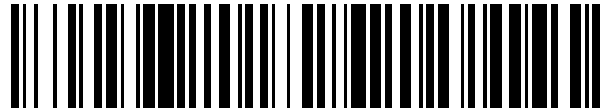


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 272**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2000 E 06005642 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 1690535**

54 Título: **Uso terapéutico de precursor de óxido nítrico**

30 Prioridad:

01.06.1999 US 323472

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

29.06.2015

73 Titular/es:

**VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, SUITE
210, 1207 17TH AVENUE SOUTH
NASHVILLE, TN 37212, US**

72 Inventor/es:

**SUMMAR, MARSHALL L. y
CHRISTMAN, BRIAN W.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 539 272 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

Uso terapéutico de precursor de óxido nítrico

5 Campo técnico

- [0001]** La presente invención se refiere a la citrulina para usar en un procedimiento para tratar o prevenir una afección o trastorno en un sujeto que se somete a cirugía cardíaca, que está asociado con una función subóptima del ciclo de la urea. Se describen además moléculas de polinucleótido aisladas útiles para analizar fenotipos de la carbamil fosfato sintasa I, péptidos codificados por estas moléculas, y sus usos de diagnóstico y terapéutico relacionados con un polimorfismo recién identificado de la carbamil fosfato sintasa I. Entre dichos usos hay procedimientos descritos para determinar la susceptibilidad de un sujeto a la hiperamonemia, producción reducida de arginina y a la toxicidad en el trasplante de médula ósea basado en un análisis de una muestra de ácido nucleico aislada de biopsias tisulares del sujeto.

15

Tabla de abreviaturas

- ABG - gas(es) de la sangre arterial
 ALI - lesión pulmonar aguda
 20 ASO - oligonucleótido específico de alelo
 ATP - trifosfato de adenosina
 BCAA - aminoácido(s) de cadena ramificada
 BMT - trasplante de médula ósea
 BSA - albúmina de suero bovino
 25 BuCy - busulfán, ciclofosfamida
 BUN - nitrógeno ureico en la sangre
 CBVP16 - ciclofosfamida, biscloroetilnitrosourea, etopósido
 cc - centímetros cúbicos
 CPSI - carbamil fosfato sintasa I
 30 CTC - ciclofosfamida, tiotepá, carboplatino
 CVP16TBI - ciclofosfamida, etopósido, irradiación corporal total
 ECMO - oxigenación por membrana extracorpórea
 fl - longitud completa
 GSHosc - glutatión sintasa
 35 HAT - hipoxantina, aminopterina, timidina
 HVOD - enfermedad venooclusiva hepática
 iNO - óxido nítrico inhalado
 KDa - kilodalton
 KLH - hemocianina de lapa californiana
 40 l - litro
 LAT - traducción activada por ligado
 LCR - reacción en cadena de la ligasa
 MAS - síndrome de aspiración de meconio
 NAG - n-acetil-glutamato
 45 NASDA - amplificación basada en secuencia de ácido nucleico
 NO o NOx - óxido nítrico
 NOS - óxido nítrico sintasa
 O/C - ornitina/citrulina
 PBST - trasplante de citoblastos de sangre periférica
 50 PPHN - hipertensión pulmonar persistente de recién nacidos
 PCR - reacción en cadena de la polimerasa
 RCR - reacción en cadena de reparación
 RDS - síndrome de dificultad respiratoria
 REF - huella de endonucleasa de restricción
 55 RT - transcriptasa inversa
 SSCP - polimorfismo de conformación de una cadena
 SDA - activación del desplazamiento de cadena
 SNP - polimorfismo de un solo nucleótido
 TC - tiotepá, ciclofosfamida

TEAA - aminoácidos esenciales totales
 UC - ciclo de la urea
 UCF - función del ciclo de la urea
 VPA - ácido valproico

5

Técnica anterior

[0002] La ruta sintética in vivo para la arginina comienza con la ornitina. La ornitina se combina con el fosfato de carbamilo para producir citrulina, que a su vez se combina con aspartato, en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) para producir argininosuccinato. En la etapa final, el fumarato se escinde del argininosuccinato para producir arginina. La ruta degradativa para la arginina es por la acción hidrolítica de la arginasa, para producir ornitina y urea. Estas reacciones forman el ciclo de la urea. El ciclo de la urea sirve como ruta principal para eliminar nitrógeno residual producido por el metabolismo de proteínas endógenas y exógenas, y se muestra esquemáticamente en la figura 1.

15

[0003] La alteración de los procesos metabólicos es un efecto secundario frecuente de la quimioterapia. De hecho, los agentes usados en la quimioterapia con dosis alta afectan a una serie de procesos celulares. Los procesos metabólicos localizados en tejidos quimiosensibles tales como el hígado y el tracto gastrointestinal, tienen un riesgo particularmente grande de alteración.

20

[0004] La renovación y procesamiento constante del nitrógeno implica a todos los tejidos del cuerpo, pero las primeras etapas críticas del ciclo de la urea están limitadas al hígado e intestino. La quimioterapia de dosis alta asociada con el trasplante de médula ósea (BMT) interfiere con la función hepática y es tóxica para el intestino. La hiperamonemia idiopática, que sugiere disfunción del ciclo de la urea, se ha descrito que está asociada con una alta mortalidad en pacientes que se someten a trasplante de médula ósea Davies y col., *Bone Marrow Transplantation*, 17:1119-1125 (1996); Tse y col., *American Journal of Hematology*, 38:140-141 (1991); y Mitchell y coll., *American Journal of Medicine*, 85:662-667 (1988).

25

[0005] Una complicación común del BMT es la enfermedad venooclusiva hepática (HVOD). La HVOD está asociada con ictericia, tamaño aumentado del hígado y alteración del flujo sanguíneo hepático normal. La HVOD se produce en aproximadamente 20 a 40% de los pacientes y está asociada con morbilidad y mortalidad.

