en una posterior PCR con megacebador con los cebadores directos e inversos originales, para obtener una quimera deseada. La Figura 53 muestra esquemáticamente los segmentos de aminoácidos de RTP1-A1-A (Quimera 1), RTP1-A1-D2 (Quimera 2), RTP1-A1-D1 (Quimera 3), RTP4-A1-A (Quimera 4), RTP14-A1-D2 (Quimera 5), y RTP4-A1-D1 (Quimera 6).

La Figura 54 muestra la expresión en la superficie celular de un OR en células que expresan RTP1, RTP4, Quimera 1, Quimera 2, Quimera 3, Quimera 4, Quimera 5, Quimera 6, and control pCI. Los ADNc que codifican RTP1, RTP4, RTP1-A1, Quimera 1, Quimera 2, Quimera 3, Quimera 4, Quimera 5, Quimera 6, y pCI control se transfecaron en 50 células 293T.

La Figura 55 muestra la actividad de OLFR62, OREG, S6, y 23-1 como indica la expresión de la luciferasa en células 293T que expresan RTP1, RTP4, RTP1-A1, RTP1-D1, RTP1-D2, Quimera 1, Quimera 2, Quimera 3, Quimera 4, Quimera 5, Quimera 6, y pCL control.

55 La Figura 56 muestra la detección de RTP1, RTP1-A, RTP1-B, RTP1-C, RTP1-A1, RTP1-D, Quimera 4, Quimera 5, RTP1-D3, RTP1-D1, Quimera 6, y RTP4 usando anti-RTP1.

**REIVINDICACIONES**

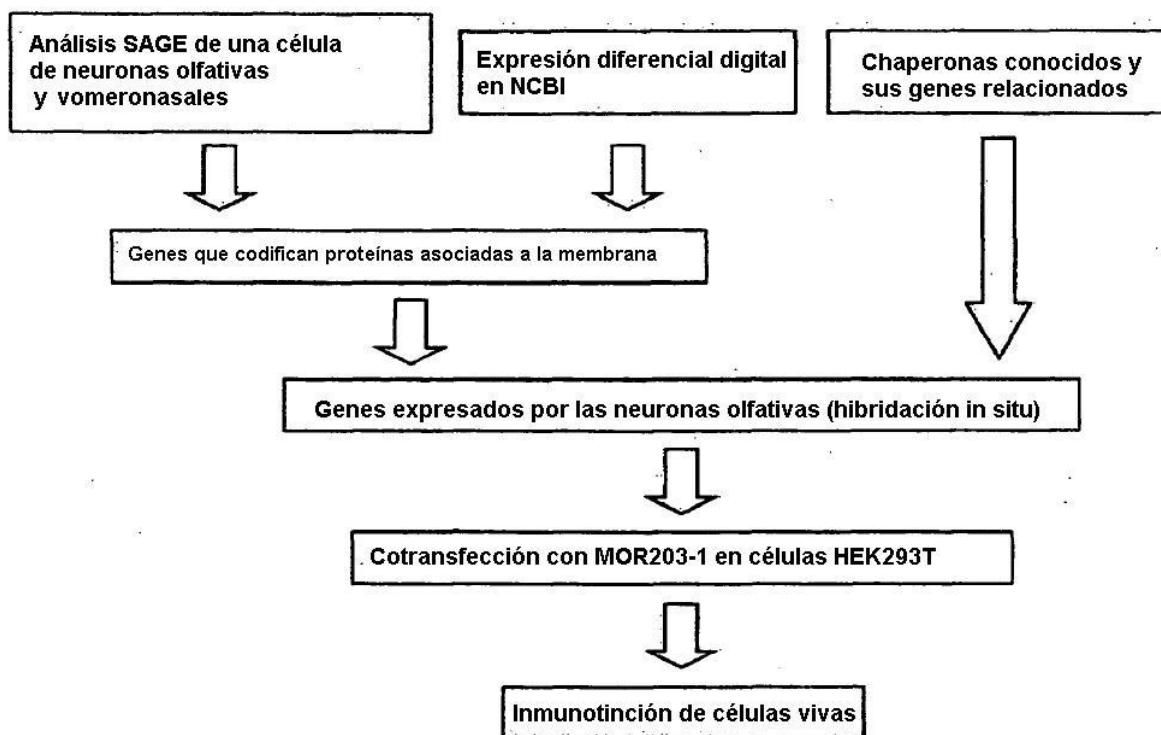
1. Un procedimiento para identificar un ligando del receptor de olor, que comprende:
  - a) proporcionar
    - i) una línea celular, en la que dicha línea celular expresa RTP1, RTP1-A1, RTP1-D3 o RTP2, en la que
      - RTP1 es el polipéptido de la SEC ID Nº 33 o 37,
      - RTP1-A1 es el polipéptido de la SEC ID Nº 46 o 47,
      - RTP1-D3 es el polipéptido de la SEC ID Nº 50, y
      - RTP2 es el polipéptido de la SEC ID Nº 34 o 38, y dicha línea celular comprende un receptor de olor y un agente informador, y
    - ii) un compuesto de ensayo;
  - b) exponer dicho compuesto de ensayo a dicha línea celular; y medir la actividad de dicho agente informador.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha línea celular es una línea celular HEK 293T.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho receptor de olor se selecciona del grupo que consiste en:
  - un receptor de olor humano,
  - un receptor de olor murino, y
  - un receptor de olor sintético.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de ensayo es una molécula odorífera.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente informador está regulado por un elemento respondedor al AMPc.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha línea celular comprende además G<sub>olf</sub>.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho receptor de olor comprende S6/79, S18, S46, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y/o MOR32-11.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente informador es un agente de iluminación y en el que dicho agente de iluminación es, preferentemente, luciférica.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de d) detectar la presencia o la ausencia de un ligando del receptor de olor basándose en la actividad de dicho agente informador.
- 30 10. Una línea celular que comprende expresar un receptor de olor,
  - en la que
    - dicha expresión se localiza en la superficie celular
  - y
    - dicha línea celular comprende un gen heterólogo,
- 35 en la que dicho gen heterólogo comprende uno o más de RTP1, RTP1-A1, RTP1-D3 y RTP2, y en la que
  - RTP1 es el polipéptido de la SEC ID Nº 33 o 37,
  - RTP1-A1 es el polipéptido de la SEC ID Nº 46 o 47,
  - RTP1-D3 es el polipéptido de la SEC ID Nº 50, y
  - RTP2 es el polipéptido de la SEC ID Nº 34 o 38.
- 40 11. La línea celular de la reivindicación 10, en donde dicha línea celular es una línea celular HEK 293T.
12. La línea celular de la reivindicación 10, en la que dicho receptor de olor se selecciona del grupo que consiste

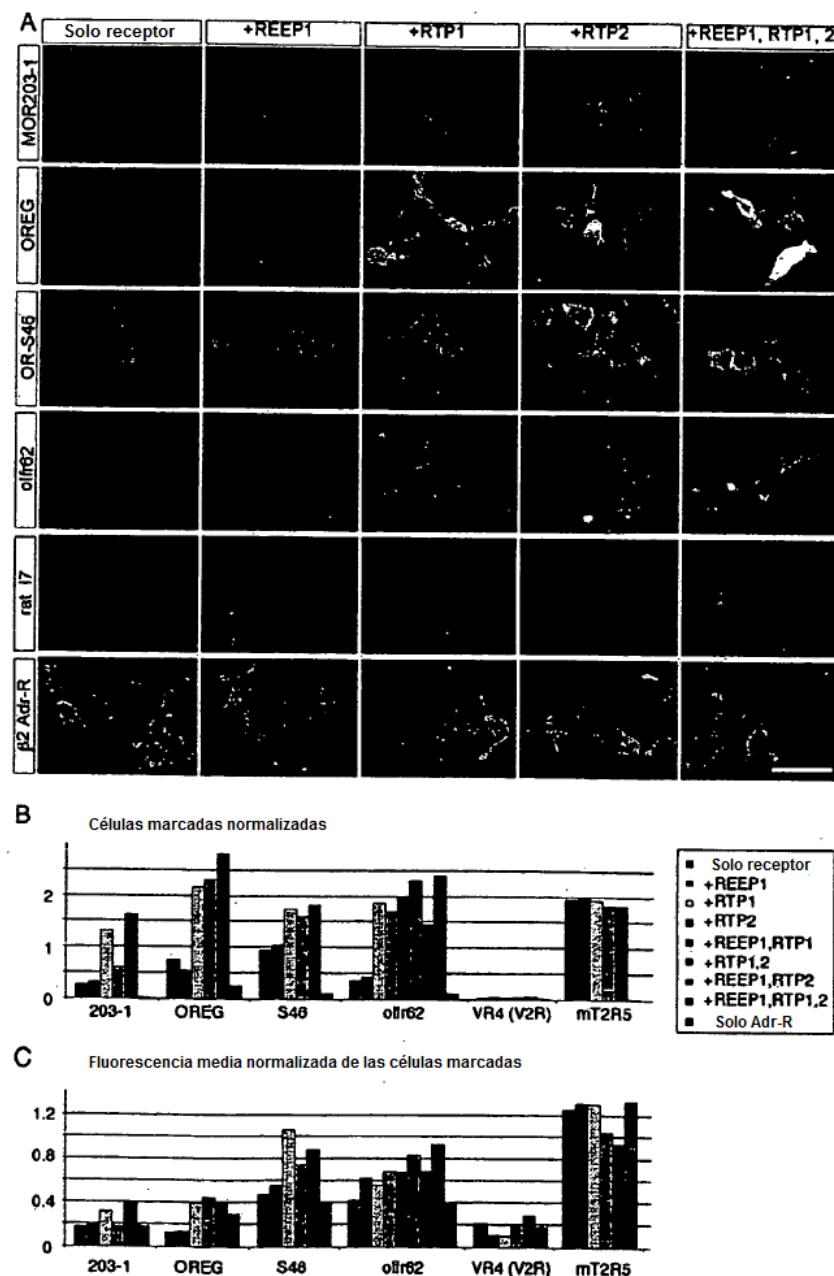
en:

- un receptor de olor humano,
- un receptor de olor murino, y
- un receptor de olor sintético.

- 5    13. La línea celular de la reivindicación 11, en la que dicho receptor de olor está marcado con un agente informador, en donde dicho agente informador es, preferentemente, un agente informador de iluminación y en el donde agente informador de iluminación comprende además, preferentemente, glutatión-S-transferasa (GST), c-myc, 6-histidina (6X-His), proteína fluorescente verde (GFP), proteína de unión a la maltosa (MBP), hemaglutinina del virus de la gripe A (HA),  $\beta$ -galactosidasa o GAL4.
- 10    14. La línea celular de la reivindicación 10, en donde dicha línea celular comprende además expresión de G<sub>olf</sub>.
15. La línea celular de la reivindicación 10, en la que dicho receptor de olor comprende S6/79, S18, S46, S50, MOR23-1, MOR31-4, MOR31-6, MOR32-5 y MOR32-11.

## FIGURA 1



**FIGURA 2**

**FIGURA 2D**

|                   | Sin transfectar | Adr-R solo | Receptor | Número de células marcadas (%) |       |        |             |
|-------------------|-----------------|------------|----------|--------------------------------|-------|--------|-------------|
|                   |                 |            |          | +RTP1                          | +RTP2 | +REEP1 | +RTP1,REEP1 |
| MOR203-1+, Adr-R+ | 0.06            | 0.14       | 0.5      | 4.8                            | 0.75  | 0.86   | 5.9         |
| Adr-R+            | 1.05            | 23.62      | 17.83    | 18.41                          | 17.38 | 18.55  | 18.21       |
| Proporción        |                 | 0.006      | 0.028    | 0.261                          | 0.043 | 0.051  | 0.324       |
| OREG+, Adr-R+     | 0.08            | 0.36       | 1.46     | 11.09                          | 6.08  | 1.85   | 7.45        |
| Adr-R+            | 2.37            | 50.55      | 57.48    | 62.89                          | 51.27 | 63.72  | 47.74       |
| Proporción        |                 | 0.007      | 0.025    | 0.176                          | 0.119 | 0.029  | 0.156       |
| OR-S46+, Adr-R+   | 0.31            | 0.75       | 6.17     | 12.28                          | 8.05  | 5.17   | 9.23        |
| Adr-R+            | 3.85            | 13.91      | 17.32    | 19.41                          | 21.67 | 18.57  | 18.56       |
| Proporción        |                 | 0.054      | 0.356    | 0.633                          | 0.371 | 0.278  | 0.497       |
| Olf62+, Adr-R+    | 0.11            | 0.3        | 3.43     | 15.23                          | 11.23 | 2.98   | 11.94       |
| Adr-R             | 1.77            | 31.53      | 22.2     | 27.68                          | 27.22 | 20.19  | 20.87       |
| Proporción        | 0.066           | 0.009      | 0.13     | 0.557                          | 0.425 | 0.133  | 0.583       |
| VR4(V2R)+, Adr-R+ | 0.05            | 0.08       | 0.64     | 0.49                           | 1.22  | 1.89   | 1.68        |
| Adr-R             | 3.09            | 41.5       | 44.17    | 44.66                          | 40.61 | 42.71  | 38.54       |
| Proporción        |                 | 0.002      | 0.014    | 0.011                          | 0.03  | 0.044  | 0.043       |
| mT2R5+, Adr-R+    | 0.18            | 0.45       | 21.59    | 20.89                          | 18.24 | 20.74  | 16.83       |
| Adr-R             | 2.41            | 27.79      | 26.32    | 24.37                          | 23.18 | 25.09  | 22.15       |
| Proporción        |                 | 0.021      | 0.022    | 0.085                          | 0.084 | 0.013  | 0.0754      |

|                   | Sin transfectar | Adr-R solo | Receptor | Media de células marcadas (AU) |       |        |             |
|-------------------|-----------------|------------|----------|--------------------------------|-------|--------|-------------|
|                   |                 |            |          | +RTP1                          | +RTP2 | +REEP1 | +RTP1,REEP1 |
| MOR203-1+, Adr-R+ | 15.58           | 17.25      | 19.29    | 24.41                          | 19.25 | 24.78  | 24.43       |
| Adr-R             | 42.76           | 57.73      | 45.09    | 41.66                          | 42.5  | 39.69  | 44.63       |
| OREG+, Adr-R+     | 24.2            | 22.84      | 27.07    | 48.59                          | 45.15 | 26.66  | 50.4        |
| Adr-R             | 12.23           | 79.49      | 77.78    | 83.59                          | 58.58 | 81.47  | 62.41       |
| OR-S46+, Adr-R+   | 13.85           | 13.97      | 19.02    | 31.02                          | 19.84 | 18.24  | 23.19       |
| Adr-R             | 26.96           | 49.14      | 38.84    | 43.82                          | 37.78 | 44.51  | 39.58       |
| Olf62+, Adr-R+    | 18.94           | 20.65      | 22.67    | 42.11                          | 35.59 | 25.82  | 46.81       |
| Adr-R             | 38.08           | 69.4       | 53.57    | 62.25                          | 54.79 | 52.1   | 52.36       |
| VR4(V2R)+, Adr-R+ | 23.22           | 29.22      | 31.14    | 31.81                          | 32.66 | 28.86  | 26.31       |
| Adr-R             | 23.59           | 85.74      | 59.78    | 63.33                          | 51.56 | 59.7   | 47.11       |
| mT2R5+, Adr-R+    | 20.26           | 20.08      | 65.81    | 71.79                          | 61.14 | 64.25  | 58.48       |
| Adr-R             | 26.14           | 61.82      | 44.88    | 48.61                          | 44.76 | 44.05  | 44.95       |

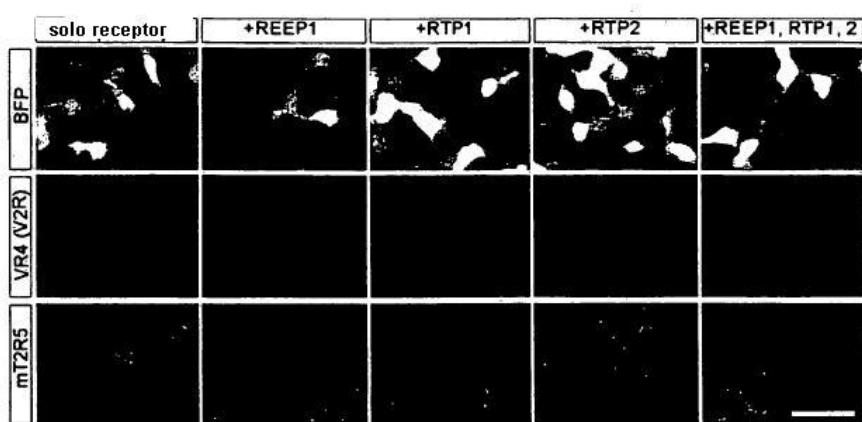
**FIGURA 3**

FIGURA 4A

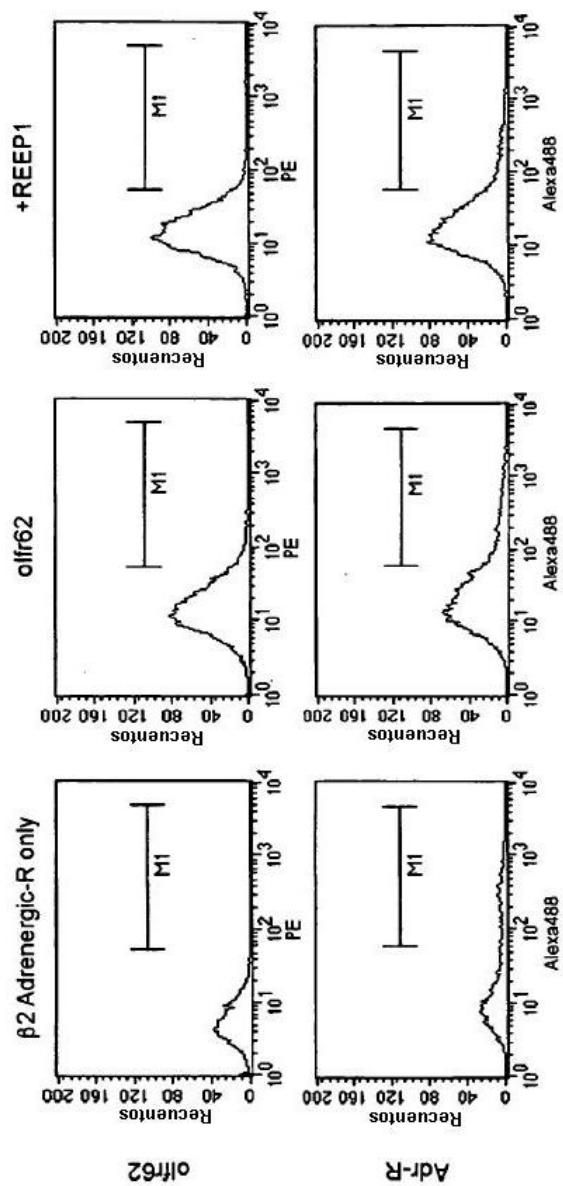


FIGURA 4A (cont.)

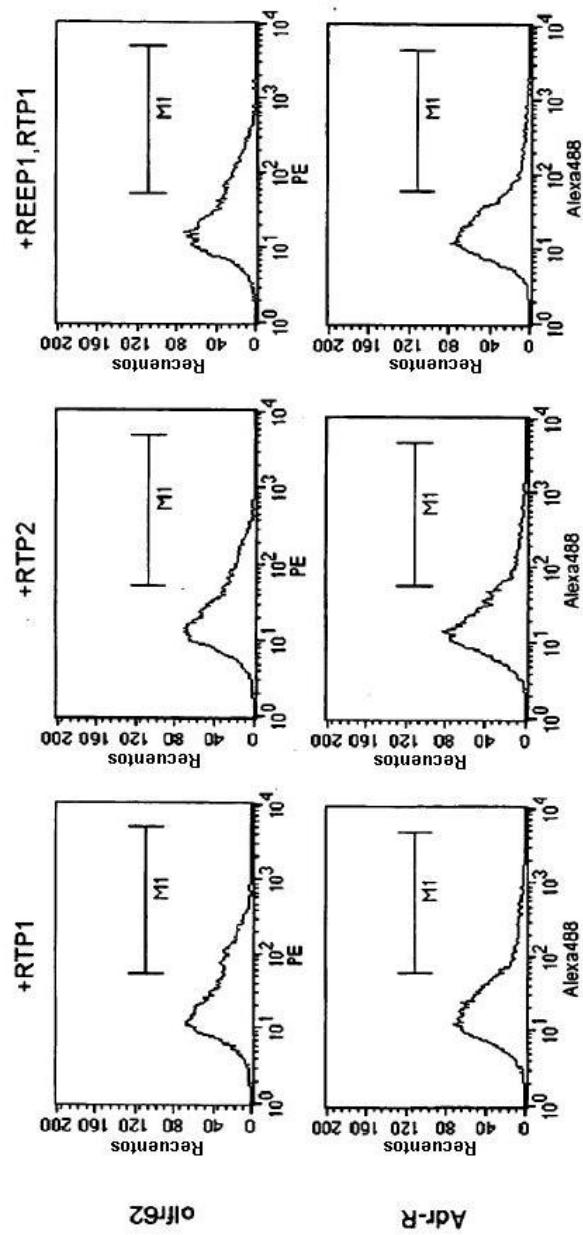


FIGURA 4A (cont.)