30

[0006] El óxido nítrico (NO) tiene una función en la regulación del tono vascular y en el mantenimiento de la permeabilidad de las vénulas hepáticas y pulmonares después de quimioterapia de dosis alta. La función del ciclo de la urea intacto es importante no solo para la excreción del amoníaco sino también en el mantenimiento de niveles tisulares adecuados de arginina, el precursor del NO.

35

[0007] La carbamil fosfato sintasa I (CPSI) es la enzima limitante de la velocidad que cataliza la primera etapa ejecutada de la ureagénesis por el ciclo de la urea. La CPSI es muy específica de tejido, con función y producción sustancialmente limitada al hígado e intestinos. Codificada genómicamente, la CPSI es producida en el citoplasma y transportada a las mitocondrias donde es escindida en su forma monomérica madura de 160 kDa. La enzima combina amoníaco y bicarbonato para formar carbamilo con el gasto de dos moléculas de ATP y usando el cofactor N-acetil-glutamato (NAG).

40

[0008] Cualquier predisposición genética a una función del ciclo de la urea disminuida conduciría a hiperamonemia y contribuiría probablemente a la gravedad de trastornos asociados con la función subóptima del ciclo de la urea, incluyendo la toxicidad relacionada con el BMT. Por lo tanto, es necesario en la técnica la caracterización de alelos presentes en poblaciones que padecen trastornos asociados con la función subóptima del ciclo de la urea, que se someten a BMT o que se enfrentan de otra forma a la exposición de hepatotoxinas ambientales o farmacológicas. En vista de la función de la CPSI en el ciclo de la urea, hay una necesidad particular de caracterización de alelos de la CPSI presentes en dichas poblaciones.

45

50

[0009] Russel I. y col., *ANESTHESIA AND ANALGESIA*, vol. 87, no. 1, julio 1998, páginas 46-51, describen los efectos del óxido nítrico inhalado en la hipertensión pulmonar postoperatoria en bebés y niños que se someten a reparación quirúrgica de enfermedad cardíaca congénita.

55

[0010] Schulze-Neick y col., *CIRCULATION*, vol. 100, no. 7, agosto 1999, páginas 749-755, investigaron la disfunción endotelial pulmonar en niños con enfermedad cardíaca congénita evaluando la ruta de L-arginina-óxido nítrico (NO).

Resumen de la invención

- 5 **[0011]** La presente invención describe la citrulina para usar en un procedimiento para el tratamiento o prevención de una afección o trastorno en un sujeto que se somete a cirugía cardiaca, que está asociado con la función subóptima del ciclo de la urea.
- 10 **[0012]** Preferiblemente, la citrulina se administra en una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg.
- [0013]** Más preferiblemente, la citrulina se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg.
- 15 **[0014]** Incluso más preferiblemente, la citrulina se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg.
- [0015]** Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano.
- 20 **[0016]** Se describe un procedimiento de cribado de la susceptibilidad a la función subóptima del ciclo de la urea en un sujeto. El procedimiento comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de ácido nucleico del sujeto; y (b) detectar un polimorfismo de un gen de la carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en la muestra de ácido nucleico del sujeto, indicando la presencia del polimorfismo la susceptibilidad del sujeto a la función subóptima del ciclo de la urea. Se describe además la detección del polimorfismo con respecto a la determinación de la susceptibilidad de un sujeto a la toxicidad por trasplante de médula ósea.
- 25 **[0017]** Preferiblemente, el polimorfismo del polipéptido de la carbamil fosfato sintasa comprende la transversión de C a A en el exón 36 del gen de CPSI, más preferiblemente en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI. Más preferiblemente, la transversión de C a A en el nucleótido 4340 del ADNc que corresponde al gen de CPSI comprende además un cambio en el código de triplete de AAC a ACC, que codifica un polipéptido de la
- 30 CPSI que tiene un resto treonina en el aminoácido 1405.
- [0018]** Además se describe un polipéptido de CPSI biológicamente activo aislado y purificado. Preferiblemente, un polipéptido es un polipéptido recombinante. Más preferiblemente, un polipéptido comprende la CPSI humana que tiene un resto asparagina en el aminoácido 1405.
- 35 **[0019]** Además se describe un polinucleótido aislado y purificado que codifica un polipéptido de CPSI biológicamente activo. Además, se describe un polinucleótido de la presente invención que comprende una molécula de ADN de un ser humano. Además, se describe un polinucleótido que comprende un ADNc que corresponde al gen de CPSI y que incluye una transversión de C a A en el nucleótido 4340. Se describe incluso además un
- 40 polinucleótido que comprende un ADNc que corresponde al gen de CPSI que incluye un cambio en el código de triplete de ACC a AAC en el nucleótido 4340, y codifica un polipéptido de CPSI que tiene un resto asparagina en el aminoácido 1405.
- [0020]** También se describen en el presente documento kits y reactivos, incluyendo oligonucleótidos, sondas de ácido nucleico y anticuerpos adecuados para usar para llevar a cabo los procedimientos descritos en el presente documento y para usar en la detección de polipéptidos y polinucleótidos descritos en el presente documento. También se describen en el presente documento procedimientos para preparar los polinucleótidos y polipéptidos descritos en el presente documento.
- 50 **[0021]** Se describen además, los procedimientos terapéuticos basados en un polimorfismo de un gen de carbamil fosfato sintasa I (CPSI) como se describe en el presente documento. Dichos procedimientos terapéuticos incluyen la administración de precursores de óxido nítrico en el tratamiento y profilaxis de trastornos mediados o modulados por la función subóptima del ciclo de la urea (p. ej., toxicidad en trasplante de médula ósea) y procedimientos de terapia génica usando un polinucleótido aislado y purificado descrito en el presente documento.
- 55 **[0022]** Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar citrulina para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de una afección o trastorno en un sujeto que se somete a cirugía cardiaca, que está asociado con la función subóptima del ciclo de la urea.

[0023] Algunos de los objetos de la invención se han expuesto en lo que antecede, otros objetos serán evidentes al avanzar la descripción, cuando se consideren en relación con los dibujos que acompañan y ejemplos como se describen mejor en lo sucesivo.

5 Breve descripción de los dibujos

[0024]

La figura 1 es un esquema del ciclo de la urea;

10 La figura 2 es un esquema de la proteína CPSI consenso que no refleja mutaciones reconocidas;

La figura 3 es un esquema de la proteína CPSI consenso que representa varias mutaciones conocidas en la proteína y que representa el polimorfismo T1405N de la presente invención;

15 La figura 4 es un esquema de la modificación postranscripcional reconocida de la CPSI;

La figura 5 es un esquema del locus genómico humano para la CPSI;

La figura 6 es un esquema de una estrategia de clonación para un ADNc de CPSI de longitud completa;

20

La figura 7 es un esquema de una estrategia de clonación alternativa para un ADNc de CPSI de longitud completa;

La figura 8 es una representación gráfica de la actividad metabólica de la proteína CPSI expresada en células COS-7;

25

La figura 9 es presentación gráfica del tamaño y posición de intrones en el ADNc de CPSI;

La figura 10 es un diagrama del exón 36 (SEQ ID NO: 5) que muestra los sitios de los cebadores oligonucleótidos preferidos en la presente invención;

30

La figura 11 presenta la secuencia de aminoácidos de T1405 CPSI (SEQ ID NO: 4) (codón de parada traducido como "X", PM 165049, 1,163602e+07 CN), con el aminoácido metionina inicial considerado que está en una posición -1; y

35 La figura 12 presenta la secuencia de aminoácidos de N1405 CPSI (SEQ ID NO: 2) (codón de parada traducido como "X", PM 165062, 1,161634E+07 CN), con el aminoácido metionina inicial considerado que está en una posición -1.

Descripción detallada de la invención

40

[0025] Se describe en el presente documento el descubrimiento sorprendente de un polimorfismo de la carbamil fosfato sintasa I (CPSI), la enzima que cataliza la primera etapa limitante de la velocidad del ciclo de la urea. En particular, el polimorfismo se caracteriza por una sustitución de aminoácido, treonina/asparagina en el aminoácido 1405 (heterocigosidad = 0,44) en la CPSI.

45

[0026] También se describe en el presente documento la sorprendente observación de que un solo cambio de nucleótido en el gen de CPSI es responsable del polimorfismo de la CPSI. En particular, la transversión de C a A en el exón 36 del gen de CPSI cambia el código de triplete de ACC a AAC y conduce al cambio T1405N en el polipéptido de CPSI codificado.

50

[0027] En vista de estos descubrimientos, se puede realizar la manipulación de moléculas de ácido nucleico derivadas de tejidos de sujetos vertebrados para proporcionar el análisis de fenotipos de CPSI, para la generación de péptidos codificados por dichas moléculas de ácido nucleico, y para procedimientos de diagnóstico y terapéuticos relacionados con el polimorfismo de la CPSI. Las moléculas de ácido nucleico usadas en estos contextos se pueden

55

amplificar, como se describe a continuación, y en general incluyen ARN, ADN genómico y ARNc derivado de ARN.

A. Consideraciones generales

[0028] La mayor parte de la información estructural actualmente disponible sobre la CPSI se obtiene de estudios