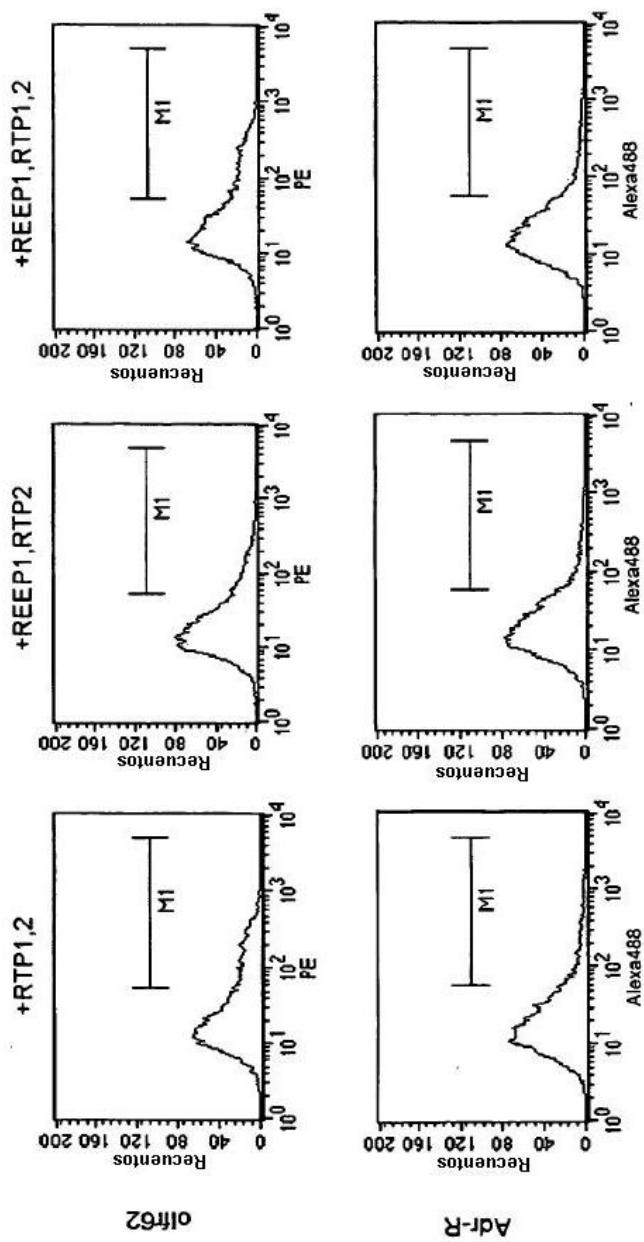


FIGURA 4 B

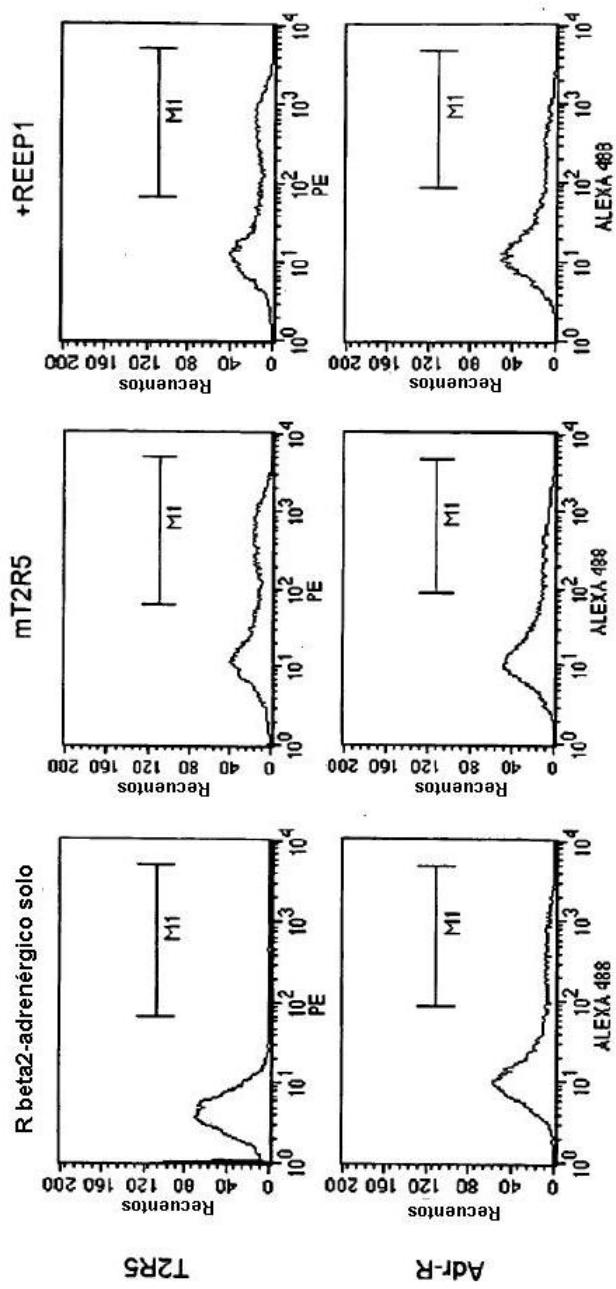
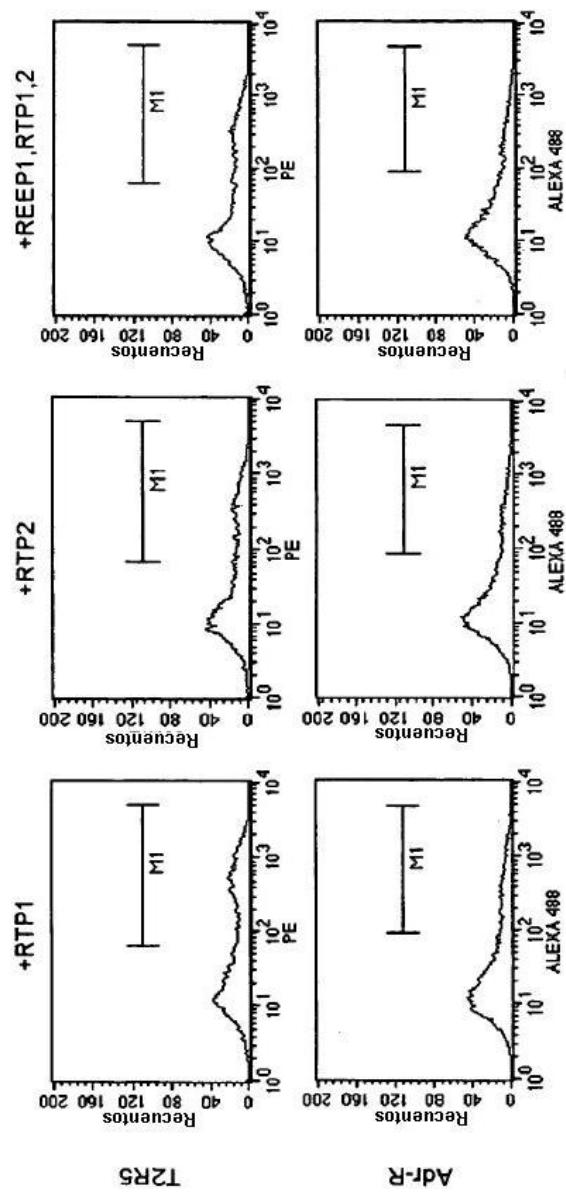
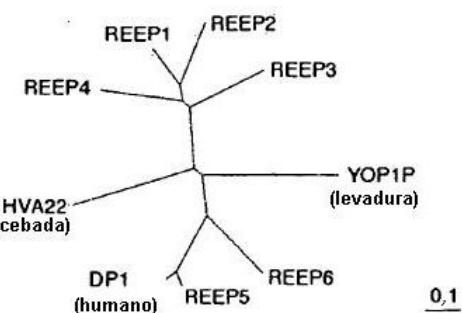


FIGURA 4 B (cont.)



**FIGURA 5****A REEP1**

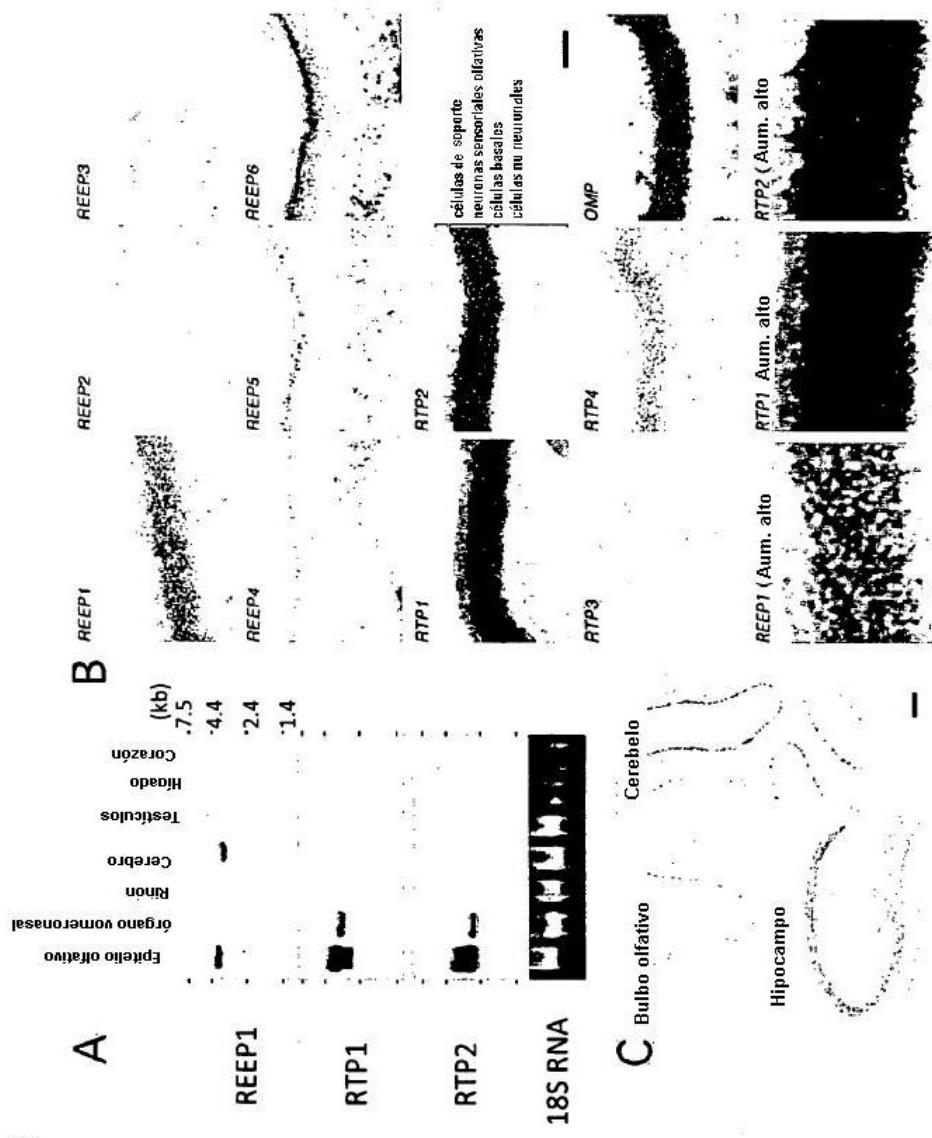
MVSWIIISRLVVLIFGTLYPAYYSYKAVKSIDIKEYVRWMM 40  
TM/SS  
YWIIFALFTTAETFTDIFLCWFPPFYELKIAFVAWLSPY 80  
TM  
TKGSSLLYRKFVHPTLSSKEKEIDDCLVQAKDRSYDALVH 120  
FGKRLGLNVAATAAVMAASKGQQGALSERLRSFSMQDLTTIR 160  
GDGAPAPSGPPPPGTGRSSGKHSQPKMSRSASESAGSSGT 200  
A----- 201

**B**0.1**C**

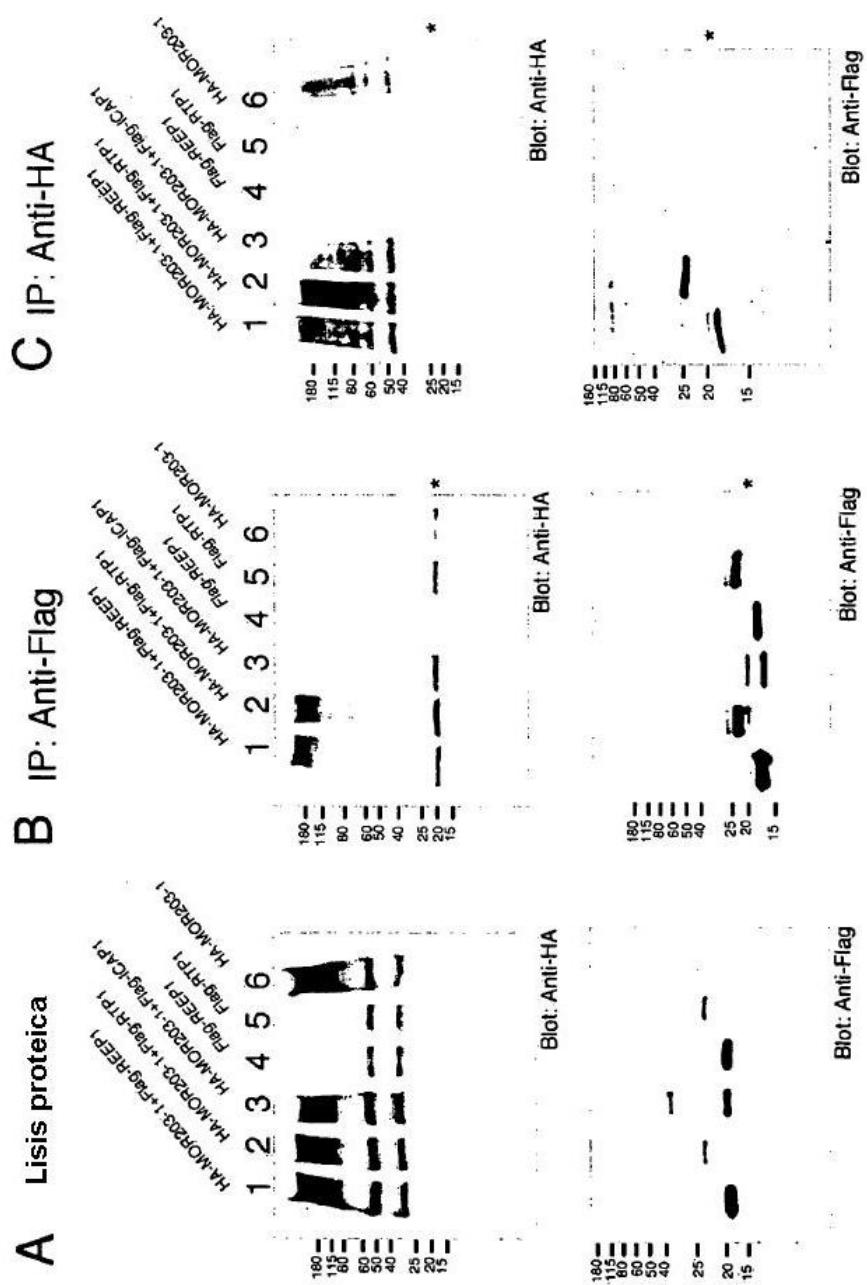
|      |  |     |
|------|--|-----|
| RTP1 | MRIPRPWRLRCPALHLPSFPTFSIKCSLPPPLPTDEDMCKS  | 40  |
| RTP2 | -----MSTS                                  | 4   |
| RTP1 | VTTGEWKKVFYEKMEEVKPADSWDFIIDPNLKENVILAPGW  | 80  |
| RTP2 | LTTCEWKKVFYEKMEEVAKPADSWELIIDPTLKPNELGPGW  | 44  |
| RTP1 | KQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPEVVLFHEMYLDKAQRA   | 120 |
| RTP2 | KQYLEQHASGRFHCSWCWHTWQSANVVLFHEMLDRAQRV    | 84  |
| RTP1 | GSVRMRVFKQLCYECGATARLDESSMLEENIESLVDNLITS  | 160 |
| RTP2 | GSVRMRVFKQLCYQCGTSRLDESSMLEENIEGLVDNLITS   | 124 |
| RTP1 | LREQCYGERGGHRYIHVASRQDNRRERGEFCEACQEGIVH   | 200 |
| RTP2 | LREQCYDEDGGQYRIHVASRPDSGLERSEFCEACQEGIVH   | 164 |
| RTP1 | WKPSEKLLEEEEATTYTFSRAPSPTKPQAETGSGCNFC SIP | 240 |
| RTP2 | WKPSEKLLEEDAAYTDAS-----KKKGQAGFISSFFSFR    | 198 |
| RTP1 | WCLFWATVLMILYYLQFSVRTSV-----               | 263 |
| RTP2 | WCLFWGTLCLVIVYLOFGRGRSGPL-----             | 223 |

TM

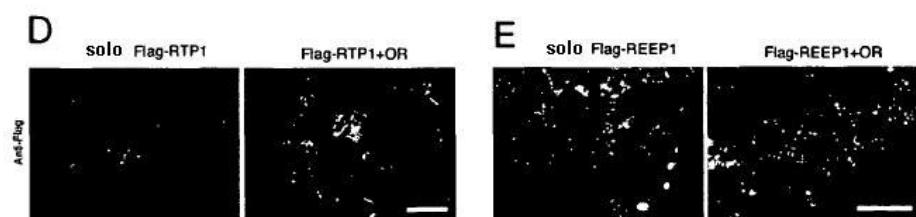
FIGURA 6



**FIGURA 7**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

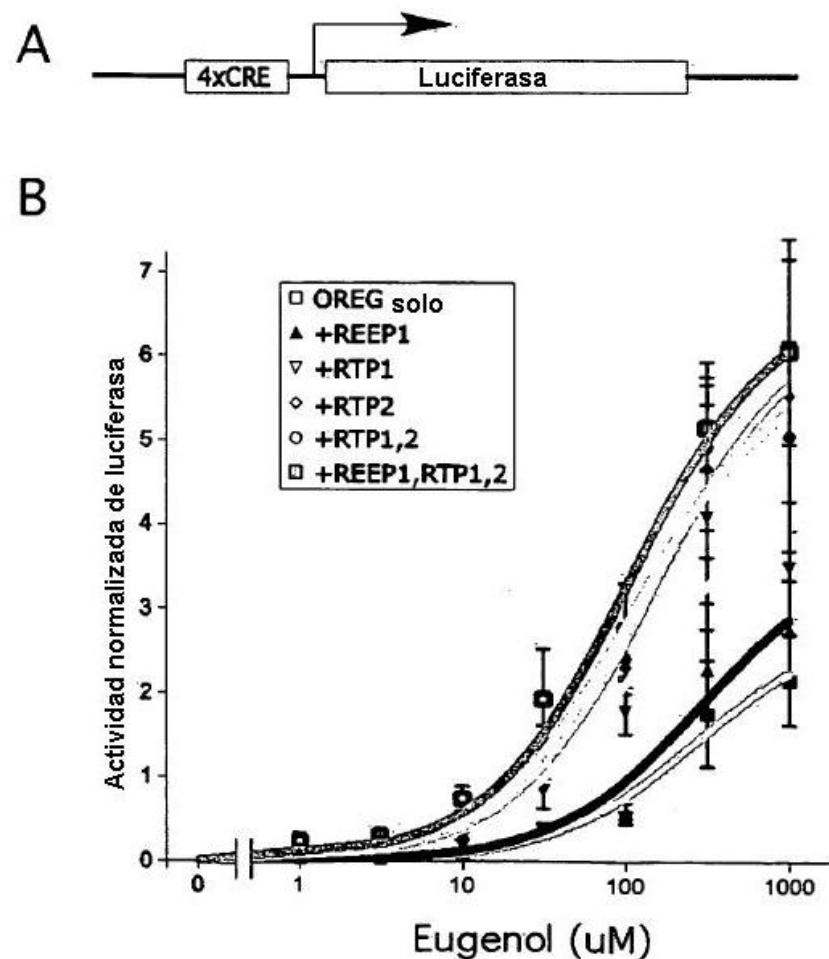
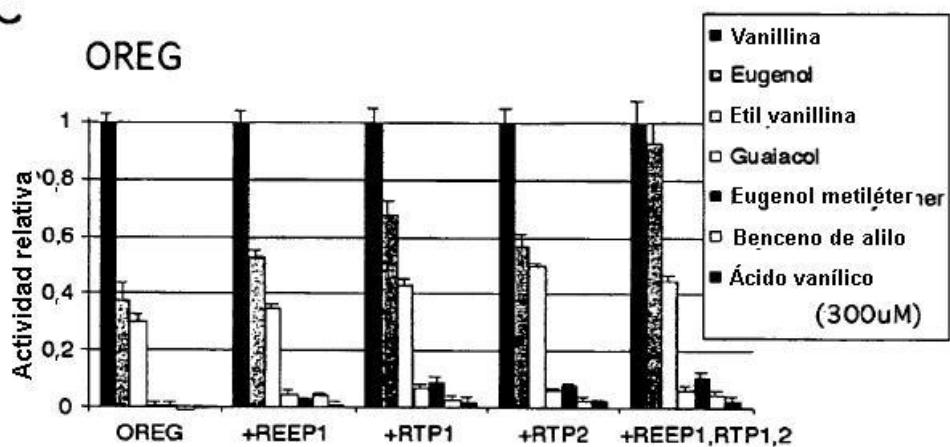