- de la enzima CPSI de rata. La enzima CPSI de rata y la enzima CPSI humana comprenden cada una un solo polipéptido de 1.500 restos y presentan una identidad de secuencia de aproximadamente 95%. El polipéptido de CPSI de rata y la información de la secuencia de ácido nucleico la describen Nyunoya, H., y col., *Journal of Biological Chemistry* 260:9346-9356 (1985) y en los números de acceso en GenBank AH005315, M12335, M12328, M12327, M12326, M12325, M12324, M12323, M12322, M12321, M12320, M12319, M12318 y M11710, incorporados en el presente documento por referencia. La información estructural sobre la CPSI de rata se obtiene de la homología de secuencia y estudios de unión de sustrato y cofactor; sin embargo, no hay disponibles datos cristalográficos.
- 10 **[0029]** La CPSI madura es de naturaleza modular, y contiene 2 regiones principales. La primera región, restos 39-406, es homóloga a la pequeña subunidad de la CPS heterodímera de *Escherichia coli*. Se describe información del polipéptido y secuencia de ácido nucleico de la CPSI bacteriana y de levadura en los números de acceso en GenBank AB005063, X67573, M27174, P07258, P03965, BAA21088, SYBYCP, SYBYCS y SYECCS, incorporados en el presente documento por referencia.
- 15 **[0030]** La otra región, los restos 417-1500 (denominados en el presente documento en lo sucesivo el "dominio CPS"), es homóloga a la subunidad grande de la CPS de *E. coli*. Meister, A., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 62:315-374 (1989). Esta subunidad es responsable de la síntesis del fosfato de carbamilo a partir de amoníaco y de la unión de los sustratos y cofactores. Meister, A., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 62:315-374 (1989). El dominio de la CPS surge por duplicación de genes y fusión en tándem en el progenoma, y, como se representa esquemáticamente en la figura 2, está él mismo compuesto de dos dominios de fosforilación y un dominio regulador C-terminal en la unión del n-acetil-glutamato (NAG). Nyunoya, H., y col., *Journal of Biological Chemistry* 260:9346-9356 (1985).
- 20 **[0031]** Como se representa esquemáticamente en la figura 2, los restos 407-416 actúan como un puente entre las dos subunidades principales, y los restos 1-38 constituyen el péptido líder que dirige la CPSI inmadura a la mitocondria antes de ser eliminada. Continuando con la figura 2, la región como la subunidad pequeña está compuesta de dos subdominios aproximadamente iguales. El subdominio de interacción, restos 39-212, corresponden a la región que, en la pequeña subunidad de la CPS de *E. coli* es necesaria para la asociación con la subunidad grande. El subdominio de glutaminasa, restos 213-406, es homólogo a varias glutamina amidotransferasas y a la región de CPSI que cuando se generaba exenta de otros componentes, presentaba una actividad de glutaminasa considerable, como describen Guillou, F., y col. *Proc Natl Acad Sci* 86:8304-8308 (1989); Nyunoya, H., y col., *Journal of Biological Chemistry* 260:9346-9356 (1985); y Guy, H. I. y col., *Journal of Biological Chemistry* 270:2190-2197 (1995). Puesto que la CPSI ha perdido el resto cisteína necesario para escindir la glutamina, la función del subdominio de glutaminasa en esta enzima es dudosa.
- 30 **[0032]** El dominio de CPS (que corresponde a la subunidad grande en *E. coli*) se cree que cataliza la síntesis del fosfato de carbamilo a partir de amoníaco, de acuerdo con la reacción:
- 35 **[0033]** Como se muestra esquemáticamente en las figuras 1 y 2, esta reacción comprende tres etapas: fosforilación de bicarbonato por una molécula de ATP que se designa en el presente documento ATP_A, que da carboxifosfato; síntesis de carbamato a partir de carboxifosfato y amoníaco; y fosforilación de carbamato por otra molécula de ATP (ATP_B), dando el fosfato de carbamilo, como describen Rubio, V. y Grisolia, S., *Enzyme* 26:233-239 (1981).
- 40 **[0033]** Como se muestra esquemáticamente en la figura 4, el dominio de CPS parece que ha surgido por duplicación y fusión en tándem del componente duplicado; por lo tanto, sus mitades amino y COOH terminales son homólogas, como describen Nyunoya, H., y col., *Journal of Biological Chemistry* 260:9346-9356 (1985)). Cada mitad homóloga comprende un dominio amino y uno COOH terminal de aproximadamente 40 y 20 kDa, respectivamente, de los cuales el dominio de 40 kDa de la mitad amino se cree que está implicado en la fosforilación del bicarbonato (dominio de fosforilación de bicarbonato, restos 417-788) (Fig. 2). El correspondiente dominio en la mitad COOH está implicada en la fosforilación de carbamato por el dominio de fosforilación de carbamato, restos 969-1329 (Fig. 2), como describen Alonso, E. y Rubio, V., *European Journal of Biochemistry* 229:377-384 (1995)).
- 50 **[0034]** Estos dominios de fosforilación son homólogos a la biotina carboxilasa (Toh, H. y col., *European Journal of Biochemistry* 215:687-696 (1993)), una enzima de estructura tridimensional conocida que fosforila el bicarbonato así como la DD-ligasa y glutatión sintetasa (GSHasa), dos enzimas que catalizar reacciones análogas (Artymiuk, P. J. y col., *Nature Struct. Biol.* 3:128-132 (1996)). Por lo tanto, la información sobre estas enzimas es útil en la interpretación de las mutaciones encontradas en dominio homólogos en pacientes con deficiencia de CPSI.

[0035] En relación de nuevo con la figura 2, de los dominios de 20 kDa de la región como la subunidad grande, la función del dominio de la mitad amino terminal, restos 789-968, permanecen estables. En cambio, el correspondiente dominio COOH terminal, restos 1330-1500, se llama el dominio alostérico, porque el activador, la n-acetil-glutamato (NAG) de CPSI y los nucleótidos efectores de la enzima de *E. coli*, UMP y IMP, se unen en este dominio, como describen Rodríguez-Aparicio, L. B. y col., *Biochemistry* 28:3070-3074 (1989) y Cervera, J. y col., *Biochemistry* 35:7247-7255 (1996).

A.1. Procesamiento enzimático

10 **[0036]** El ARNm de CPSI humana codifica una preproteína de 1500 aminoácidos, 165 kDa. El extremo amino de este precursor contiene 38 restos, incluyendo 8 restos básicos, y 1 resto ácido con una secuencia Pro-Gly de 4 restos antes de empezar la enzima madura (Nyunoya, H. y col., *Journal of Biological Chemistry* 260:9346-9356 (1985); Lagace, M. y col., *Journal of Biological Chemistry* 262:10415-10418 (1987)). Esta secuencia señal altamente conservada promueve la entrada de enzima en la matriz mitocondrial, donde después es eliminada para producir la
15 enzima madura de 160 kDa.

A.2. Expresión normal de CPSI

20 **[0037]** La actividad enzimática de la CPSI se detecta primero en el hígado fetal humano de 5-10 semanas de gestación (Moorman, A. F. y col. *Histochemical Journal* 22:457-468 (1990)). A las 20 semanas de gestación, el nivel de CPSI alcanza aproximadamente 50% del nivel adulto normal, donde permanece hasta el nacimiento, después de lo cual aumenta gradualmente hasta niveles de adulto a los 20 años de edad (Raiha, N. C. R. y Suihkonen, J. *Acta Paediatrica Scand* 57:121-127 (1968)). La expresión tisular de CPSI está limitada esencialmente al hígado, con cantidades en trazas de actividad en el intestino y el riñón. Cuando el hígado desarrolla su estructura acinar madura
25 en la edad adulta, la CPSI es compartimentalizada en células parenquimatosas alrededor de las vénulas portales terminales (Moorman, A. F. y col. *Histochemical Journal* 22:457-468 (1990)).