FIGURA 8

C

OREG



OR-S46

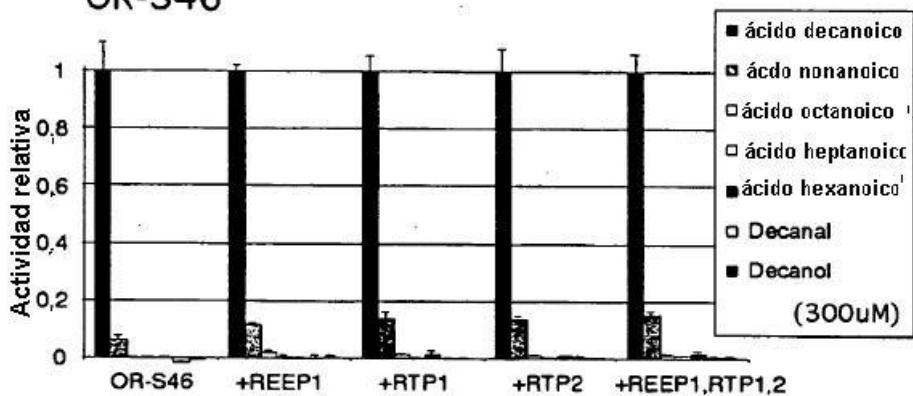


FIGURA 8

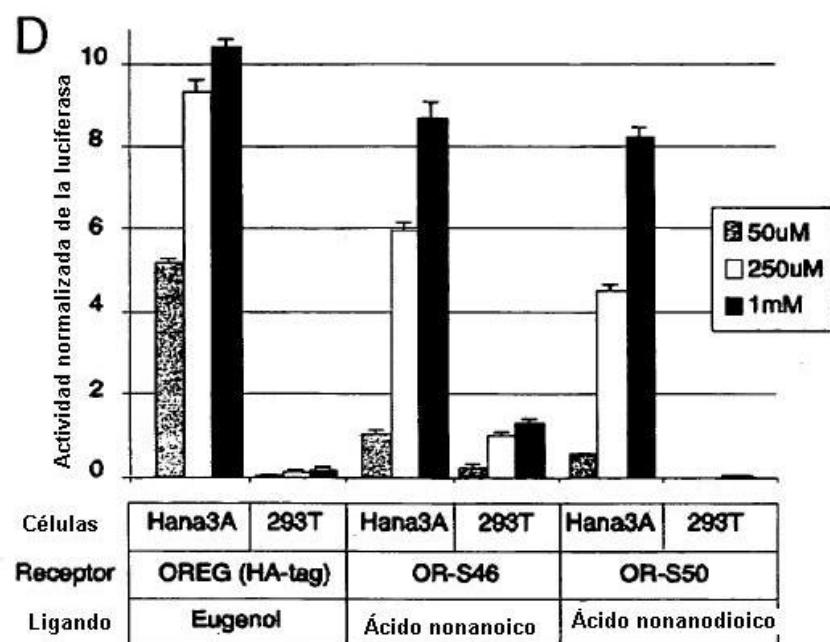
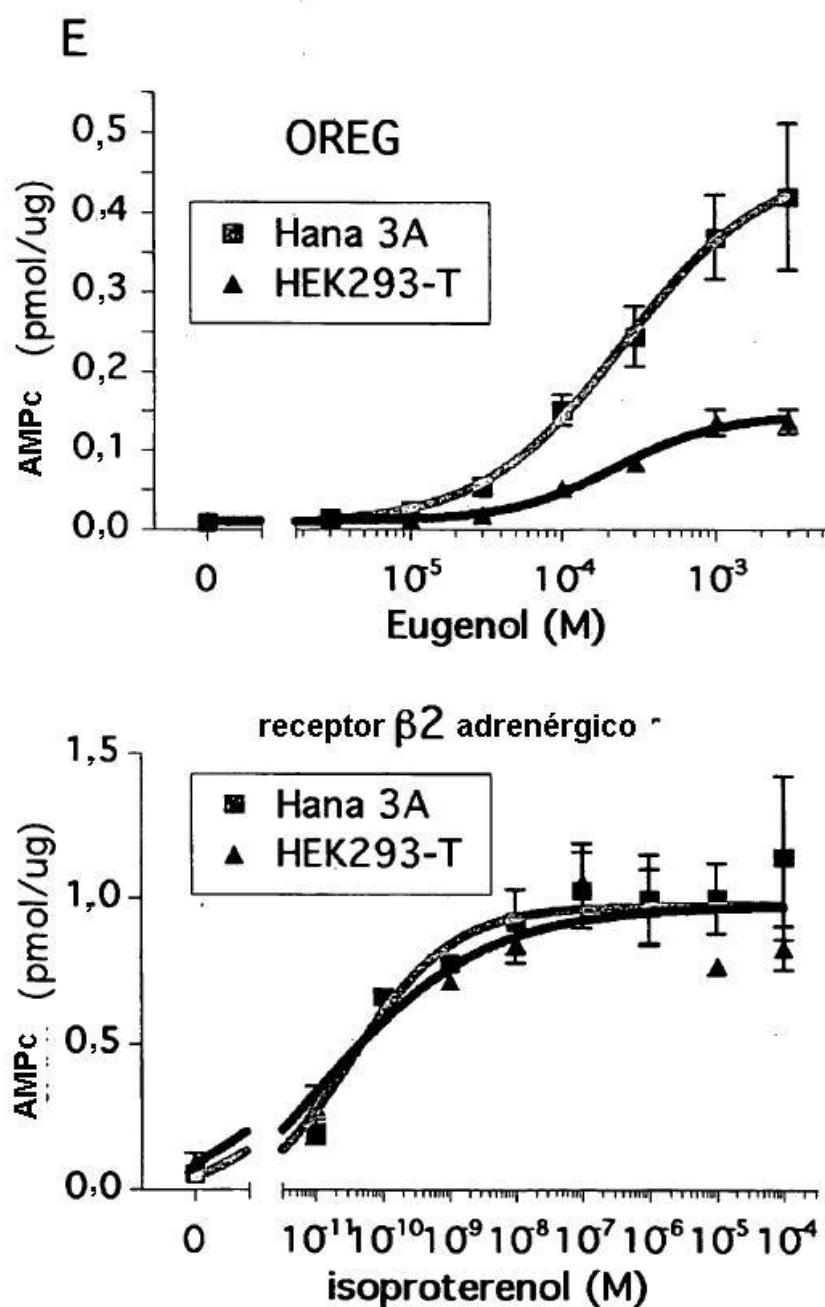
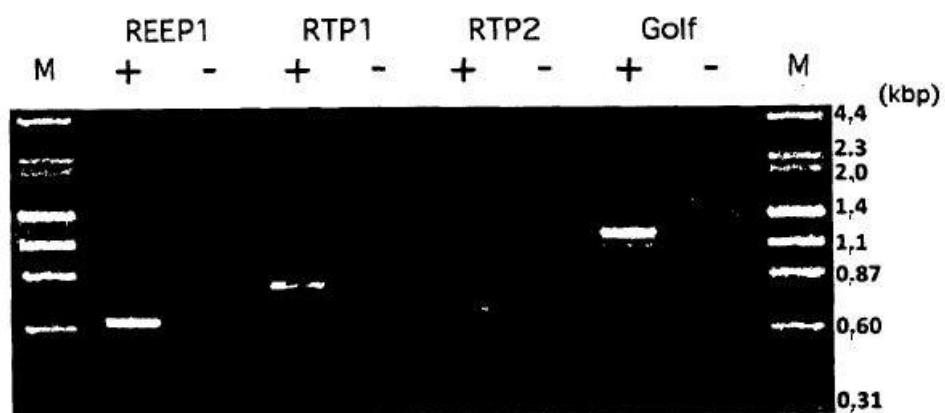


FIGURA 8



**FIGURA 9**



**FIGURA 10**

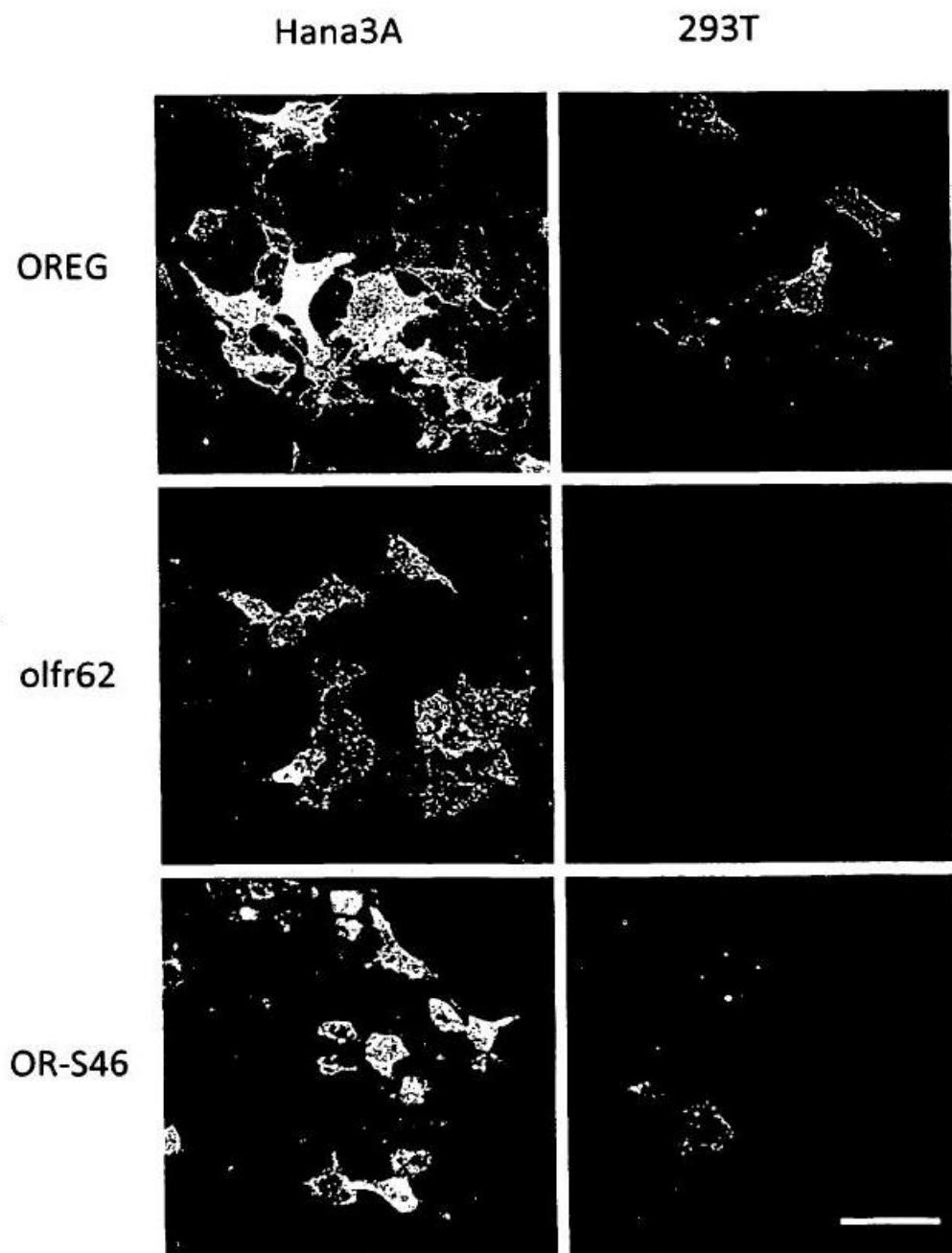
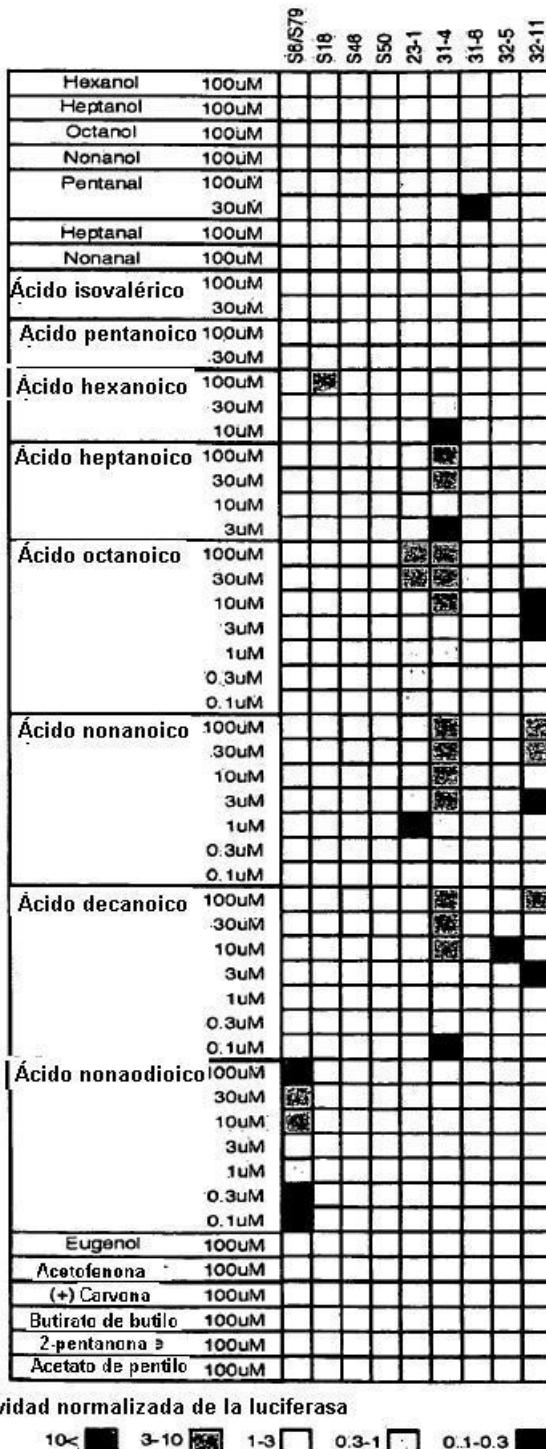
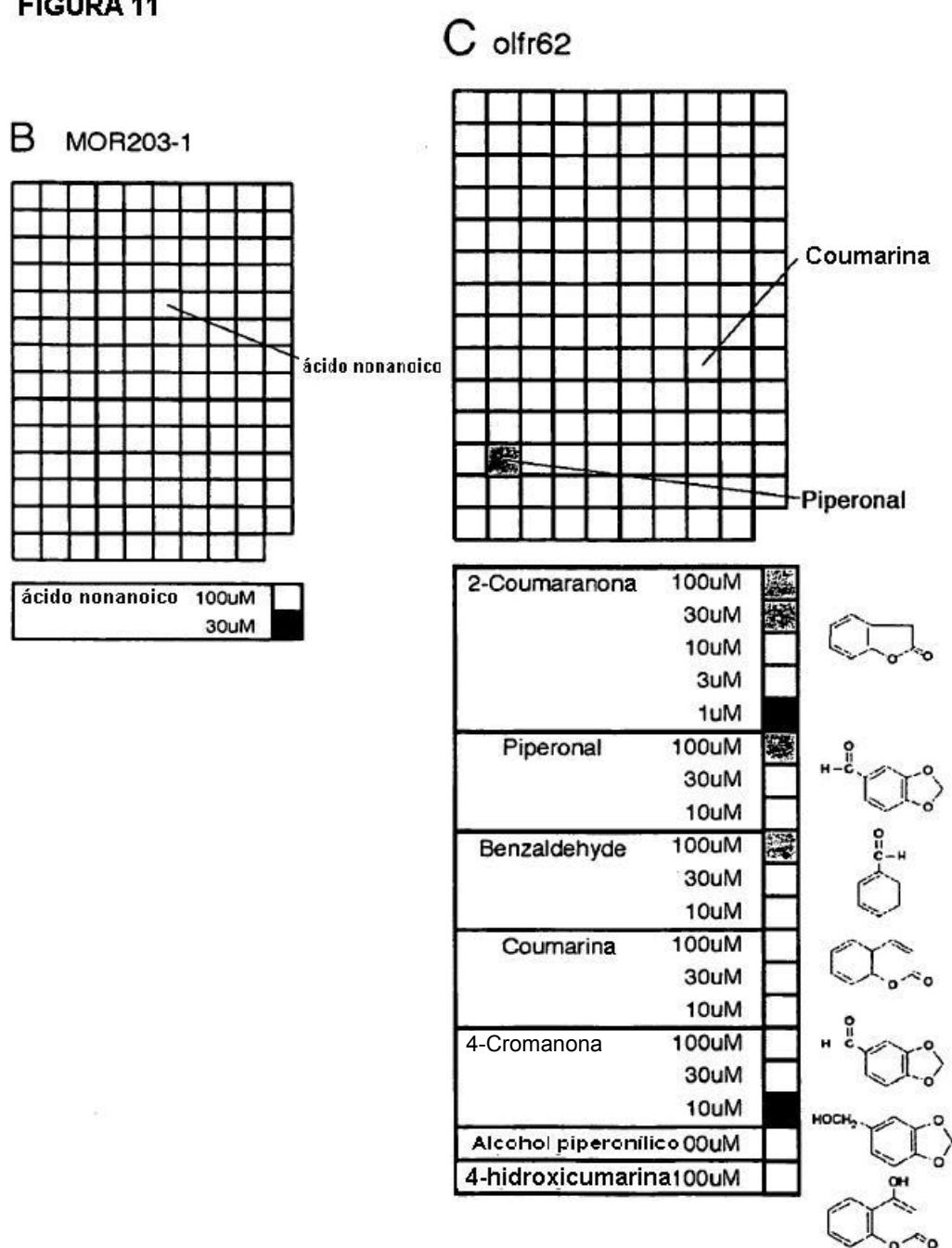
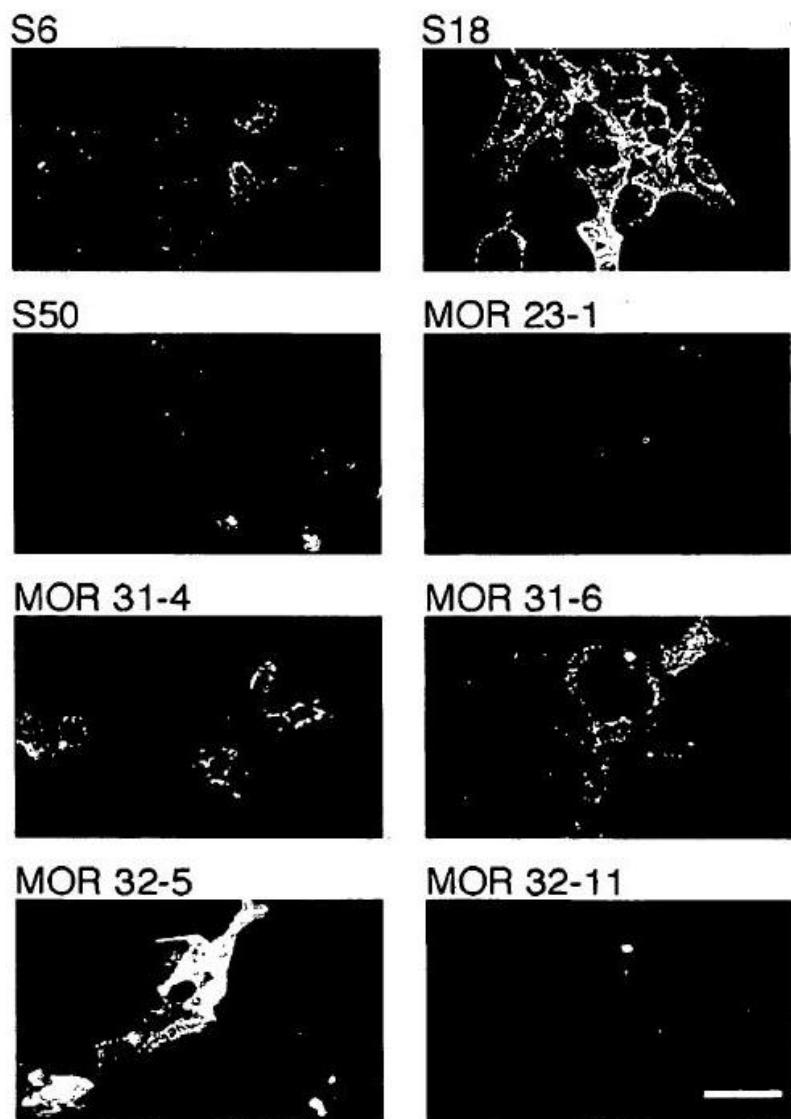


FIGURA 11A

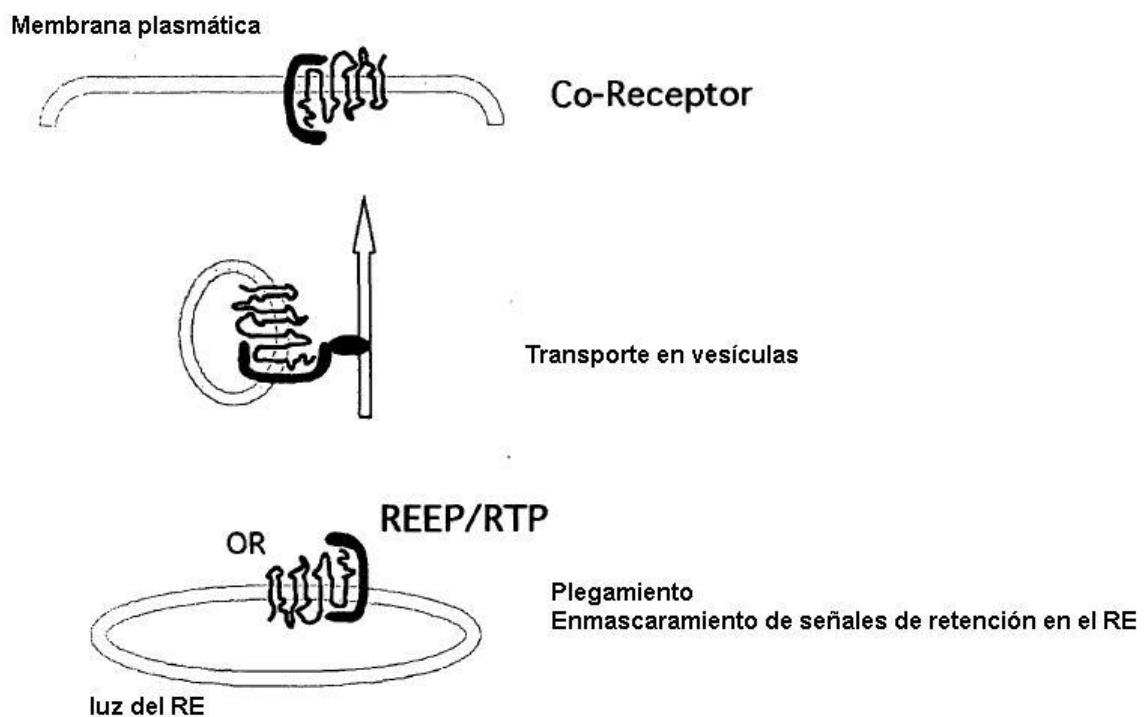


**FIGURA 11**

**FIGURA 12**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14- Referencia**

SEC ID N° 1 (secuencia de ácido nucleico de REEP1 murino)

ATGGTGTGTTGGATCATCTCCAGGCTGGTGGTGCCTATATTGGCACCCCTTA  
TCCTGCATATTATTCATAACAAGGCTGTGAAGTCCAAGGACATTAAAGAATAT  
GTCAAATGGATGATGTATTGGATTATATTGCCCTCTCACCACGGCAGAGAC  
GTTCACAGACATCTCCCTTGCTGGTTCCATTCTATTATGAACTAAAAATAG  
CGTTGTAGCCTGGCTGCTGTCTCCCTATACAAAAGGATCCAGCCTCTGTAC  
AGGAAGTTGTCATCCCACATTGTCCTCAAAAGAAAAGGAATCGATGACT  
GCCTGGTCCAAGCAAAAGATCGAACGCTATGACGCCCTGTGCACTTTGGAA  
GCGGGGCTGAATGTGGCAGCCACTGCAGCTGTGATGGCTGCCCTCAAGGGA  
CAGGGTGCCTGTCAAGAGAGACTCCGGAGCTTCAGCATGCAGGACCTCACCA  
CCATCAGGGGTGATGGTGCTCTGCTCCCTCGGGCCCTCTCCACCAGGGACT  
GGCGGGTCCAGCGCAAACACAGCCAGCCCAGATGTCCAGGAGTGCTCTG  
AGAGTGCCGGCAGCTCGGGCACCGCCTAG

SEC ID N° 21 (secuencia de aminoácidos de REEP1 murino) i)

MVSWIISRLVVLIFGTLYPAYYSYKAVKSVDIKEYVKWMMYWIFALFTTAETFT  
DIFLCWFPFYELKIAFVAWLSPYTKGSSLLYRKFVHPTLSSKEKEIDDCLVQAK  
DRSYDALVHFGKRGGLNVAATAAVMAASKGQGALSERLRSFSMQDLTTIRGDGA  
PAPSGPPPGTGRSSGKHSQPKMSRSASESAGSSGT.