[0038] Además de su compartimentalización, se sabe que varios factores son importantes en la regulación de la actividad y expresión de la CPSI. Por ejemplo, niveles bajos o ausencia de ornitina disminuyen la actividad de la
30 CPSI, supuestamente debido a un efecto inhibitor del fosfato de carbamilo (CP) acumulado como describen Jackson, M. J. y col., *Annual Review of Genetics* 20:431-464 (1986); y Rubio, V., *Biochemical Society Transactions* 21:198-202 (1993)). Los niveles tanto de ARNm de CPSI como de enzima aumentan con una dieta alta en proteínas, y en respuesta al glucagón y glucocorticoides (Jackson, M. J. y col., *Annual Review of Genetics* 20:431-464 (1986); de Groot, C. J., y col., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 124:882-888 (1984)). En el tejido
35 hepático normal no estimulado que se ha examinado, se ha observado abundancia de ARNm de CPSI.

B. Técnicas de cribado

[0039] En el presente documento, se describe un procedimiento de cribado de la susceptibilidad a la función subóptima del ciclo de la urea que produce menor eliminación de amoniaco y menor producción de arginina en un sujeto. El procedimiento comprende: (a) obtener una muestra de ácido nucleico del sujeto; y (b) detectar un polimorfismo de un gen de carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en la muestra de ácido nucleico del sujeto, indicando la presencia del polimorfismo esta susceptibilidad del sujeto a la función subóptima del ciclo de la urea que produce menor eliminación de amoniaco y menor producción de arginina. En el presente documento, se describe en particular la detección del polimorfismo con respecto a la determinación de la susceptibilidad de un sujeto a toxicidad
45 en el trasplante de médula ósea.

[0040] Se indica además, que el polimorfismo de la presente descripción se puede usar para predecir la toxicidad en una serie de afecciones más allá del BMT o administración de ácido valproico, como se describe en el presente documento y en los ejemplos. El polimorfismo también está implicado en la mediación o modulación de la eliminación de amoniaco alterada y producción de arginina en situaciones tales como cirrosis hepática adulta, otras toxicidades por medicación, recién nacidos con función hepática deteriorada, y similares.

[0041] Como se usa en el presente documento, el término "polimorfismo" se refiere a la aparición de dos o más secuencias alternativas determinadas genéticamente o alelos en una población. Un marcador polimórfico es el locus donde se produce la divergencia. Los marcadores preferidos tienen al menos dos alelos, apareciendo cada uno con una frecuencia mayor que 1%. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases.

[0042] Las moléculas de ácido nucleico útiles descritas en el presente documento incluyen aquellas que hibridan

específicamente con secuencias de CPSI en la región de la transversión de C a A en la base 4340 y en el exón 36, cambiando el código de triplete de ACC a AAC. Esta transversión conduce al cambio T1405N en el polipéptido de CPSI codificado. Típicamente, estas tienen al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud y tienen la secuencia de nucleótidos que corresponde a la región de la transversión de C a A en la base 4340 de la secuencia

5

consenso de ADNc de CPSI (EC6.3.4.16), que cambia el código de triplete de ACC a AAC. La expresión "secuencia consenso", como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a una secuencia de ácido nucleico o proteína para la CPSI, cuyo ácido nucleico o aminoácidos se sabe que se encuentran con frecuencia alta en una población de individuos que llevan el gen que codifica una proteína que funciona normalmente, o cuyo ácido nucleico tiene función normal.

10

[0043] Las moléculas de ácido nucleico proporcionadas se pueden marcar de acuerdo con cualquier técnica conocida en la materia, tal como con radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, etiquetas de secuencia, etc. De acuerdo con otro aspecto de la invención, las moléculas de ácido nucleico contienen la transversión de C a A en la base 4340. dichas moléculas se pueden usar como sondas de oligonucleótido

15

específicas de alelo para seguir una mutación particular, por ejemplo, por una familia de sujetos.

[0044] Se pueden ensayar las muestras corporales para determinar si el gen de CPSI contiene la transversión de C a A en la base 4340. Las muestras corporales adecuadas para el ensayo incluyen las que comprenden ADN, ARN o proteína obtenida de biopsias, incluyendo biopsias de tejido hepático e intestinal; o de sangre prenatal; o tejidos

20

embrionarios, por ejemplo.

[0045] En el presente documento, se proporciona una pareja de cebadores oligonucleótidos aislados: 5'-AGCTGTTTGGCCACGGAAGCC-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-CCCAGCCTCTCTCCATCAGAAAGTAAG-3' (SEQ ID NO: 7). Estos cebadores se obtienen del exón 36 de la CPSI (el sitio del polimorfismo de la presente invención) y

25

secuencias intrónicas relacionadas (SEQ ID NO: 5) y producen un fragmento de 119 pares de bases. Se proporcionan otros cebadores derivados del exón 36 de la CPSI (el sitio del polimorfismo de la presente invención) y secuencias intrónicas relacionadas (SEQ ID NO: 5) en las SEQ ID NO: 8-10, en la figura 10, y en el ejemplo de referencia 2 (SEQ ID NO: 15 y 16).

30

[0046] Los cebadores oligonucleótidos son útiles en el diagnóstico en un sujeto del riesgo de hiperamonemia como puede resultar como una complicación o toxicidad en el BMT. Los cebadores dirigen la amplificación del polinucleótido diana antes de la secuenciación. Estos cebadores oligonucleótidos del exón 36 de la CPSI se diseñaron y produjeron basándose en la identificación de la transversión de C a A en el exón 36.

35

[0047] Además se proporcionan en el presente documento oligonucleótidos específicos de alelo aislados. También se proporcionan en el presente documento secuencias sustancialmente similares a estos. Los oligonucleótidos específicos de alelo son útiles en el diagnóstico en un sujeto del riesgo de hiperamonemia como puede resultar como una complicación o toxicidad en el BMT. Estos cebadores oligonucleótidos del exón 36 de la CPSI únicos se diseñaron produjeron basándose en la identificación de la transversión de C a A en el exón 36.