**FIGURA 15 - Referencia**

**SEC ID N° 2 (secuencia de ácido nucleico de REEP2 murino)**

ATGGGTGCTCTGGATCATCTCTCGCCTGGTGGTGCTCATCTTGGCACCCCTGTA  
CCCAGCCTATTCTCCTACAAGGCCGTGAAGACCAAAAACGTGAAGGAATAC  
GTAAAATGGATGATGTATTGGATAGTCTCGCCTTCTTACACCACAGCTGAGAC  
ACTTACAGATATAAACTGCTGGTCCCCCTACTTTGAGCTCAAGATTG  
CCTTGATATGGCTGTTGTCCCCCTACACCCAAGGGCTCCAGTGTCCCTAC  
CGCAAGTCGTGCACCCAACACTGTCCAACAAGGAAAAGGAGATCGACGAA  
TACATCACACAAAGCTCGAGACAAGAGCTATGAGACGATGATGAGGGTGGC  
AAGAGGGGCTGAACCTGGCTGCCAATGCTGCAGTCACAGCTGCTGCCAAGG  
GCCAGGGGGTGTGCGAAAAGCTGCGGAGCTTCAGCATGCAGGACCTGAC  
TCTCATTGAGATGAGGATGCGTTACCGCTGCAGGGGCCAGATGGCCCTC  
CAACCCGGCCCCGTGGGTCTCCTGGACACTATTGAGGACTTAGGAGATGAGC  
CTGCCCTAAGTCTAAGGTCTAGCACAAGCCAGCAGATCCCCGGACAGAGAC  
CTCAGAAGATGACCTGGAGACAAGGCACCCAAAGAGGACCAAACCTATCAA  
AAAAGTACCCAGAGCTGAGCCGGCTTCCAAGACACTGAAGACCCGGCCC  
AAGAAGAAGAGITCTGGAGGGGGCAGTCAGCATGA

**SEC ID N° 22 (secuencia de aminoácidos de REEP2 murino)**

MVSWIISRLVVLIFGTLYPAYSSYKAVKTKNVKEYVKWMMYWIVFAFFTAETL  
TDIILSWFPPFYFELKIAFWIWLSPYTKGSSVLYRKFWHPTLSNKEKEIDEYTQAR  
DKSYETMMRVGKRLNLAAAATAAAKGQGVLSKLSFSMQDLTLRDEDA  
LPLQGPDRQLQPGPVGLLDTIEDLGDEALSLRSSTSQPDPRTESEDLGDKAPK  
RTKPIKKVPRAEPPASKTLKTRPKKKSSGGDSA

FIGURA 16- Referencia

SEC ID N° 3 (secuencia de ácido nucleico de REEP3 murino)

ATGGTGTCTGGATGATCTCCGAGCGTGGTGTGGTTGGAATGCTCTA  
TCCAGCGTACTATTCTACAAAGCCGTGAAGACGAAAAACGTCAAGGAATAC  
GTTCGCTGGATGATGTATTGGATCGTCTTGCCCTCTACACTGTCAATTGAAAC  
GGTGGCCGATCAGACACTTCATGGTTCCCTGTACTATGAGCTGAAGATTG  
CCTTCGTCAATTGGCTGCTGTCGCCCTACACTAGAGGGCGAGTTAACATAT  
AGAAAAGTCCCTCATCCCCGCTGTCAAAAGGAAGGGAAATTGATGATT  
ATATTGTCCAAGCAAAGAAAGAGGCTATGAGACAAATGGTGAATTGGACG  
GCAAGGTTGAATTAGCAGCTGCAGCCCGTCACTGCAGCAGTGAAGAGC  
CAAGGAGCAATAACGGAGCGTCTGCGAAGTTTACGCATGCATGATCTGACAG  
CTATCCAAGGGGATGAGCCCCTGGACACAGACCCCTACCAAGACTTGGCAGA  
AGCAAAGAGGAAGGCAAACAAGCCACCGAGTCACCAGCCTATGGAATTCC  
ACTGAAAGATGGAAGTGAAGCAGACAGACGAAGAAGCGGAGGGGCATTCTC  
CGATGACGAGATGGTACTCACAAAGGCGCTGAGGCATCCAGAGCATGAA  
ATCTGTCAAGACCATCAAAGGCCAAAGAGGTGCGGTATGGCTCACTAAAA  
TATAAAGTGAAGAAGAGACCGCAAGTGTATTAG

SEC ID N° 23 (secuencia de aminoácidos de REEP3 murino)

MVSWMISRAVVLVFGLYPAYYSYKAVTKNVKEYVRWMWYWIVFALYTIV  
TVADQTLAWFPLYYELKIAFVIWLSPYTRGASLIYRKFLHPLLSSKEREIDDYIV  
QAKERYETMVNFGRQGLNAAAAAVTAAVKSQGAITERLRSFSMHDLTAIQC  
DEPVGHRPYQTLPEAKRKQKQATESPAYGIPLKDGEQTDEEAEGPFSDDDEMVT  
HKALRRSQSMKSVKTIKGRKEVRYGSLKYKVKKRPQVYF

**FIGURA 17- Referencia**

SEC ID N° 4 (secuencia de ácido nucleico de REEP4 murino)

ATGGTGTCTGGATGATCTGTCGCCTGGTAGTGCTCATATTGGCATGCTGTA  
TCCTGCGTATGCTTCCCTACAAGGCCGTGAAGAGCAAGAACATTGAGAAATAT  
GTACGGTGGATGATGTATTGGATTGTCTTGCGATCTCATGGCAGCAGAAAC  
CTTCACAGACATCTCATTCCCTGGTCCCCTTATTACGAGTTCAAGATGGC  
TTTGTGCTGTGGCTGCTCACCTTACACCAAGGGGCCAGCCTGCTTACC  
GAAAGTTGTCCACCCATCCCTATCCGCCATGAGAAGGAGATCGACCGCGTG  
TATCGTGCAGGCAGGAGCGCAGCTATGAAACCATTGCTCAGTTGGAG  
CGGAGCCTCAACATCGCTGCCTCAGCTGCTGCAGGCTGCTACCAAGAGTC  
AAGGCCTCTAGCTGGAAGGCTGCCGAGTTCTCTATGCAAGACCTGCCCTC  
TATCCCTGACACCCCTGTCCCCACCTACCAAGATCCCTCTACCTGGAAGACC  
AGGTACCCCGACGTAGACCCCTATTGGATACCGGCCAGGCCCTGCAGGG  
CACTGACACAGAGGATGAGTGTGGTCAGACAATGAGATCGTCCCCAGCCA  
CCTGTTGGCCCCAGAGAGAACGCTCTAGGCCAGCCAGGCCCTCGGGTGG  
TCAAGAGGAAGCCATTGACTCGAGAGGGCACCTCACGCTCCCTGAAGGTCCG  
AACCCGGAAAAAGGCCATGCCCTCAGACATGGACAGCTAG

SEC ID N° 24 (secuencia de aminoácidos de REEP4 murino)

MVSWMICRLVVLIFGMLYPAYASYKAVKSKNIREYVRWMMYWIVFAIFMAAET  
FTDIFISWFPFYEFKMAFVLWLSPYTKGASLLYRKFVHPSLSRHEKEIDACIVQ  
AKERSYETMLSFGKRSLNIAASAATQAATKSQGALAGRRLRSFSMQDLRSIPDTPV  
PTYQDPLYLEDQVPRRRPIGYRPGLQGSDEDECWSDNEIVPQPPVRPREKPL  
GRSQSLRVVKRKPLTREGTSRSLKVRTRKKAMPSDMDS

**FIGURA 18- Referencia**

SEC ID N° 5 (secuencia de ácido nucleico de REEP5 murino)

ATGTCCGCAGCCATGAGGGAGAGGTTCGACCGGTTCTGCACGAGAAGAACT  
GCATGACTGATCTCCTCGCCAAGCTCGAGGCCAAGACCGGAGTGAACCGGAG  
CTTCATCGCGCTCGGTGTCATCGGACTGGTGGCTTGTATCTGGTGTGGTT  
ATGGAGCCTCTCCTCTGCAACCTGATAGGTTCGGATACCCAGCCTACATC  
TCAATGAAAGCCATCGAGAGTCCCACAAAGATGATGACACCCAGTGGCTGA  
CGTACTGGGTGGTATATGGTGTGTTCAAGCATTGCCGAATTCTCTCCGATCTC  
TTCTCTGTCTGGTCCCCCTCTACTACATGCTGAAGTGTGGCTCTGCTGTGG  
TGCATGGCCCCCAGCCCGCTAATGGGCTGAGATGCGCTACAGGCGAACATCA  
TCCGT CCTATCTCCTCAAGCACGAGTCCCAGGTAGACAGTGTGGTGAAGGA  
CGTGAAGGACAAAGCCAAAGAGACTGCAGATGCCATCAGCAAAGAAGTCAA  
GAAAGCTACAGTGAACITGCTGGCGATGAGAAGAAAGACACCTGA

SEC ID N° 25 (secuencia de aminoácidos de REEP5 murino)

MRERFDRFLHEKNCMTDLLAKLEAKTGVRNSFIALGVIGLVALYLVFGYGASLL  
CNLIGFGYPAYISMKAIESPNKDDDTQWLTYWVYGVFSIAEFFSDLFLSWLPFY  
YMLKCGFLLWCMAPSPANGAEMLYRRIIRPIFLRHESVDSVVKDKAKETA  
DAISKEYKKATVNLLGDVKKST.

FIGURA 19 . Referencia

SEC ID N°: 6 (secuencia de ácido nucleico de REEP6 murino)

ATGGACGGTCTCGGCCAGCGCTTCGAACGTTTCTGGAACAGAAGAACGTGG  
CCACCGAAGCGCTCGGGGCGCTCGAAGCAAGGACCGGTGTAGAGAAAGCGGT  
ATCTCGCCGCGGGAGCCCTCGCCCTCTAGGCCCTGTATCTCTGTCGGTTAC  
GGGGCCTCTACTGTGCAATGTCATCGGATTGTATAACCCGCATATGCTTC  
AGTCAAAGCTATCGAGAGCCCAAGCAAGGAAGACGACACTGTGTGGCTAAC  
CTACTGGGTGGGTGTACGCCCTGTCGGCTGGTCGAATTCTCAGCGATCTAC  
TCCGTCTGGTCCCTTCTACTACGCCGGCAAGTGCCTCCTGTTATT  
GCATGACGCCGGACCCTGGAACGGGGCATTA  
ACTACTATACCATCGCGTCAT  
AAGACCACTCTTCTAAAGCACCATGGCTCTAGACAGCGCCGCGAGCCAG  
CTAAGCGGAAGAGCATTGGACCTAGCAGCTGGATAACCCGGGACGTACTTC  
AGGCCCTGGCTCGGGGCGGCTCTCGTCACCCAGCATCAACATCGGAACC  
CCCAGCCGCTCTGGAACCTGGACCCCAAGTAA

SEC ID N° 26 (secuencia de aminoácidos de REEP6 murino)

MDGLRQRFERFLEQKNVATEALGALEARTGVVKRYLAAGALALLGLYLLFGYG  
ASLLCNVIGFVYPAYASVKAIESPNSKEDDTVWLTYWVYALFGLVEFFSDLLLFW  
WPFYYAGKCAFLLFCMTPGPWN  
GALLYHHRVIRPLFLKHHMALDSAASQLSG  
RALDLAAGITRDVLQALAR  
GRALVTPASTSEPPAALELDPK

FIGURA 20- Referencia

SEC D N° 7 (secuencia de ácido nucleico de REEP1 humano)  
ATGGTGTCACTGGATCATCTCAGGCTGGTGGTCITATATTGGCACCCTTA  
CCCTGCGTATTATTCTACAAGGCAGTGAATCAAAGGACATTAAGGAATAT  
GTCAAATGGATGATGTACTGGATTATATTGCACTTTACCCACAGCAGAGAC  
ATTCACAGACATCTCCTTGTGGTTCCATTCTATTATGAACAAAAATAG  
CATTTGTAGCCTGGCTGCTGTCCCTACACAAAAGGCTCCAGCCTCTGTAC  
AGGAAGTTGTACATCCCACACTATCTCAAAAGAAAAGGAAATCGATGATT  
GTCTGGTCCAAGCAAAAGACCGAAGTACGATGCCCTGTGCACCTCGGGAA  
GCGGGGCTTGAACGTGGCGCCACAGCGGTGTGATGGCTGCTCCAAGGGA  
CAGGGTGCCTTATCGGAGAGACTCGGGAGCTCAGCATGCAGGACCTCACCA  
CCATCAGGGAGACGGCGCCCTGCTCCCTGGGCCCCCACCACCGGGGTC  
TGGGCGGGCCAGCGCAAACACGGCCAGCCTAAGATGTCCAGGAGTGCTTCT  
GAGAGCGCTAGCAGCTCAGGCACCGCCTAG

SEC ID N° 27 (secuencia de aminoácidos de REEP1 humano)  
MVSWIISRLVVLIFGTLYPAYSYKAVKSVDIKEYVKWMMYWIIIFALFTIAETFT  
DIFLCWFYFYYELKIAFVAWLSPYTKGSSLLYRKFVHPTLSSKEKEIDDCLVQAK  
DRSYDALVHFGKRLNVAATAAVMAASKGQQGALSERLRSFSMQDLTTIRGDGA  
PAPSGPPPGSGRASGKHGQPKMSRSASESASSSGTA

FIGURA 21- Referencia

SEC ID N° 8 (secuencia de ácido nucleico de REEP2 humano)

ATGGTGTCTGGATCATCTCTCGCCTGGTGGTGCATCTTGGCACCCGTAA  
CCCAGCCTATTCTTCCCTACAAGGCCGTGAAGACAAAAAACGTGAAGGAATAT  
GTGAAATGGATGATGTAATGGATCGTCTTGCCCTCTCACCAACGGCCGAGAC  
GCTCACGGATATACTGCTCTGGTCCCTACTTGAACGTGAAGATCG  
CCTTCGTGATATGGCTGCTGTCCCCCTACACCAAGGGCTCCAGCGTGCTCTAC  
CGCAAGTTCTGCACCCAACGCTGTCCAACAAGGAGAAGGAGATCGACGAG  
TACATCACCGCAGGCCGAGACAAGAGCTATGAGACCATGATGAGGGTGGC  
AAGAGGGGCCTGAACCTTGCCGCCAATGCTGCAGTCACAGCTGCCGCAAGG  
GGGTGCTGTCAGAGAAGCTCCGCAGCTCAGCATGCAAGGACCTGACCTGAT  
CCGGGACGAGGACGCAGTCCCCCTGCAGAGGCCTGACGGCCCTCCGACCC  
AGCCCTGGCAGCCTCTGGACACCATCGAGGACTTAGGAGATGACCTGCC  
TGAGTCTAAGGTCCAGCACAAACCCGGCAGATTCCCGACAGAGGCTCTGA  
GGATGACATGGGAGACAAAGCTCCCAAGAGGGCAAACCCATCAAAAAGC  
GCCCAAAGCTGAGCCACTGGCTCCAAGACACTGAAGACCCGGCCAAGAA  
GAAGACCTCTGGCGGGGGCGACTCAGCTGA

SEC ID N° 28 (secuencia de aminoácidos de REEP2 humano)

MVSWIISRLVVLIFGTLYPAYSSYKAVTKNVKEYVKWMWYIVFAFFTAETL  
TDIVLSWFPPFYFELKIAFVIWLSPYTKGSSVLYRKFVHPTLSNKEKEIDBYITQAR  
DKSYETMMRVGKRLNLAAAATAAAKGVILSEKLRFSMQLTLIRDEDALP  
LQRPDGRLRSPGSLLDTIEDLGDDPALSRSSTNPADSRTTEASEDDMGDKAPKR  
AKPIKKAPKAEPPLASKTLKTRPKKKTSGGDSA

FIGURA 22- Referencia

SEC ID N° 9 (secuencia de ácido nucleico de REEP3 humano)

ATGGTGTCTGGATGATCTCCAGAGCCGTGGCTGGTGTGGAAATGCTTTA  
TCCTGCATATTATTACATAACAAAGCTGTGAAAAACAAAAACGTGAAGGAATAT  
GTTCGATGGATGATGTACTGGATTGTTTGCTCTCTATACTGTGATTGAAAC  
AGTAGCCGATCAAACAGTTGCTGGTTCCCTGTACTATGAGCTGAAGATTG  
CTTTGTCATATGGCTGCTTCTCCCTATACCAAAAGGAGCAAGTTAAATATAT  
AGAAAATTCCCTCATCCACTCTTCTCAAAGGAAAGGGAGATTGATGATTAA  
TATTGTACAAGCAAAGGAACGAGGCTATGAAACCATGGTAAACTTGGACGG  
CAAGGTTAAACCTGCAGCTACTGCTGCTTACTGCAGCAGTAAAGGTAAAT  
TGTTCAATTACCTTTAA

SEC ID N° 29 (secuencia de aminoácidos de REEP3 humano)

MVSWMISRAVVLVFGMLYPAYYSYKAVTKNVKEYVRWMMYWIVFALYTIE  
TVADQTVAWFPLYELKIAFVIWLSPYTKGASLIYRKFLHPLLSSKEREIDDYIV  
QAKERGYETMVNFGRQGLNLAATAAVTAAVKVIVHLPF

FIGURA 23- Referencia

SEC ID N° 10 (secuencia de ácido nucleico de REEP4 humano)

ATGGTGTCTGGATGATCTGTCGCTGGTGGTCTGGTTGGATGCTGTG  
TCCAGCTTATGCTTCTATAAGGCTGTGAAGACCAAGAACATTGTGAATATG  
TGCCTGGATGATGTAATGGATTGTTTGACTCTCATGGCAGCAGAGATC  
GTTACAGACATTCTATCTCTGGTCCCCTACTATGAGATCAAGATGGC  
CTTCGTGCTGTGGCTGCTCTCACCCACCAAGGGGCCAGCTGCTTAC  
GCAAGTTGTCACCCGCTCCCTGCCCCATGAGAAGGAGATGACGCC  
CATCGTGCAGGCCAAGGAGCGCAGCTACGAGACCCTGCTCAGCTTGG  
CGGGGCCTCAACATTGCCCTCCGCTGCTGTGCAGGCTGCCACCAAGAGTC  
AGGGGGCGCTGGCCGGCAGGCTGCCAGGACCTGCGCT  
CATCTCTGACGCACCTGCCCTGCCTACCATGACCCCTCTACCTGGAGGACC  
AGGTGCCCCACCGGAGGCCACCCATTGGTACCGGGCCGGGGCTGCAGGA  
CAGCGACACCGAGGATGAGTGTGGTCAGATACTGAGGCAGTCCCCGGCG  
CCAGCCCCGGCCCCGAGAGAAGCCCCCTAATCCGCAGCCAGGCC  
TCAAGAGGAAGCCACCGGTGCGGGAGGGCACCTCGCCTGCC  
GACGAGGAAAAAGACTGTGCCCTGAGACGTGGACAGCTAG

SEC ID N° 30 (secuencia de aminoácidos de REEP4 humano)

MVSWMICRLVVLVFGMLCPAYASYKAVTKNIREYVRWMMYWIVPALFMAA  
EIVTDIFISWFPFYYEIKMAFVLWLSPYTKGASLLYRKFVHPSLSRHEKEIDAYIV  
QAKERSYETVLSFGKRLGLNIAASAAVQAATKSQGALAGRRLRSFSMQDLRSISDA  
PAPAYHDPLYLEDQVSHRRPPIGYRAGGLQDSDTEDECWSDTEAVPAPARPRE  
KPLIRSQLRVVKRKPVREGTSRSLKVRTRKKTVPSDVDS

FIGURA 24 - Referencia

SEC ID N° 11 (secuencia de ácido nucleico de REEP5 humano)

ATGTCTGCGGCCATGAGGGAGAGGTTGCACCGGTTCTGCACGAGAAGAACT  
GCATGACTGACCTCTGGCCAAGCTCGAGGCCAAAACCGGCGTGAACAGGAG  
CTTCATCGCTCTGGTGTACGGACTGGTGGCCTTGACCTGGTGGTCACTGGT  
ATGGAGCCTCTCCTCTGCAACCTGATAGGATTGGCTACCCAGCCTACATC  
TCAATTAAAGCTATAGAGAGTCCCAACAAAGAAGATGATAACCCAGTGGCTGA  
CCTACTGGGTAGTGTATGGTGTGTCAAGCATTGCTGAATTCTCTGATATCT  
TCCGTGTATGGTCCCCTCTACTACATGCTGAAGTGTGGCTCCTGTTGTGGT  
GCATGGCCCGAGCCCTCTAATGGGCTGAACGTGCTCTACAAGCGCATCAT  
CCGTCTTCTCTGAAGCACGAGTCCCAGATGGACAGTGTGGTCAAGGAC  
CTTAAAGACAAGGCCAAAGAGACTGCAGATGCCATCACTAAAGAACGGAAG  
AAAGCTACCGTGAATTACTGGTGAAGAAAAGAACGACCTAA

SEC ID N° 31 (secuencia de aminoácidos de REEP5 humano)

MSAAMRERFDRFLHEKNCMTDLLAKLEAKTGVNRSFIALGVIGLVALYLVFGY  
GASLLCNLIGFGYPAYISIKAIESPNKEEDDTQWLTYWVYGVFSIAEFFSDIFLSW  
FPFYMLKGFLWCMAPSPSNGAELLYKRIIRPFFLKHSQMDSVVKDLKDKA  
KETADAITKEAKKATVNLLGEEKKST.

FIGURA 25- Referencia

SEC ID N° 12 (secuencia de ácido nucleico de REEP6 humano)

ATGGACGGCCTGAGGCAGCGCGTGGAGCACITCCTGGAGCAAAGGAACCTG  
GTCACCGAAGTGCTGGGGCGCTGGAGGCCAAGACCCGGGTGGAGAACGCG  
TATCTGGCTGCAGGAGCCGTCACTCTGCTAAGCCTGTATCTGCTGTCGGCTA  
CGGAGCGTCTCTGCTGTGCAATCTCATCGGATTGTGTACCCCGCATATGCCT  
CAATCAAAGCTATCGAGAGCCAAGCAAGGACGACACTGTGTGGCTCAC  
CTACTGGGTGGTGTACGCCCTGTTGGGCTGGCCGAGTTCTTCAGCGATCTAC  
TCCTGTCTGGTCCCTTCTACTACGTGGCAAGTGCCTCCTGTTGTCT  
GCATGGCTCCCAGGCCCTGGAACGGGGCTCTCATGCTGTATCAGCGCGTGT  
GCGTCCGCTGTTCTAAGGCACCACGGGGCGTAGACAGAAATCATGAACGAC  
CTCAGCGGGCGAGCCCTGGACGCGCGGCCGAATAACCAGGAACGTCAAG  
CCAAGCCAGACCCCGCAGCGAAGGACAAGTGA

SEC ID N° 32 (secuencia de aminoácidos de REEP6 humano)

MDGLRQRVEHFLERQNLVTEVLGALEAKTGVEKRYLAAGAVIILSLYLLFGYG  
ASLLCNLIGFVYPAYASIKAIESPSSKDDDTVWLTYWVYALFGLAEFFSDLLSW  
FPFYVGKCAFLLFCMAPRPWNGLMLYQRVVRPLFLRHGAVDRIMNDLSGR  
ALDAAGITRNVKPSQTPQPKDK

FIGURA 26

SEC ID N° 13 (ácido nucleico de RTP1 murino)

ATGAGGATTTTAGACCGTGGAGACTGCGCTGCCCTGCCTTACACTTACCCCTC  
TTCCCCCACGTTCTATAAAGTGTAGTTGCCTCCTCTTCCACTGACGAAG  
ACATGTGTAAGAGTGTGACCACAGGTGAGTGGAAAGAAGGTCTTACGAGAA  
GATGGAGGAGGTGAAGCCAGCGGACAGCTGGACTTCATCATAGACCCAA  
CCTCAAGCACAATGTGTTGGCCCCTGGCTGGAAAGCAGTACCTGGAACCTCAT  
GCCTCAGGAGGTTCCACTGTCCTGGTGTGGCACACCTGGCAGTCACCCCA  
TGTAGTCATCCTCTTCCACATGTACCTGGACAAGGCTCAGCGCCTGGTTGG  
TGCATGCGTGTGTTCAAGCAGCTTGCTACGAGTGGTACAGCACGGCT  
GGATGAGTCCAGCATGCTGGAGGAGAACATCGAAAGCCTGGTGGACAACCTC  
ATCACCAAGTTGCGAGAGCAGTGCTACGGGAGCGTGGTGGCACTACCGCA  
TCCATGTGCCAGCCGGCAGGACAACCGGCGACACCGCGGAGAGTTCTGCGA  
GGCCTGCCAGGAAGGCATCGTGCAGTGGAAAGCCCAGTGAGAACGCTGCTGGA  
GGAGGAGGCGACCACCTACACCTCTCCGTGCTCCAGCCCCACCAAACCG  
CAGGCTGAAACAGGCTCAGGCTGCAACTCTGCTCCATTCCCTGGTGTATT  
TTGGGCCACGGTTTGATGCTCATCATACCTGCAATTCTCCTCCGTACTTC  
TGTCTAA

SEC ID N° 33 (secuencia de aminoácidos de RTP1 murino)

MRIFRPWRLRCPALHLPSFPTFSIKCSLPLPTDEDMCKSVTTGEWKKVFYEKME  
EVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPHVVI  
LFHMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLITSR  
EQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQEGIVHWKPSEKLLEEEATTYT  
FSRAPSPTKPQAETGSGCNFCISIPWCLFWATVMLIYLQFSRTSV

FIGURA 27

SEC ID N° 14 (secuencia de ácido nucleico de RTP2 murino)

ATGTCCACCAGCCTGACCACTTGTGAGTGGAAAGAAGGTCTTCTACGAGAAGA  
TGGAGGTGCCAACGCCAGCGGACAGCTGGAGCTCATCATAGACCCCACCC  
CAAGCCCATTGAGCTGGGCCCTGGCTGGAAGCAGTACCTGGAGCAACATGCC  
TCAGGCAGGTTCCACTGTTCTGGTGTGGCACACATGGCAATCTGCCAATGT  
CGTCATTCTCTTCCACATGCACCTGGACCGTGCCAGCGTGTGGCTCAGTGC  
GCATGCGCGTGTCAAGCAGCTGTGCTATCAGTGCAGCAGTCGCGGCTGGA  
CGAGTCCAGCATGCTGGAGGAGAATATCGAGGGCCTGGTGGACAACCTCATC  
ACCAGTCTGCGCGAGCAGTGTACGATGAGGATGGTGGCCAGTACCGCATTCC  
ACGTAGCCAGCCGGCCAGACAGCGGATTGCACCGCAGTGAAGTTCTGCGAGGC  
CTGCCAGGAAGGCATCGTCACTGGAAGGCCAGCGAAAAGCTGCTGGAGGA  
GGATGCCGCCTATACCGATGCCCTCAAGAAGAAGGGCAGGCTGGTTTATC  
TCCAGCTTCTCTCATTCGTTGGCCTGTTCTGGGGCACCTCTGCCCTGGTC  
ATTGTCTACCTGCAGTTCTCCGAGGCCGCTCTGGCTTCTTTAG

SEC ID N° 34 (secuencia de aminoácidos de RTP2 murino)

MSTSLTTCEWKKVYEKMEVAKPADSWELIIDPTLKPNELGPGWKQYLEQHASG  
RFHCSWCWHTWQSANVILFHMHLDRAQRVGSVRMRVFQLCYQCGTSRLDE  
SSMLEENIEGLVDNLITSREQCYDEDGGQYRIHVASRPDSGLHRSEFCEACQEGLI  
VHWKPSEKLLLEDAAYTDASKKGQAGFISSFSFRWCLFWGTLCLVIVYLQFF  
RGRSGFL

FIGURA 28- Referencia

SEC ID N° 15 (secuencia de ácido nucleico de RTP3 murino)

ATGATGGAAGAAGACATAGGAGACACAGAGCAATGGCGACATGTGTTCCAG  
GAGCTAATGCAAGAGGTGAAACCCCTGGCACAAATGGACCCCTCATACCAAGAC  
AAGAACCTCTTCCAACGTTTGAAAGCCAGGATGGACGCAATACCAAGCAAA  
AGACCTTGCTAGGTTCCACTGCTTCTGCTCGAAGTTGGGCATCTGGC  
CGAGTTCTGATAGTCTTCCACATCGGGTGGTGTGAGAAGAAGGCCAAGGGT  
GGGTGAAGATGAGGGTGTGCTCAGAGATGTAATCAGTCCCCGAGCCTCC  
ATTGCAACTCCAGAAGTCATTGGACAACATCTAAGGATCTGAACAAC  
CTGCTCTTCAAATTCTGAAGAAGTGTATAAAAGAAGGATTTAAGCAAATGG  
GTGAGATTCTTGTAGGGAACACCAGTCTGAAGGGCCACATGACAGCAG  
CAACTGTGAGGCCGTCTCCTGGCTTGTGCTCAGAATGACTTAGGCCAAG  
CCTCAAAACCACCAGCACCCCCATTATCTCCTACCTCCTCAAAGTCAGCCAGG  
GAGCCCAGGTCACTGCCACCTGTAGCAACATTCTCCTCACAGCCCTCCTC  
TAAAGTACAGATGCCCAAGCATCAAAGCGAACCCCCAAGCCAGTAACCC  
ACCAAAAATGACCCCAAAGTTAGCTGCACCTCAAAACCACCGCACCCCCAT  
TATCTCCTACCTCTTAAAGTCAGCCAGGGAGCCTAAGGTCACTGTACCTGT  
AGCAACATTCTCCTCGCGGTCTCTCTAAAGTACAGATGCCCAAGCATC  
AAAAGTGAACCCCCAAACCAAGTAATCTACCAAAATGACCCAAAGATTAGC  
TGTACCTCAAAACCACATCAACTACTCCAAGACTGACAATAACAGCTGTCA  
TAGTAAGCCCACCTGCCCCCTGCCCCATGTGTCAATTCAAATGCCCTCTCC  
ACTCCCACATCGACGGCAGCAGAGCAGCAGATGTAGCAGAAGGAGAACAC  
TCCAAGACCCCAAAGGCATTGCTCTCATCCCCCTTATACGTCCCACCCACTTC  
CTCCTATGTCCCACCCACTTCTCTATGTCCCACCCACTTCTCTATGTCCC  
GCCCACTTCTCTTATGTCCCACCCACTTCTCTCAGTTATTGTGCCCTTTC  
CTCCTCGTGGAGACTACCAAGAAAACACTATTGCCAAGTAGAGAGAAAACAGT  
CATATCCACCCGCAAAGCCAGTCTCCTGCTGTGGGGCTGCTGCGAGTCCTG  
GTGTGAGATCTTCAGGTACTCATGCTGTGAGGCCGCTGTAATTGATGTCAC  
AGAGTCCACTGTGTTGCTTGGCTTCTAATCTGTTATTGCTGTGGTATT  
TATTATAA

SEC ID N° 35 (secuencia de aminoácidos de RTP3 murino)

MMEEDIGDTBQWRHVFQELMQEVKPWHKWTLPDKNLLPNVLKPGWTQYQQK  
TFARFHCPCSRWSASGRVLIVFHMWRCEKKAKGWVKMRVFAQRNCNPBPFF  
ATPEVTWDNISRLNNLLFQILKKCYKEGFQMGEIPLLNTSLEPHDSSNCEAC  
LLGFCAQNNDLGQASKPPAPPLSPTSSKSAREPKVTVTCSNISSRPSSKVQMPQAS  
KVNPQASNPTKNDPKVSCTSKPPAPPLSPTSLKSAREPKVTVTCSNISSRPSSKV  
QMPQASKV

FIGURA 29- Referencia

SEC ID N° 16 (secuencia de ácido nucleico de RTP4 murino)

ATGCTGTTCCCCGATGACTTCAGTACTGGGAGCAGACATTCAAGAACTGAT  
GCAGGAGGAGAAGCCCGGGCCAAGTGGAGCCTGCATTGGATAAGAACAT  
TGTACCAAGATGGTGCAGCCCTGGGATGGAGGCAGCACCGAGACAGTGCTT  
GGCAGGTTCCAGTGTCCAGATGCTGCAGAAAGTTGGACCTCTGCTCAGGTGA  
TGATCTTGTGCCACATGTACCCGGACACTTGAAATCGCAGGGCCAGGCACG  
CATGAGGATCTTGGTCAGAAGTGCCAGAAGTGTGTTGGATGTCAATTGAG  
ACTCCCAAGTTCTCCACAGAGATCATCAAAAGAATTCTGAATAACCTAGTTA  
ATTATATTCTGCAGAGATACTATGGACACAGGAAGATAGCATTGACCTCGAA  
TGCATCTTGGGTGAGAAGGTGACTTTGGATGGCCCCACGACACACGCAAT  
TGTGAGGCATGCAGTCTAAACTCTCATGGAAGATGTGCCCTTGACACAAAG  
TAAAACCACCCAGATCTCCATCTCATTACCAAATAGTTCTCCCCATCAAAG  
AGCTGCCCTCCTCCGCTCAGACCCGAATACGGATTTGGGAATAAAACTC  
TTCAGGATTTGGGAATAGAACCTTCAGGGATGCAAGAGGCCAAAAACG  
TGAAATAGAGCCACCACTATTCTGTTTGTCTATTGCTGCATTGCCCTTT  
TAGTCTTCACTAGATAA

SEC ID N° 36 (secuencia de aminoácidos de RTP4 murino)

MLFPDDFSTWEQTFQELMQEEKPGAKWSLHLDKNIVPDGAALGWRQHQQTVG  
RFQCSRCCRSWTSQAQVMILCHMYPDTLKSQGQARMRIFGQKQKCFGCQFETPK  
FSTEIIKRILNNLVNYILQRYYGHRKIALTSNASLGEKVLDGPHDTRNCBACSLN  
SHGRCALAHVKPPRSPSPLPNSSPSKSCPPPPQTRNTDFGNKTLQDFGNRTFQG  
CREPPQREIEPPLFLFLSIAAFALFSLFTR.

FIGURA 30

SEC ID N° 17 (secuencia de ácido nucleico de RPT1-A1 humano)

ATGTGTAAAAGCGTGACCACAGATGAGTGGAAAGAAAGTCTTCTATGAGAAGAT  
GGAGGAGGCAAAGOCGGCTGACAGCTGGGACCTCATCATAGACCCCAACCTC  
AAGCACAAATGTGCTGAGCCTGGTTGGAAGCAGTACCTGGAATTGCATGCTT  
CAGGCAGGGTCCACTGCTCCTGGTCTGGCACACCTGGCAGTCGCCCTACGT  
GGTCATCCTCTTCCACATGTTCTGGACCGCGCCCAGCGGGCGGCTCGGTGC  
GCATGCGCGTCTCAAGCAGCTGTGCTATGAGTGGGGCACGGCGCGGCTGGA  
CGAGTCCAGCATGCTGGAGGGAGAACATCGAGGGCCTGGTGGACAACCTCATC  
ACCAGCCTGCGCGAGCAGTGTACGGCGAGCGTGGCGGCCAGTACCGCATCC  
ACGTGGCCAGCCGCCAGGACAACCGGGCGCACCGCGGAGAGTTCTGCGAGG  
CCTGCCAGGAGGGCATCGTGCACTGGAAGCCCCAGCGAGAACGCTGCTGGAGG  
AGGAGGGGAGCACCTACACCTCTCCCGGGCGCCAGCCCCACCAAGTCGCA  
GGACCAAGACGGGCTCAGGCTGGAACCTCTGCTCTATCCCCCTGGTGTGTTT  
GGGCCACGGTCTGCTGCTGATCATCTACCTGCAGTCTCTCTCCGTAGCTCC  
GTATAA

SEC ID N° 37 (secuencia de aminoácidos de RPT1-A1 humano)

MCKSVTTDEWKKVFYEKMEEAKPADSWDLIIDPNLKHNVLSPGWKQYLELHAS  
GRFHCSWCWHTWQSPYVVILFHM  
FLDRAQRAGSVRMRVFKQLCYBCGTARLDESSMLEENIEGLVDNLITSLREQCY  
GERGGQYRIHVASRQDNRRHRG  
EFCEACQEGLVHWKPSEKLLEEEATTYTFSRAPSPTKSQDQTGSWNFCIPWCL  
FWATVLLLIYLQFSFRSSV

FIGURA 31

SEC ID N° 18 (secuencia de ácido nucleico de RTP2 humano)

ATGTGTACCAAGCTTGACCACCTGTGAGTGGAAAGAAAGTCTTCTATGAGAAGA  
TGGAGGTGGCAAAGCCAGCGGACAGCTGGAGCTCATCATAGACCCCCAACCT  
CAAGCCCAGTGAGCTGGCCCTGGCTGGAAGCAGTACCTGGAGCAGCACGCC  
TCAGGCAGGTTCCACTGCTCCTGGTGTGGCACACCTGGCAGTCTGCCATGT  
GGTCATCCTCTTCCACATGTTCTGGACCGCGCCAGCGGGCGGCTCGGTGC  
GCATGCGCGTCTTCAAGCAGCTGTGCTATGAGTGGCGACGGCGCGGCTGGA  
CGAGTCCAGCATGCTGGAGGAGAACATCGAGGGCCTGGTGGACAACCTCATC  
ACCAGCCTGCGCGAGCAGTCTACGAGGAGGATGGTGGCCAGTACCGCATCC  
ACGTGGCCAGCCGCCGGACAGCGGGCCGCATGTGCAGAGTTCTGTGAGGC  
CTGCCAGGAGGGCATGTTCACTGGAAGCCCAGCGAGAAGCTGCTGGAGGA  
GGAGGTGACCACCTACACCTCTGAAGCCTCCAAGCCGAGGGCCAGGCAGGG  
ATCCGGCTACAACCTCTTGTCTCTCGCTGGTGCCTCTCTGGGCTCTCTG  
CCTGCTCGTTTTACCTGCAGTTCTCCTCAGTCCTGCCCTTTAG

SEC\_D N° 38 (secuencia de aminoácidos de RTP2 humano)

MCTSLLCEWKKVFYEKMEVAKPADSWELIIDPNLKPSLAPGWKQYLEQHAS  
GRFHCSWCWHTWQSAHVVILFHMFLDRAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLD  
ESSMLEENIEGLVDNLITSLREQCYEEDGGQYRIHVASRPDSGPRAEFCEACQE  
GIVHWKPSEKLLEEVTTYTSEASKPRAQAGSGYNFLSLRWCLFWASLCLLVVY  
LQFSFLSPAFF

FIGURA 32- Referencia

SEC ID N° 19 (secuencia de ácido nucleico de RTP3 humano)

ATGGCTGGGGACACAGAACAGTGTGGAAGCAAATGTTCAAGGAGTTAATGCGGG  
AGGTGAAGCCATGGCACAGGTGGACCCCTGAGACCAGACAAGGGCCTCTTCC  
CAACGTCTGAAGCCAGGGCTGGATGCAATACCAAGCAGTGGACCTTCGCCAGG  
TTCCAGTGCTCCTCTGCTCTCGTAACCTGGGCCTCTGCCAAGTTCTGGTCCT  
TTCCACATGAACTGGAGTGAGGAGAAGTCCAGGGCCAGGTGAAGATGAGG  
GTGTTACCCAGAGATGTAAGAACAGTCCCCAACCTCTGTTGAGGACCCCTG  
AGTTCACACAAGAGAACATCTCAAGGATCTGAAAAACCTGGTGTCCGAAT  
TCTGAAGAAATGCTATAAGAGGAAGATTCAAGTTGATAGAGGAGGTCTATG  
ATCAAGGACATCTCTTGAAGGGCCACACAATAGTGACAACGTGAGGCAT  
GTCTGCAGGGCTCTGTGCTGGGCCATACAGGTTACAAGCCTCCCCCATCT  
CAGACCCCAAGAGTACACTCCATTACAAGGTGGAGGAGGTAGTTAACCCCT  
GGGCCTCAGGAGAGAATGTCTATTCCATCGCATGCCAAAACCACATCTGTAG  
GAACCTAAGCATTCTGCTGTTGTCAATTCTATTGTTATCGTGGTGATTGT  
TGTAAAAACTGCTATATGA

SEC ID N° 39 (secuencia de aminoácidos de RTP3 humano)

MAGDTEVWKQMFQELMREVKPWHRWTLRPDKGLLPNVLKPGWMQYQQWTF  
ARFQCSSCSRNWASAQVLVLFHMNWSEEKSRGQVKMRVFTQRCKKCPQPLFED  
PEFTQENISRLKNLVFRILKKCYRGRFQLIEEVPMIKDISLEGPHNSDNCEACLQG  
FCAGPIQVTSLPPSQTPRVHSIYKVVEVVKPWASGENVSYACQNHICRNLSIFCC  
CVILIVVVIVVKTAI