40

[0048] Las expresiones "sustancialmente complementario de" o "sustancialmente la secuencia de" se refieren a secuencias que hibridan con las secuencias proporcionadas (p. ej., SEQ ID NO: 5-10) en condiciones restrictivas y/o secuencias que tienen suficiente homología con cualquiera de las SEQ ID NO: 5-10, de modo que los oligonucleótidos específicos de alelo de la invención hibridan con la secuencia. El término "aislado" como se usa en

45

el presente documento incluye oligonucleótidos sustancialmente exentos de otros ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que pueden estar asociados, siendo dicha asociación en material celular o en un medio de síntesis. Un "polinucleótido diana" o "ácido nucleico diana" se refiere a la secuencia de ácido nucleico de interés, p. ej., un polinucleótido que codifica la CPSI. Otros cebadores que se pueden usar para la hibridación con cebadores los pueden determinar fácilmente los expertos en la materia

50

basándose en la descripción del presente documento del polimorfismo de la CPSI.

[0049] Los cebadores descritos en el presente documento abarcan oligonucleótidos de suficiente longitud y secuencia adecuada para así proporcionar el inicio de la polimerización en un número significativo de ácidos nucleicos en el locus polimórfico. El locus de la CPSI se representa esquemáticamente en la figura 5. Específicamente, el término "cebador" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente más de tres, y más preferiblemente más de 8 y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos del gen de CPSI en donde la secuencia de ADN contiene la transversión de C a A en la base 4340 respecto a la CPSI convenida en las SEQ ID

55

NO: 1 y 3. El alelo que incluye citosina (C) en la base 4340 respecto a la CPSI se denomina en el presente

documento el "alelo CPSIa", el "alelo T1405" o el "alelo que codifica la treonina". El alelo que incluye adenosina (A) en la base 4340 respecto a la CPSI se denomina en el presente documento el "alelo CPSIb", el "alelo N1405" o el "alelo que codifica arginina".

5 **[0050]** También se proporciona en el presente documento un oligonucleótido que distingue entre los alelos CPSIa y CPSIb del gen de CPSI, en donde dicho oligonucleótido hibrida con una parte de dicho gen de CPSI que incluye el nucleótido 4340 del ADNc que corresponde a dicho gen de CPSI cuando dicho nucleótido 4340 es adenosina, pero no hibrida con dicha porción de dicho gen de CPSI cuando dicho nucleótido 4340 es citosina. También se proporciona en el presente documento un oligonucleótido que distingue entre los alelos CPSIa y CPSIb del gen de
10 CPSI, en donde dicho oligonucleótido hibrida con una parte de dicho gen de CPSI que incluye el nucleótido 4340 del ADNc que corresponde a dicho gen de CPSI cuando dicho nucleótido 4340 es citosina, pero no hibrida con dicha porción de dicho gen de CPSI cuando dicho nucleótido 4340 es adenosina. Dichos oligonucleótidos tiene preferiblemente entre 10 y 30 bases de longitud. Dichos oligonucleótidos pueden comprender además opcionalmente un marcador detectable.

15

[0051] Las condiciones ambientales que favorecen la síntesis incluyen la presencia de trifosfatos de nucleósidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y una temperatura y pH adecuados. El cebador preferiblemente es monocatenario para la máxima eficacia de la amplificación, pero puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador primero se trata para separar sus cadenas antes de usarlo para preparar los productos de extensión. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión, en presencia del agente inductor para la polimerización. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, tampón y composición de nucleótidos. El cebador oligonucleótido típicamente contiene
20 12-20 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

25 **[0052]** Los cebadores descritos en el presente documento se designan como que son "sustancialmente" complementarios de cada cadena del locus genómico que se va a amplificar. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas cadenas en condiciones que permitan que el agente lleve a cabo la polimerización. En otras palabras, los cebadores deben ser suficientemente complementarios de las secuencias 5' y 3' que flanquean la transversión para hibridar con las mismas y permitir la amplificación de los
30 locus genómicos.

[0053] Los cebadores oligonucleótidos descritos en el presente documento se usan en el procedimiento de amplificación que es una reacción en cadena enzimática que produce cantidades exponenciales de locus polimórfico con respecto al número de etapas de reacción implicadas. Típicamente, un cebador es complementario de la cadena negativa (-) del locus polimórfico y el otro es complementario de la cadena positiva (+). La reasociación de
35 cebadores con ácido nucleico desnaturalizado seguido de la extensión con una enzima, tal como el fragmento grande de la ADN polimerasa I (Klenow) y nucleótidos, produce cadenas + y - recién sintetizadas que contienen la secuencia del locus polimórfico. Debido a que estas secuencias recién sintetizadas también son moldes, los ciclos repetidos de desnaturalización, reasociación de cebador y extensión, dan como resultado la producción exponencial de la región (es decir, la secuencia locus polimórfica diana) definida por los cebadores. El producto de la reacción en
40 cadena es un dúplex de ácido nucleico discreto con extremos que corresponden a los extremos de los cebadores específicos usados.

[0054] Los cebadores oligonucleótidos descritos en el presente documento se pueden preparar usando cualquier
45 procedimiento adecuado, tal como procedimientos de fosfotriéster y fosfodiéster convencionales o realizaciones automatizadas de los mismos. En una de dichas realizaciones automatizadas, se usan dietilfosforamiditas como materiales de partida y se pueden sintetizar como describen Beaucage y col., *Tetrahedron Letters* 22:1859-1862 (1981). Se describe un procedimiento para sintetizar oligonucleótidos en un soporte sólido modificado en la patente de EE.UU. n° 4.458.066.