FIGURA 33 - Referencia

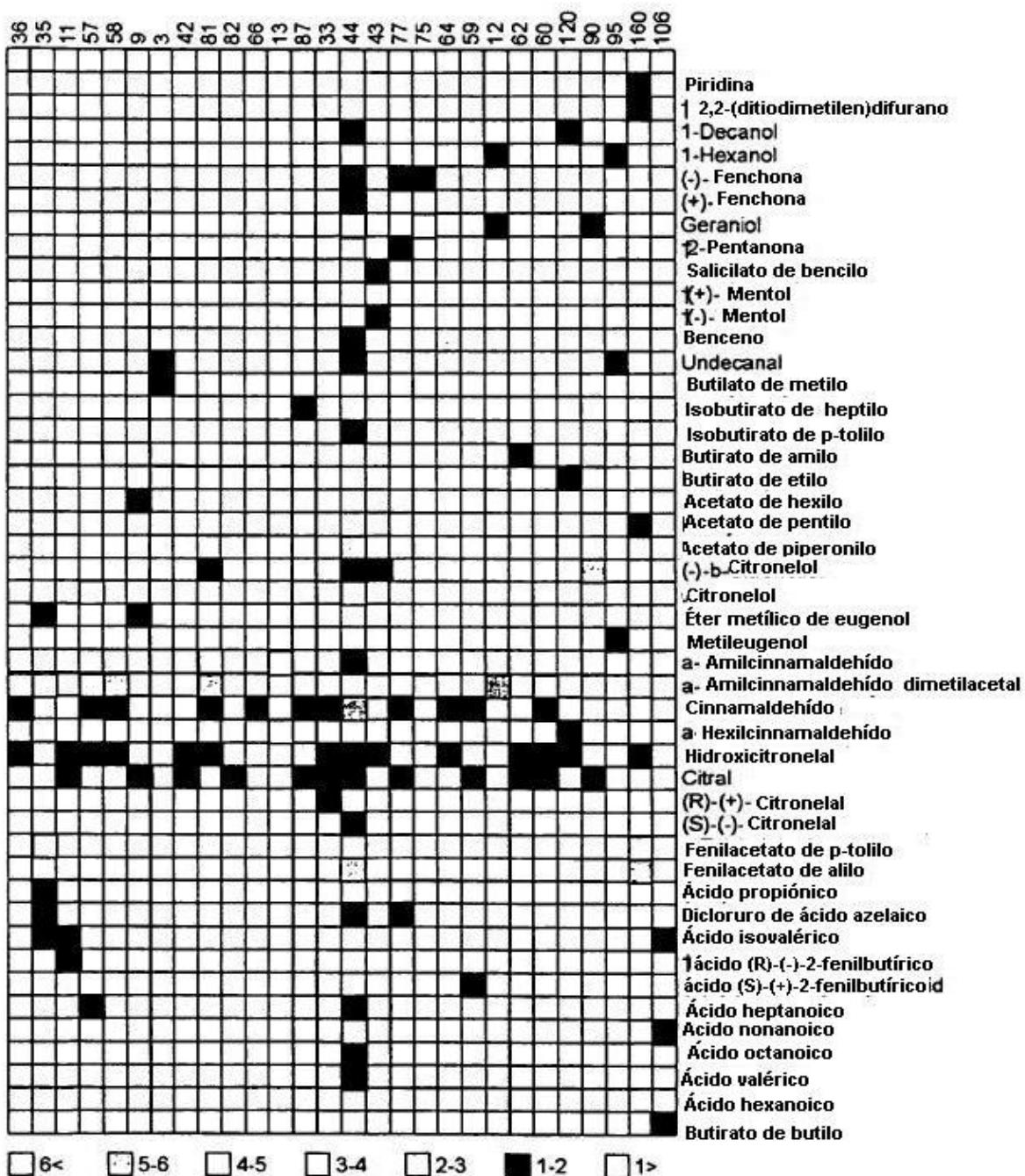
SEC ID N° 20 (secuencia de ácido nucleico de RTP4 humano)

ATGGTTGTAGATTCTGGACTTGGGAGCAGACATTCAAGAACTAATCCAAG  
AGGCAAAACCCCGGCCACATGGACGCTGAAGTTGGATGGCAACCTTCAGCT  
AGACTGCCTGGCTCAAGGGTGAAGCAATACCAACAGAGAGCATTGGCTGG  
TTCCGGTGTTCCTCTGCCAGCGAAGTTGGGCTTCCGCCAAGTTGCAGATTCT  
GTGCCACACGTACTGGGAGCACTGGACATCCCAGGGTCAGGTGCGTATGAGG  
CTCTTGGCAAAGGTGCCAGAAGTGTCTGGTCCAAATATGAGATGCCCTG  
AGTTCTCCTCGGATAGCACCATGAGGATTCTGAGCAACCTGGTGCAGCATAT  
ACTGAAGAAATACTATGGAAATGGCATGAGGAAGTCTCCAGAAATGCCAGTA  
ATCCTGGAAGTGTCCCTGGAAGGATCCCAGACACAGCCAATGTGAGGCAT  
GCACTTTGGGCATATGTGGACAGGGCTIAAAAAGCTACATGACAAAGCCGTC  
CAAATCCCTACTCCCCCACCTAAAGACTGGGAATTCTCACCTGGAATTGGTG  
CTGTGTACCTCGCAAACCAAGCCAAGAACCAAGTCAGATGAGGCAAAAGAGG  
CTAAGGGGAGTGGGTATGAGAAATTAGGGCCAGTCGAGACCCAGATCCACT  
GAACATCTGTGTCTTATTITGCTGCTGTATTATTGTAGTCAAATGCTTAC  
ATCAGAATGA

SEC ID N° 40 (secuencia de aminoácidos de RTP4 humano)

MVVDFWTWEQTFQELIQEAKPRATWTLKLDGNLQLDCLAQGWKQYQQRAFG.  
WFRCSSCQRSWASAKLQILCHTYWEHWTSQGVRMRLFGQRCQKCSWSQYEM  
PEFSSDSTMRLSNLVQHILKKYYNGMRSPEMPVILEVSLEGSHDTANCEACT  
LGICGQGLKSYMTKPSKSLPHLKTGNSSPGIGAVYLANQAKNQSDEAKEAKGS  
GYEKLGPSRDPDPLNICVFILLVFTVVKCFTSE

FIGURA 34



**FIGURA 35**

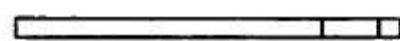
mRTP1



A



B



C



D



E



pCl

**Figura 36- Referencia**

**SEC ID N° 41 (secuencia de aminoácidos murinos para RTP1-A)**

MEEVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQS  
VVILFHYMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLIT  
SLREQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQEGIVHWKPSEKLLEEEAT  
TYTFSRAPSPPTKPQAETGSGCNFC SIPWCLFWATVMLIIYLQFSFR  
TSV

**Figura 37. Referencia**

SEC ID N1 42 (secuencia de aminoácidos murinos para RTP1-B)

MYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLITSLREQC  
YGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQEGIVHWKPSEKLLEEEATTYTFSR  
APSPTKPQAETGSGCNFC SIPWCLFWATVLM LiYLQFSFR TS V

**Figura 38. Referencia**

**SEC ID N° 43 (secuencia de aminoácidos murinos para RTP1-C)**

**MLEENIESLVDNLITSLREQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQEGLV  
HWKPSEKLLBEEATTYTFSRAPSPTKPQAETGSGCNFC SIPWCLFWATVLMLIYL  
QFSFRTSV**

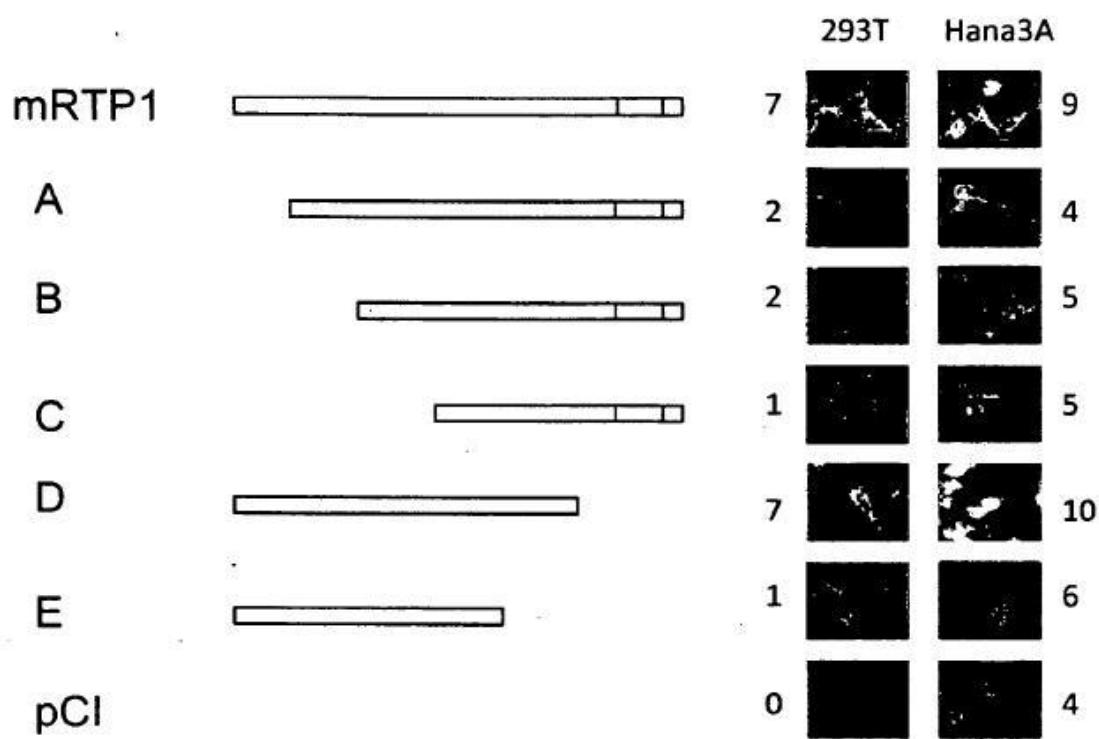
**Figura 39. Referencia  
SEC ID N° 44 (secuencia de aminoácidos murinos para RTP1-D)**

**MRIFRPWRLRCPALHLPSFPTFSIKCSLPLPTDEDMCKSVTTGEWKKVFYEKME  
EVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPHVVI  
LFHMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLITSLR  
EQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQBGIVHWKPSEKLLEEEATTYT  
FSRAPSPTKPQAETGSGC**

**Figura 40. Referencia**

SEC ID N° 45 (secuencia de aminoácidos murinos de RTP1-E)

MRIFRPWRLRCPALHLPSFPTFSIKCSLPLPTDEDMCKSVTTGEWKKVFYEKME  
EVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPHVVI  
LFHMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGATARLDESSMLEENIESLVDNLITSR  
EQCYGERGGH

**FIGURA 41**

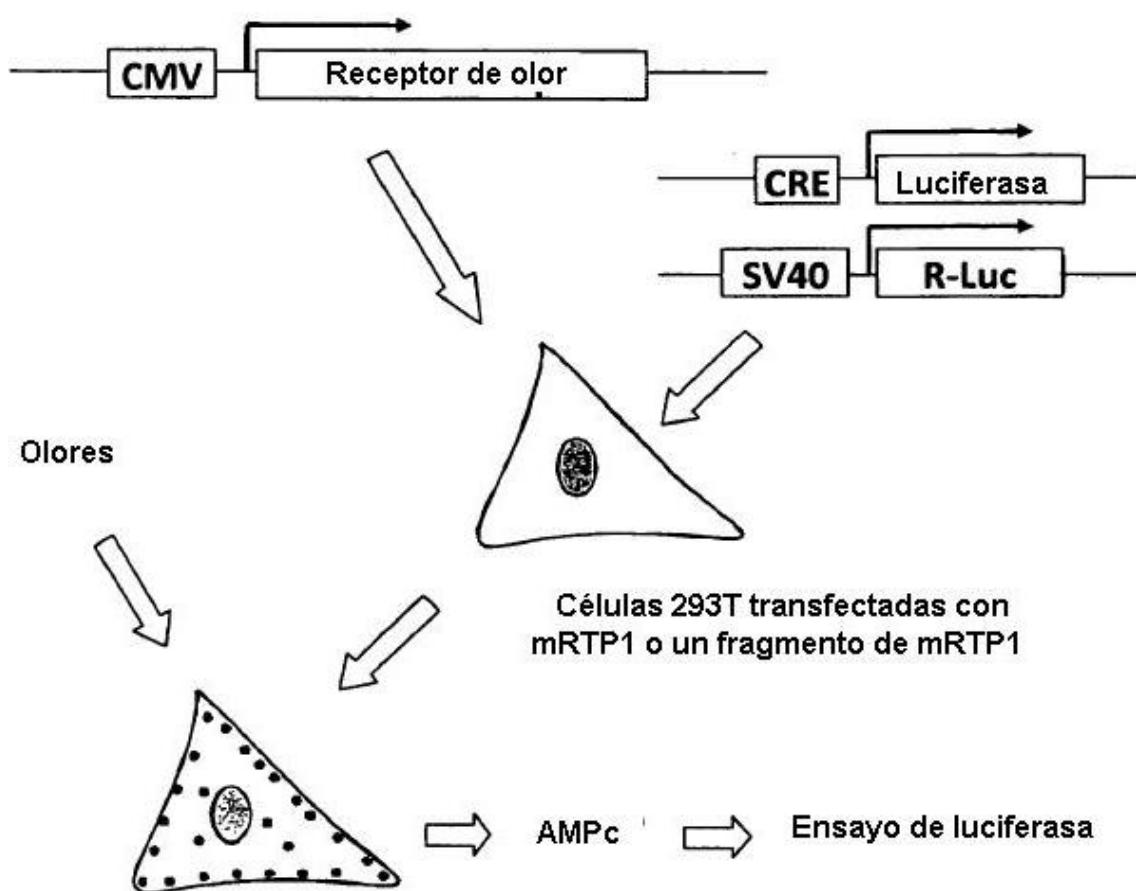
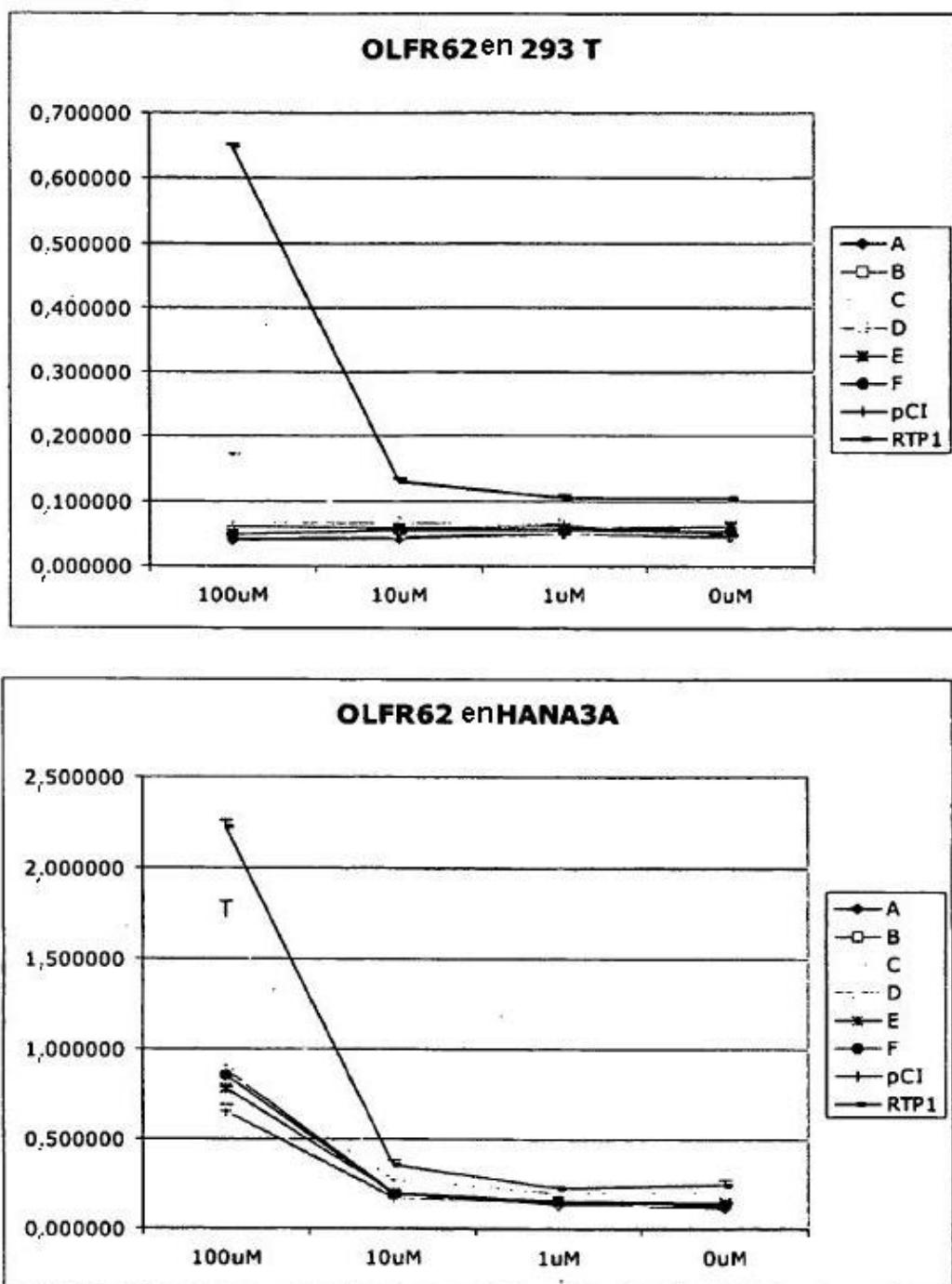
**FIGURA 42**

FIGURA 43



**FIGURA 44**



**Figura 45**

**SEC ID N° 46 (secuencia de aminoácidos murina de RTP1-A1)**

MCKSVTTGEKKVFYEKMEEVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAGWKQYLELHAS  
GRFHCSWCWHTWQSPHVILFHMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLD  
ESSMLEENIESLVDNLITSREQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQE  
GIVHWKPSEKLLEEEATTYTFSRAPSPTKPQAETGSGCNFC SIPWCLFWATVMLI  
IYLQFSFRTSV

**SEC ID N° 47 (secuencia de aminoácidos humana para RTP1-A1)**

1 CKS VTTDEWKKVF YEKMEEAKPA  
61 DSWDLIIDPN LKHNVLSPGW KQYLELHASG RFHCSWCWHT WQSPYVVILF HMFLDRAQRA  
121 GSVRMRVFKQ LCYECGTARL DESSMLEENI EGLVDNLITS LREQCYGERG GQYRIHVASR  
181 QDNRRHRGEF CEACQEGIVH WKPS EKLLEE ATTYTFSRA PSPTKSQDQT GSGWNFC SIP  
241 WCLFWATVLL ILYLQFSFR SSV

**Figura 46- Referencia**

**SEC ID N° 48 (secuencia de aminoácidos murino para RTP1-D1)**

**MRIFRPWRLRCPAHLPSFPTFSIKCSLPLPTDEDMCKSVITGEWKKVFYEKME  
EVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPHVVI  
LFHMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLITSR  
EQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQEGIVHWKPSEKLLEEEA**

Figura 47. Referencia

SEC ID N° 49 (secuencia de aminoácidos murina para RTP-D2)

MRIFRPWRLRCPALHLPSPFTFSIKCSLPLPTDEDMCKSVTTGEWKKVFYEKME  
EVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPHVVI  
LFHIMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLITSLR  
EQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEA

**Figura 48**  
**SEC ID N° 50 (secuencia de aminoácidos murina para RTP-D3)**

**MRIFRPWRLRCPALHLPSFPTFSIKCSLPLPTDEDMCKSVTTGEWKKVFYEKME  
EVKPADSWDFIIDPNLKHNVLAPGWKQYLELHASGRFHCSWCWHTWQSPHVVI  
LFHMYLDKAQRAGSVRMRVFKQLCYECGTARLDESSMLEENIESLVDNLITSLR  
EQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQEGIVHWKPSEKLLEEEATTYT  
FSRAPSPPTKPKQAETGSGCNFC SIPWCLFWATVMLII**

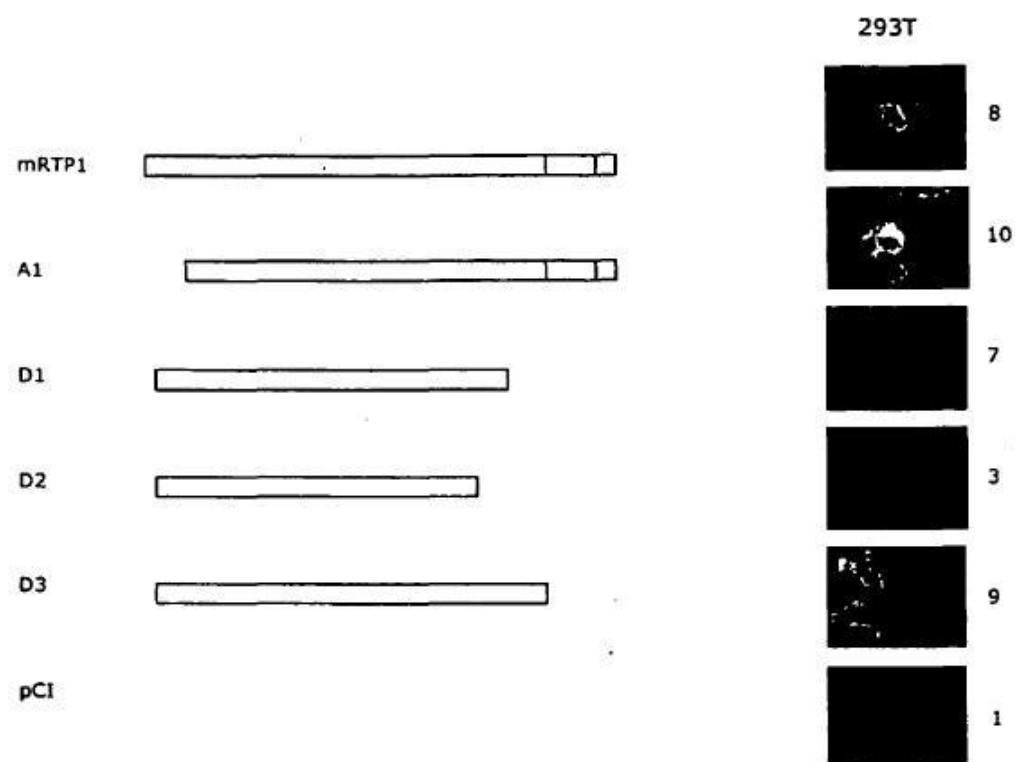
**Figura 49**

FIGURA 50

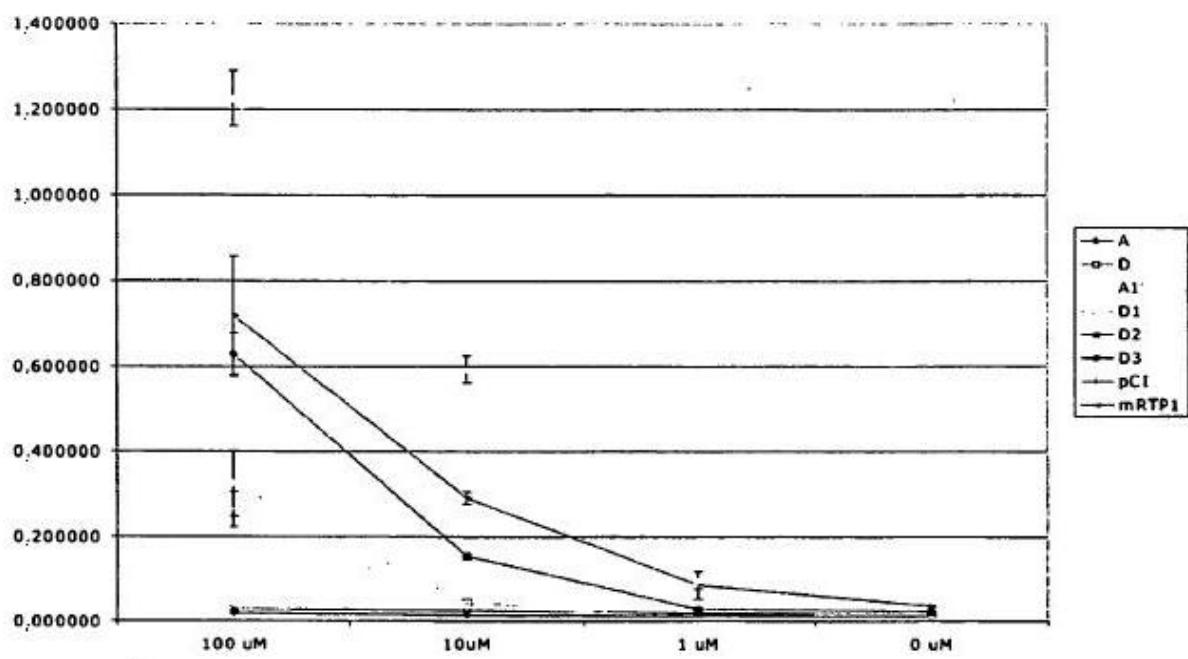
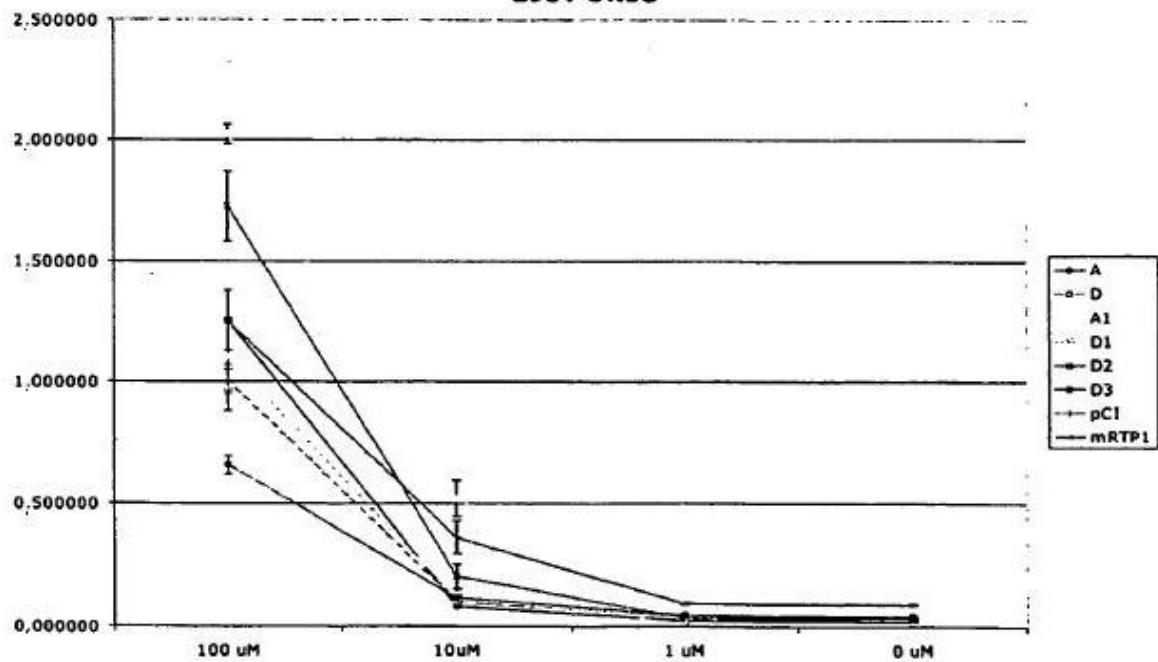
**A****293T OLFR62****B****293T OREG**

FIGURA 50

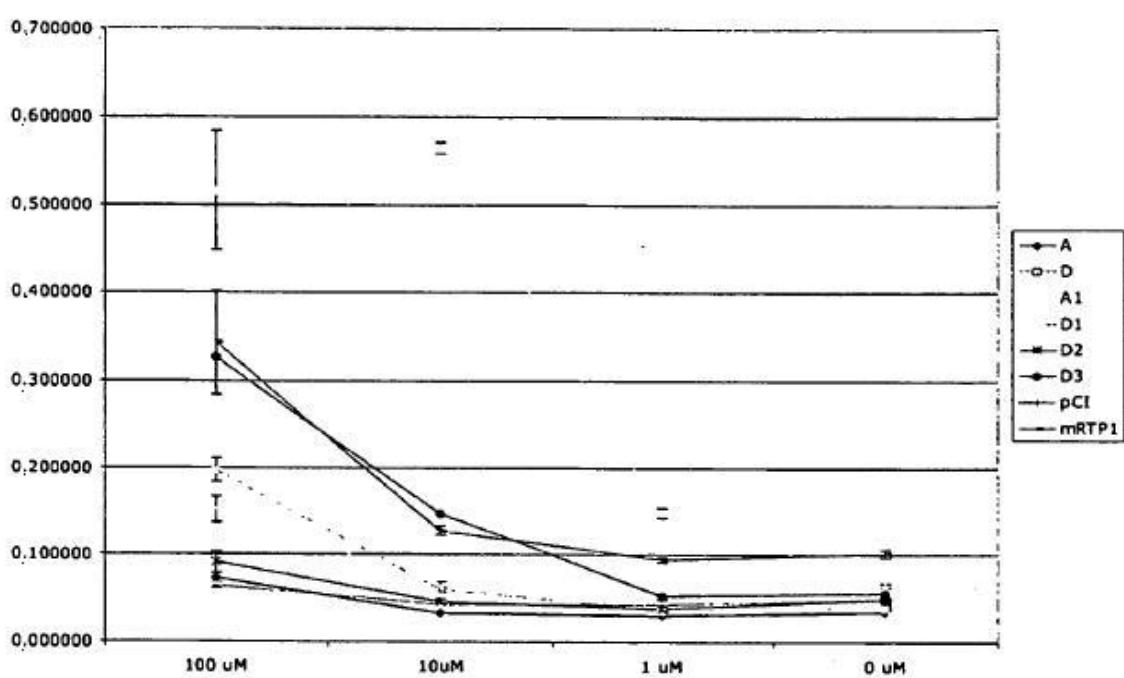
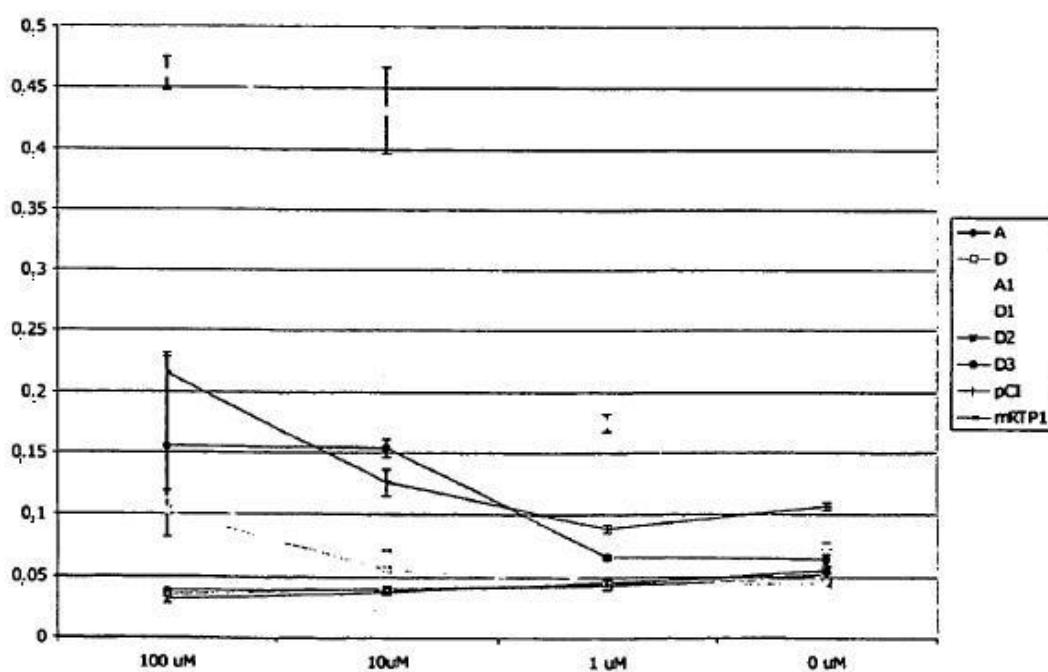
**C****293T S6****D****293T 23-1**

FIGURA 51

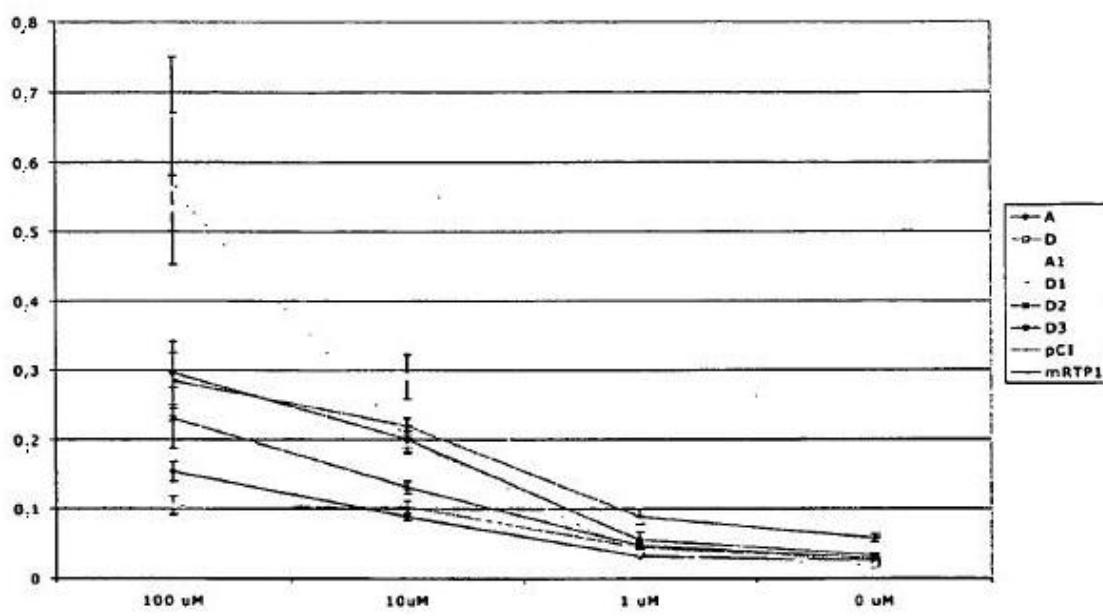
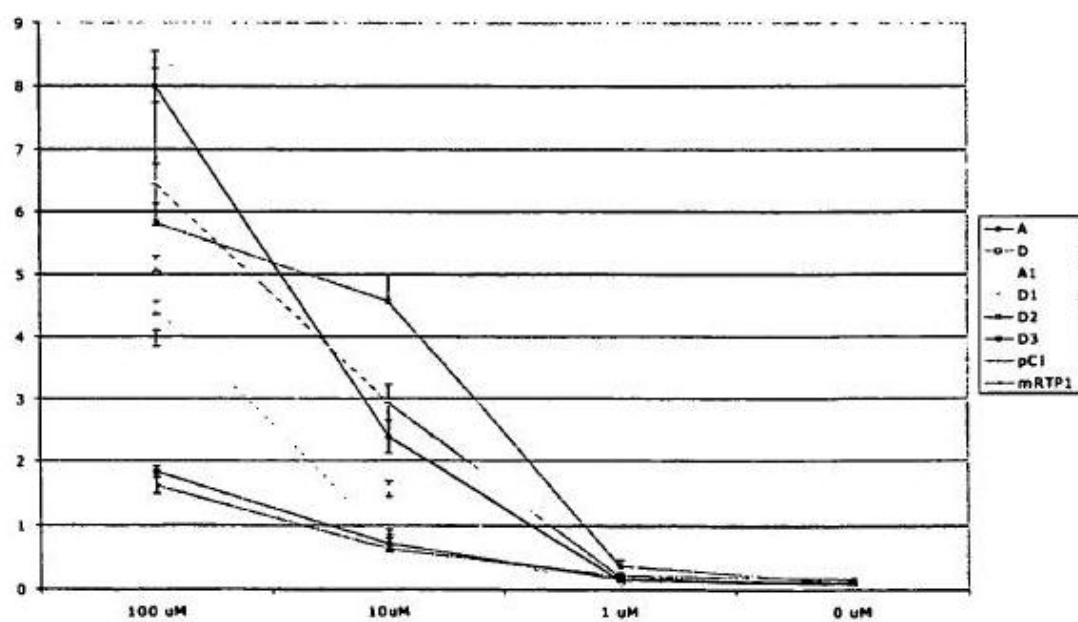
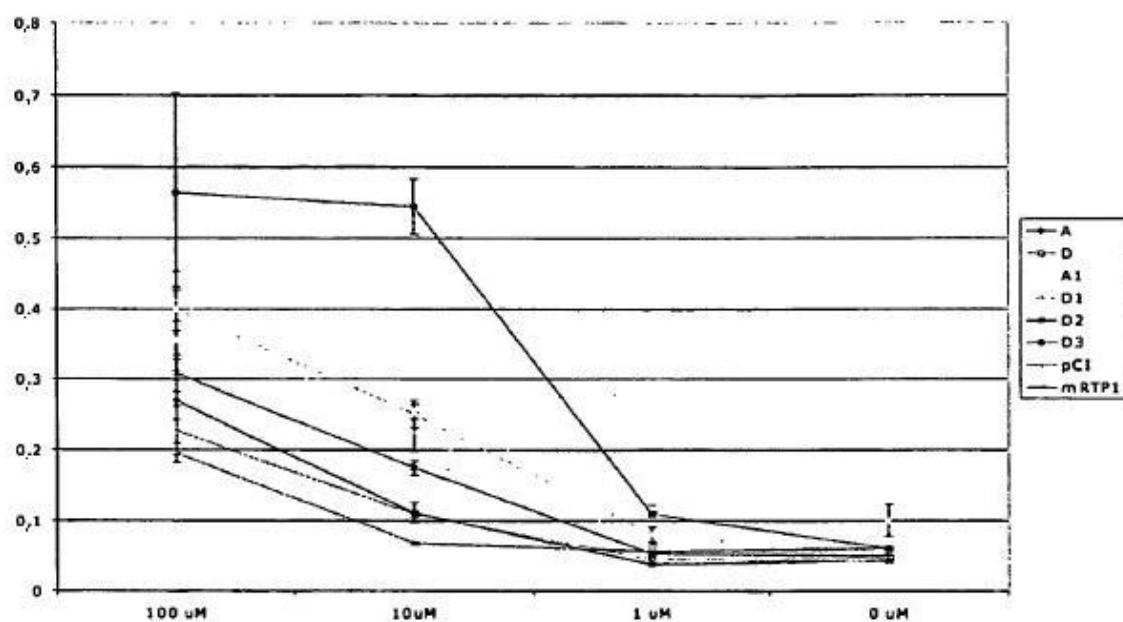
**A****Hana3A OLFR62****B****Hana3A OREG**