50

[0055] Se puede usar cualquier muestra de ácido nucleico, en forma purificada o no purificada, como el ácido o ácidos nucleicos de partida, con la condición de que contengan, o se sospeche que contienen, una secuencia de ácido nucleico que contiene el locus polimórfico. Por lo tanto, el procedimiento puede amplificar, por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo ARN mensajero, en donde el ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario. En el caso de
55 que se use el ARN como molde, se usarán enzimas y/ condiciones óptimas para la transcripción inversa del molde en ADN. Además, se puede usar un híbrido de ADN-ARN que contiene una cadena de cada uno. Se puede usar así una mezcla de ácidos nucleicos, o los ácidos nucleicos producidos en una reacción de amplificación previa en el presente documento, usando los mismos o diferentes cebadores. La secuencia de ácido nucleico específica que se va a amplificar, es decir, el locus polimórfico, puede ser una fracción de una molécula mayor o puede estar presente

inicialmente como una molécula discreta, de modo que la secuencia específica constituye el ácido nucleico entero. No es necesario que la secuencia que se va a amplificar esté presente inicialmente en una forma pura; puede ser una fracción minoritaria de una mezcla compleja, tal como contenida en el ADN humano entero.

5 **[0056]** El ADN usado en el presente documento se puede extraer de una muestra corporal, tal como sangre, material tisular, preferiblemente tejido hepático, y similares, por una variedad de técnicas, tal como la descrita por Maniatis et. al. en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., pág. 280-281 (1982). Si la muestra extraída es impura, se puede tratar antes de amplificación con una cantidad de un reactivo eficaz para abrir las células, o membranas de células animales de la muestra, y exponer y/o separar la o las cadenas del o de los
10 ácidos nucleicos. Esta etapa de lisis y desnaturalización de ácido nucleico para exponer y separar las cadenas permitirá que la amplificación se produzca mucho más fácilmente.

[0057] Los trifosfatos de desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, y dTTP se añaden a la mezcla de síntesis, por separado o junto con los cebadores, en cantidades adecuadas y la solución resultante se calienta a
15 aproximadamente 90-100°C de aproximadamente 1 a 10 minutos, preferiblemente de 1 a 4 minutos. Después de este periodo de calentamiento, la solución se deja enfriar, lo cual es preferible para la hibridación del cebador. A la mezcla enfriada se añade un agente adecuado para realizar la reacción de extensión del cebador (llamada en el presente documento "agente para la polimerización") y se deja que la reacción se produzca en condiciones conocidas en la materia. El agente para la polimerización también se puede añadir junto con los otros reactivos si es
20 estable frente al calor. Esta reacción de síntesis (o amplificación) se puede producir a temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de la cual el agente de polimerización ya no funciona. Por lo tanto, por ejemplo, si se usa la ADN polimerasa como el agente, en general la temperatura no es mayor de aproximadamente 40°C. Lo más convenientemente, la reacción se produce a temperatura ambiente.

25 **[0058]** El agente para la polimerización puede ser cualquier compuesto o sistema que funcionará para llevar a cabo la síntesis de productos de extensión del cebador, incluyendo enzimas. Las enzimas adecuadas para este propósito incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*,
30 muteínas de polimerasa, transcriptasa inversa, otras enzimas, incluyendo enzimas estables frente al calor (es decir, aquellas enzimas que realizan la extensión de cebador después de someterlas a temperaturas suficientemente elevadas para producir desnaturalización), tales como la polimerasa Taq. La enzima adecuada facilitará la combinación de los nucleótidos de una forma adecuada para formar los productos de extensión del cebador que son complementarios de cada cadena de ácido nucleico del locus polimórfico. En general, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y avanza en la dirección 5' a lo largo de la cadena molde, hasta que termina la síntesis,
35 produciendo moléculas de diferentes longitudes.

[0059] La cadena recién sintetizada y su cadena de ácido nucleico complementaria formarán una molécula bicatenaria en las condiciones de hibridación descritas antes, y este híbrido se usa en etapas posteriores del procedimiento. En la siguiente etapa, la molécula bicatenaria recién sintetizada se somete a condiciones de
40 desnaturalización usando cualquiera de los procedimientos descritos antes para proporcionar moléculas monocatenarias.

[0060] Las etapas de desnaturalización, reasociación y síntesis del producto de extensión, se pueden repetir con tanta frecuencia como sea necesario para amplificar la secuencia de ácido nucleico del locus polimórfico diana, en la medida necesaria para la detección. La cantidad de la secuencia de ácido nucleico específica producida se
45 acumulará de una forma exponencial. PCR. A Practical Approach, IRL Press, Eds. McPherson y col. (1992).

[0061] Los productos de amplificación se pueden detectar por análisis de transferencia Southern usando o no sondas radiactivas. En uno de dichos procedimientos, por ejemplo, se amplifica una muestra pequeña de ADN que contiene un nivel muy bajo de la secuencia de ácido nucleico del locus polimórfico, y se analiza por una técnica de
50 transferencia Southern o similar, usando análisis de inmunotransferencia. El uso de sondas o marcadores no radiactivos es facilitado por el nivel alto de la señal amplificada. Alternativamente, las sondas usadas para detectar los productos amplificados se pueden marcar de forma detectable directa o indirectamente, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelador de metal o una enzima. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para la unión a
55 la sonda, o podrán determinarlos usando experimentación rutinaria.

[0062] Las secuencias amplificadas por los procedimientos descritos en el presente documento se puede además evaluar, detectar, clonar, secuenciar y similares, en solución o después de unión a un soporte sólido, por cualquier procedimiento aplicado normalmente a la detección de una secuencia específica de ADN tal como secuenciación por

técnica didesoxi, PCR, restricción de oligómero (Saiki y col., *Bio/Technology* 3:1008-1012 (1985)), análisis con sonda de oligonucleótido específico de alelo (ASO) (Conner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:278 (1983)), ensayos de ligado de oligonucleótido (OLA) (Landgren et. al., *Science* 241:1007, 1988), y similares. Se han revisado las técnicas moleculares para el análisis de ADN (Landgren et. al., *Science* 242:229-237, 1988).