FIGURA 51

C

Hana3A S6



D

Hana3A 23-1

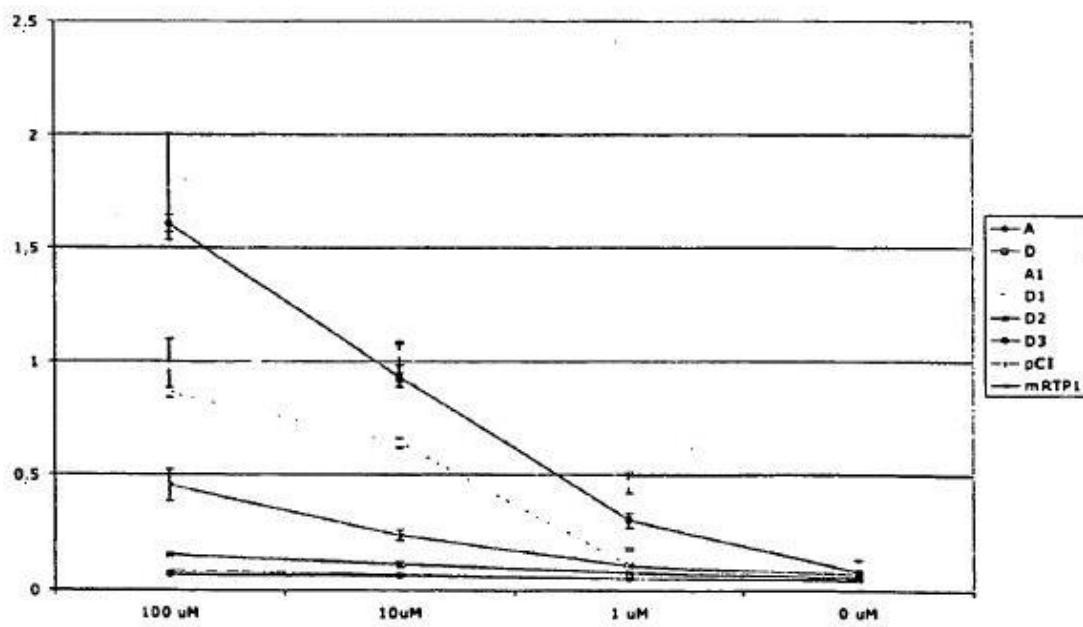


FIGURA 52

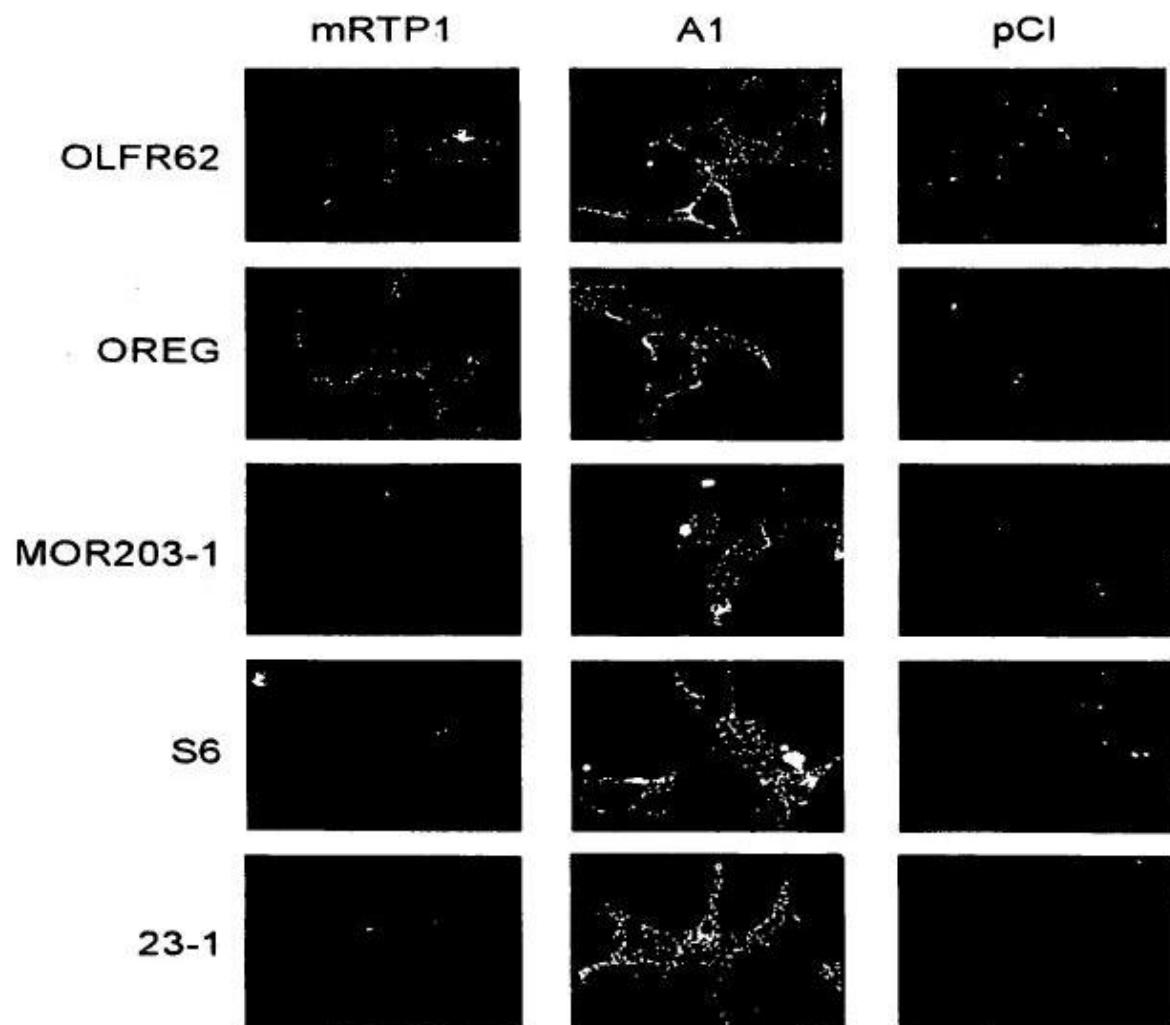
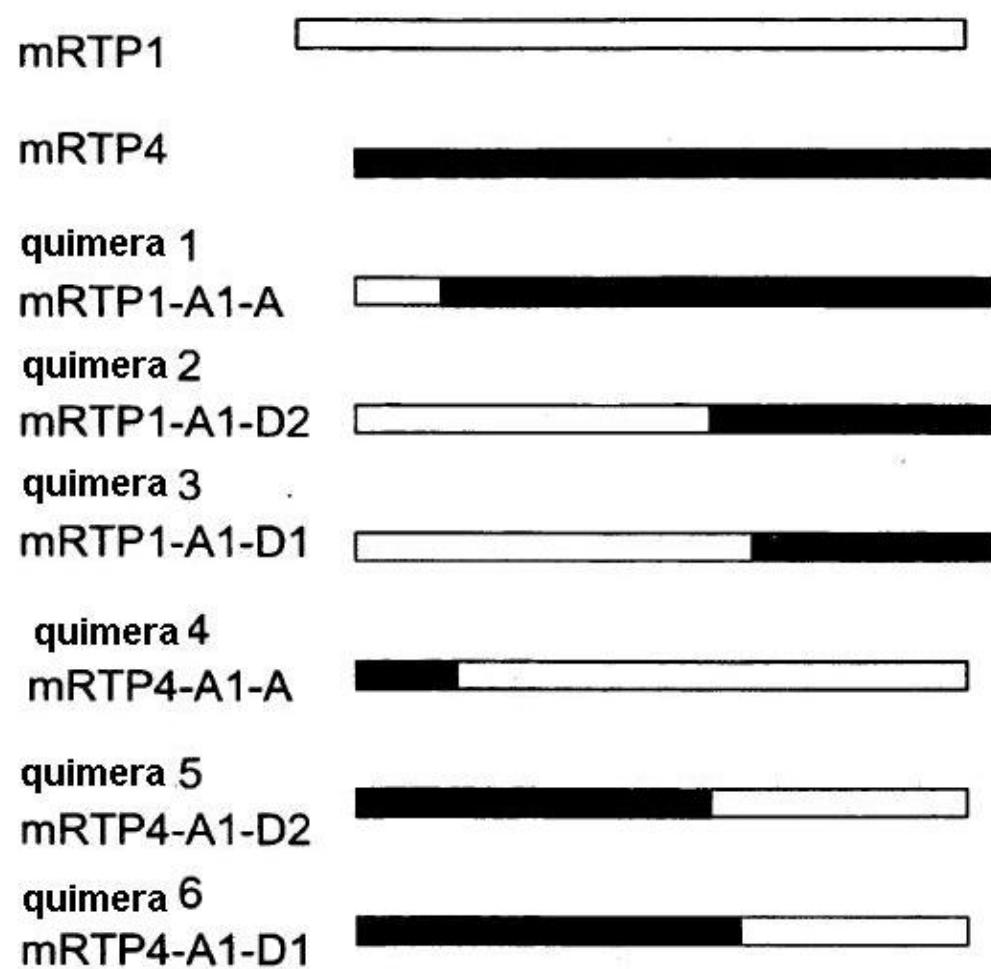


FIGURA 53



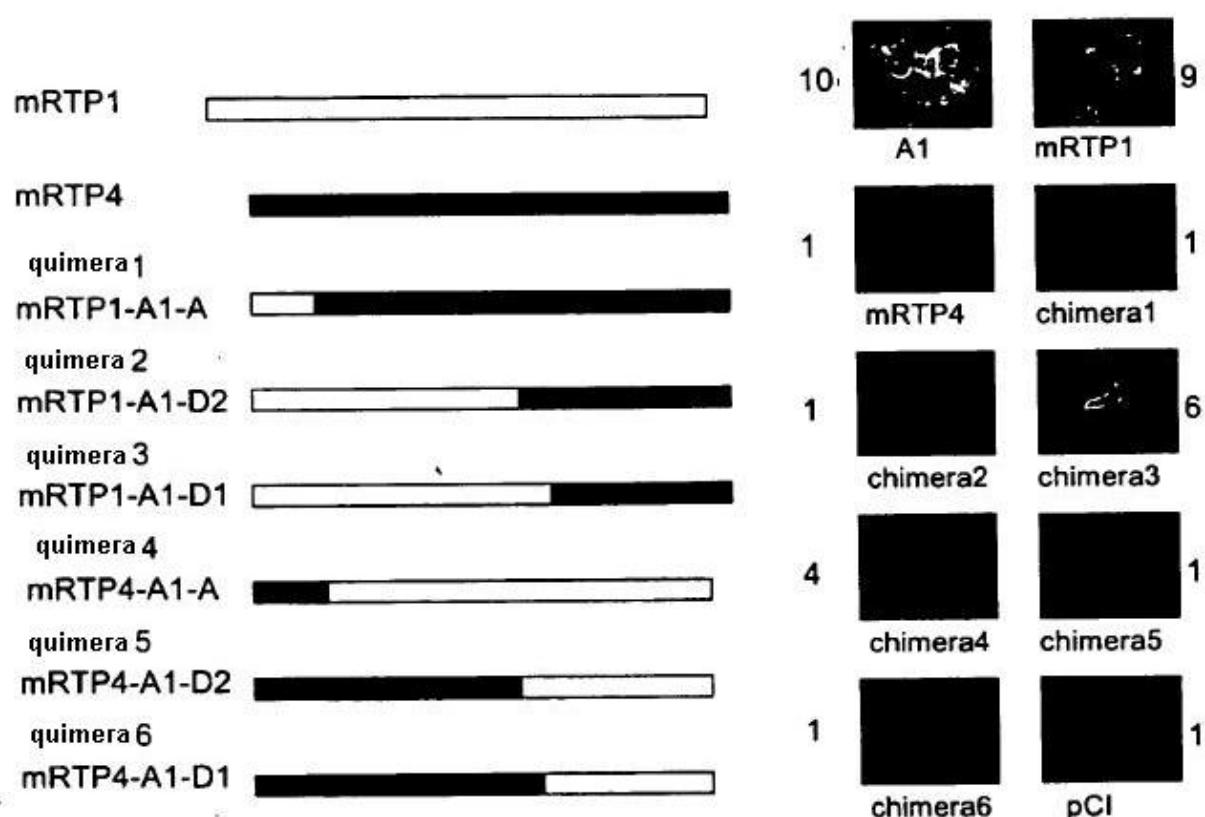
**FIGURA 54**

FIGURA 55

OLFR62

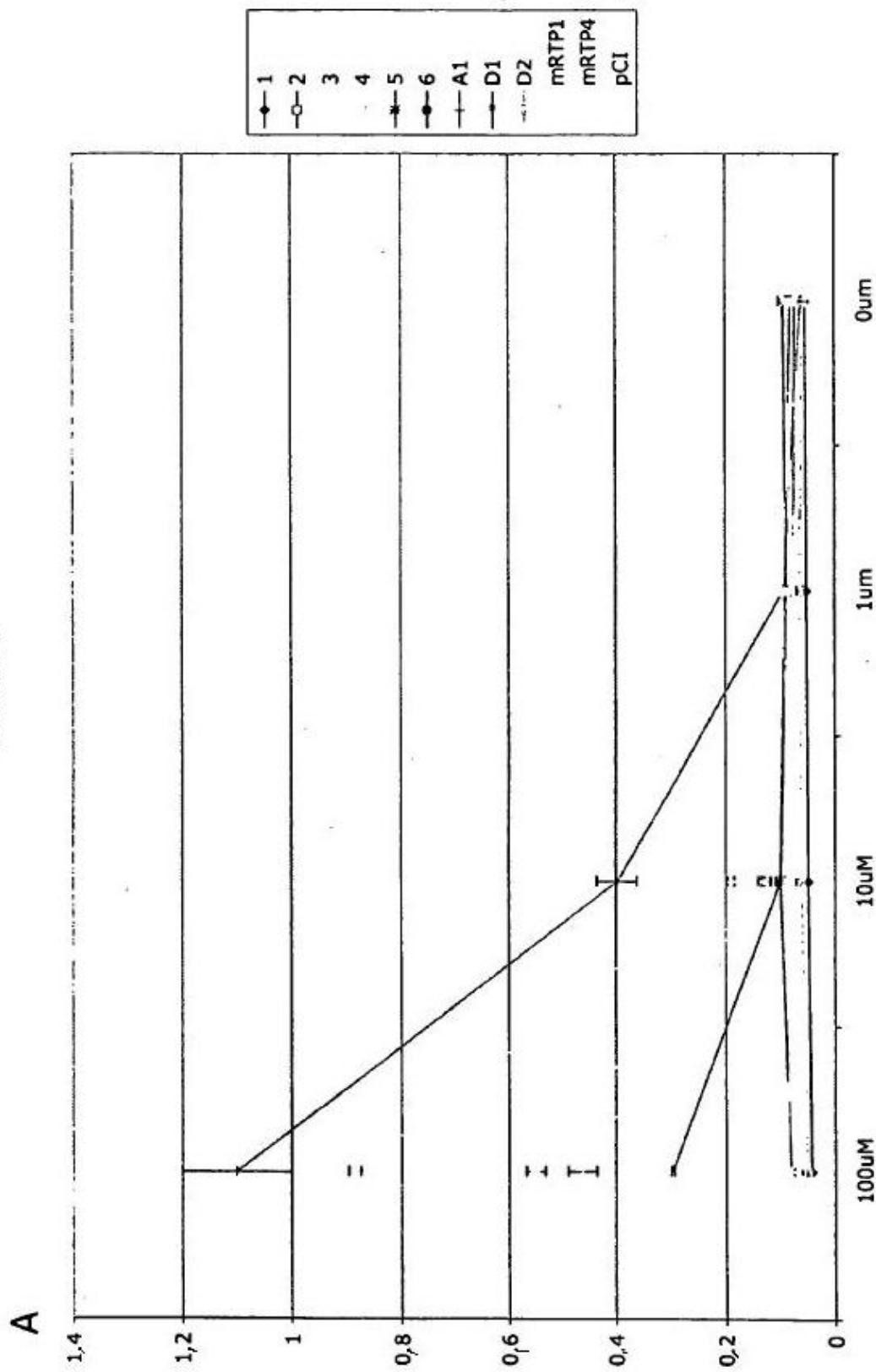


FIGURA 55

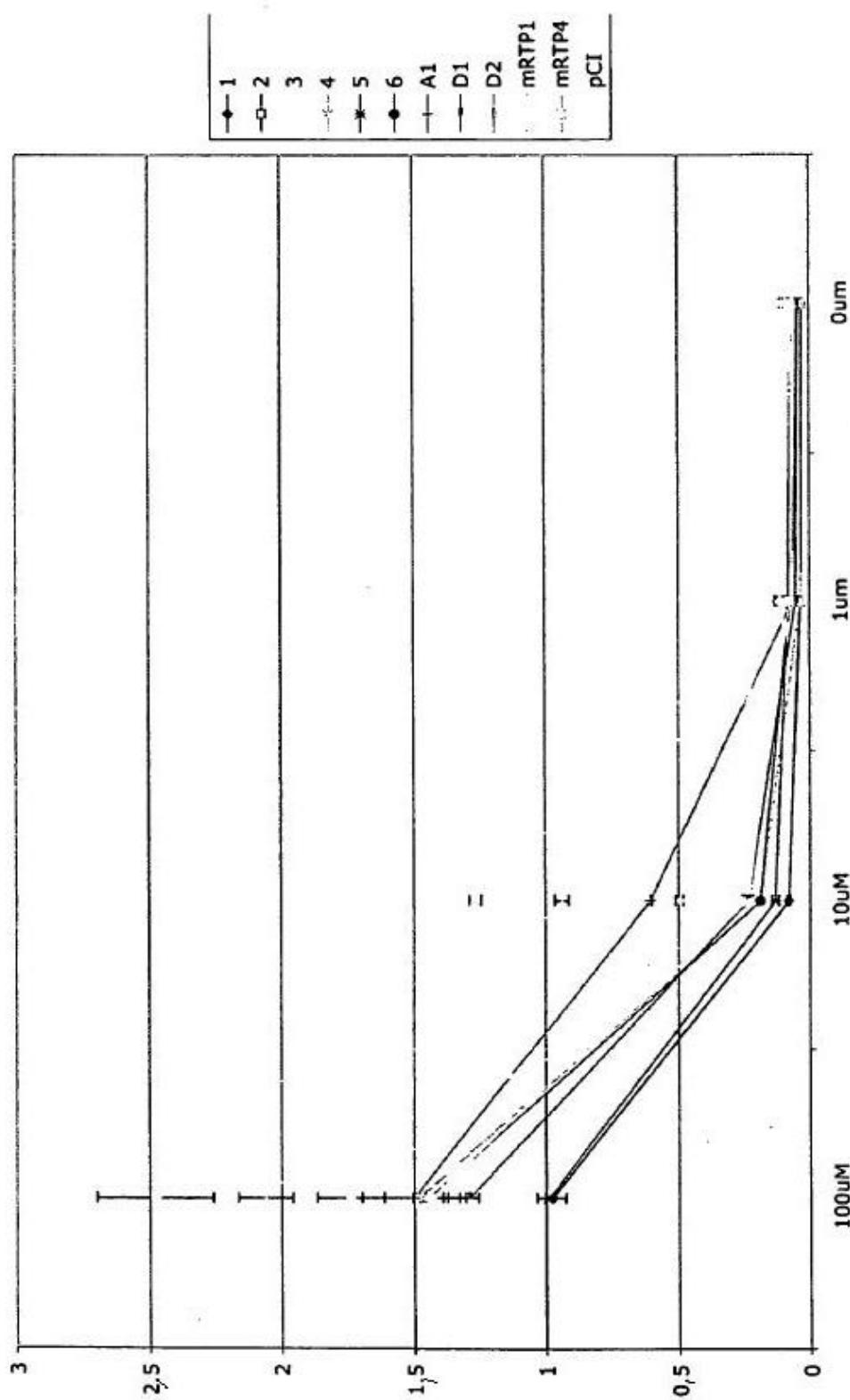
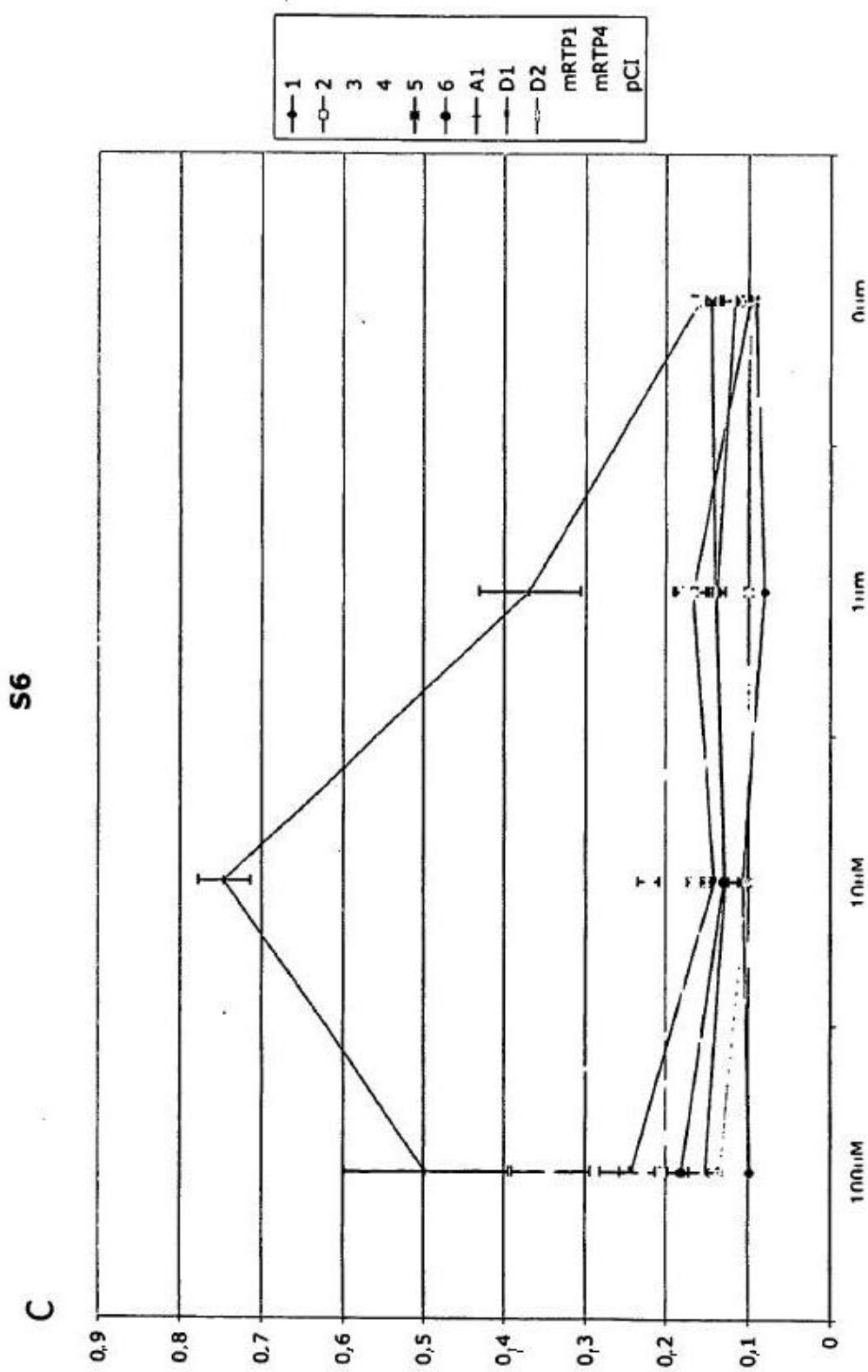
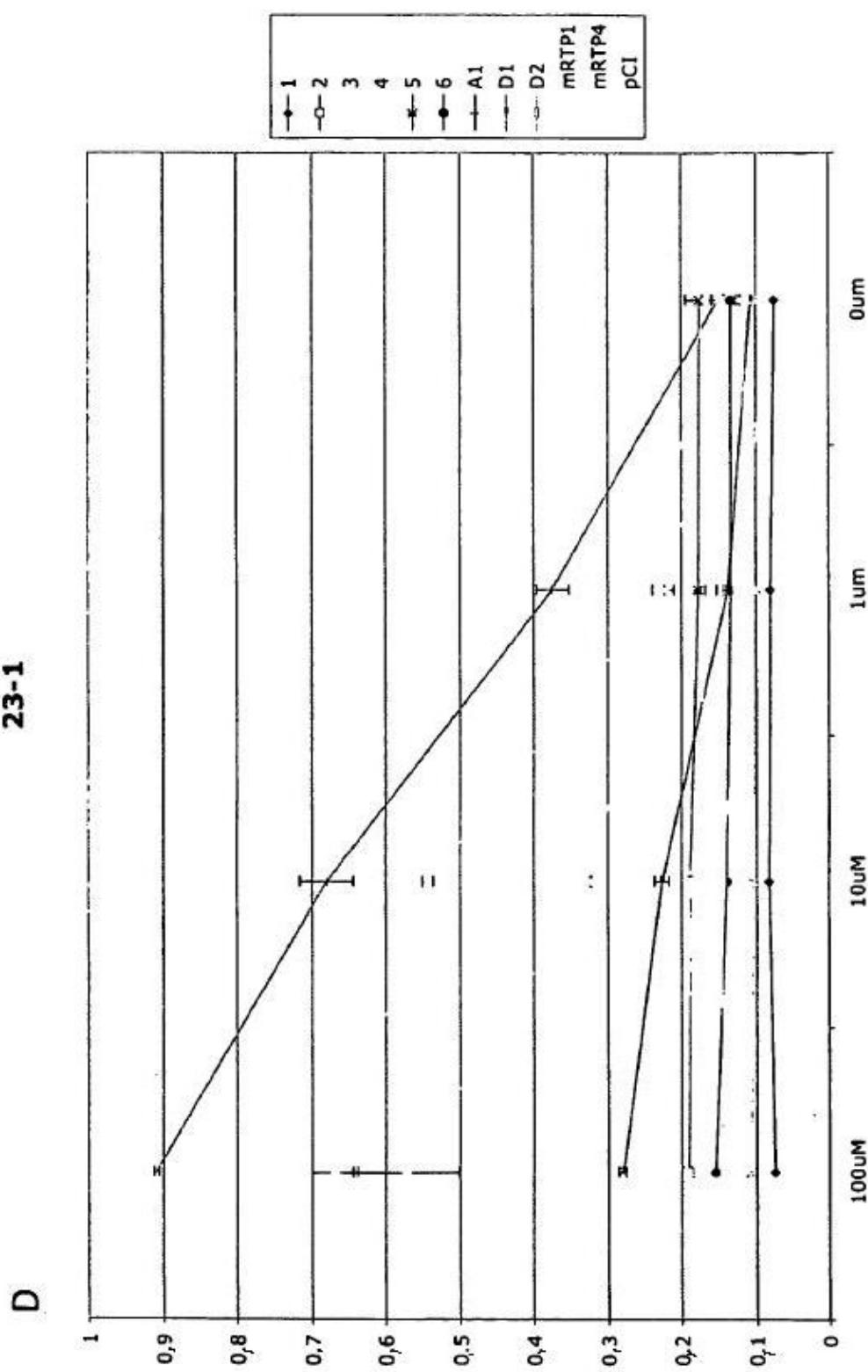
B  
OREG

FIGURA 55



**FIGURA 55**

**FIGURA 56**