5

[0063] Preferiblemente, el procedimiento de amplificación es por PCR, como se describe en el presente documento y en las patentes de EE.UU. nº 4.683.195; 4.683.202 y 4.965.188, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia; y como lo usan habitualmente los expertos en la materia. Se han descrito procedimientos alternativos de amplificación y también se pueden usar siempre que el locus de la CPSI amplificado por PCR usando cebadores de la invención se amplifique de forma similar por medios alternativos. Dichos sistemas de amplificación alternativos incluyen, pero no se limitan a la replicación de secuencia autosostenida, que empieza con una secuencia corta de ARN de interés y un promotor T7. La transcriptasa inversa copia el ARN en ADNc y degrada el ARN, seguido por la transcriptasa inversa que polimeriza una segunda cadena de ADN. Otra técnica de amplificación de ácido nucleico es la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA™) que usa la transcripción inversa y la ARN polimerasa T7 e incorpora dos cebadores para dirigir su esquema de ciclos. La amplificación NASABA™ puede empezar con ADN o ARN y terminar con cualquiera, y amplifica hasta aproximadamente 10^8 copias en el espacio de 60 a 90 minutos.

10

15

[0064] Alternativamente, el ácido nucleico se puede amplificar por transcripción activada por ligación (LAT). La LAT trabaja a partir de un molde monocatenario con un solo cebador que es parcialmente monocatenario y parcialmente bicatenario. La amplificación se inicia por ligación de un ADNc al oligonucleótidos promotor y en el espacio de unas horas, la amplificación es de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 veces. El sistema de replicasa QB se puede usar por unión de una secuencia de ARN llamada MDV-1 a ARN complementario de una secuencia de ADN de interés. Tras la mezcla con una muestra, el ARN híbrido encuentra su complementario entre los ARNm de la muestra y se une, activando la replicasa para copiar la secuencia junto con el marcador de interés.

20

25

[0065] Otra técnica de amplificación de ácido nucleico, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), trabaja usando dos mitades marcadas de forma diferente de una secuencia de interés, que están unidas covalentemente por ligasa en presencia de la secuencia contigua en una muestra, formando una nueva diana. La técnica de amplificación de ácido nucleico por reacción en cadena de reparación (RCR) usa dos pares de sondas oligonucleótidos complementarias y específicas de la diana, polimerasa termoestable y ligasa, y nucleótidos de ADN para amplificar geométricamente las secuencias diana. Un hueco de 2 bases separa las parejas de sondas oligos, y la RCR rellena y une el hueco, imitando la reparación de ADN normal.

30

[0066] La amplificación de ácido nucleico por activación del desplazamiento de cadena (SDA) usa un cebador corto que contiene un sitio de reconocimiento para HincII con extremo saliente corto en el extremo 5' que se une al ADN diana. Una ADN polimerasa rellena en la parte del cebador opuesta al extremo saliente con análogos de adenina que contienen azufre. Se añade HincII pero solo corta la cadena de ADN no modificada. Una ADN polimerasa que carece de actividad de 5' exonucleasa entra en el sitio de la mella y empieza a polimerizar, desplazando la cadena de cebador inicial en la dirección 3' y creando una nueva que sirve como más cebador.

35

40

[0067] La SDA produce una amplificación de más de aproximadamente 10^7 veces en 2 horas a 37°C. A diferencia de la PCR y LCR, la SDA no requiere ciclos con temperatura controlada con instrumentos. Otro sistema de amplificación útil en el procedimiento de la invención es el sistema de la QB replicasa. Aunque la PCR es el procedimiento de amplificación preferido de la invención, también se pueden usar estos otros procedimientos para amplificar el locus de la CPSI como se describe en el procedimiento de la invención. Por lo tanto, la expresión "técnica de amplificación" como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones se pretende que abarque todos los procedimientos anteriores.

45

[0068] Se describe además en el presente documento un procedimiento para el diagnóstico o para identificar un sujeto que tiene predisposición o mayor susceptibilidad (tiene riesgo de) a la hiperamonemia, que comprende secuenciar un ácido nucleico diana de una muestra de un sujeto por la secuenciación didesoxi, preferiblemente después de amplificación del ácido nucleico diana.

50

[0069] Se describe además en el presente documento un procedimiento para el diagnóstico de un sujeto que tiene predisposición o mayor susceptibilidad (tiene riesgo de) a la hiperamonemia, que comprende poner en contacto un ácido nucleico diana de una muestra de un sujeto con un reactivo que detecta la presencia del polimorfismo de CPSI, y detectar el reactivo.

55

[0070] Otro procedimiento comprende poner en contacto un ácido nucleico diana de una muestra de un sujeto con un reactivo que detecta la presencia de la transversión de C a A en la base 4340, es decir el exón, y detectar la transversión. Los expertos en la materia conocen bien una serie de procedimientos de hibridación. Muchos de ellos son útiles para llevar a cabo la invención.

5

[0071] La enfermedad venooclusiva hepática (HVOD) es una toxicidad común en el trasplante de médula ósea (BMT). Se produce en aproximadamente 20 a 40% de los pacientes y está asociada con morbilidad y mortalidad graves. La frecuencia de ambos alelos de la CPSI se ensayó en un grupo con HVOD y uno sin HVOD que se sometían a BMT, en un intento de identificar pruebas del desequilibrio. Los resultados indican que el polimorfismo de la CPSI descrito en el presente documento produce susceptibilidad a una toxicidad en el BMT. Por lo tanto, se describe en el presente documento un procedimiento de cribado en sujetos de la susceptibilidad a la toxicidad en el BMT, y en particular a la HVOD, por detección del polimorfismo de la CPSI.

[0072] Los materiales para usar en el procedimiento descrito en el presente documento son perfectamente adecuados para preparar un kit de diagnóstico. Dicho kit puede comprender un medio vehículo que está compartimentalizado para recibir de forma delimitada uno o más medios contenedores tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios contenedores uno de los elementos separados que se va a usar en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios contenedores puede comprender uno de los elementos separados para usar en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios contenedores puede comprender medios para amplificar el ADN de CPSI, comprendiendo el medio la o las enzimas y cebadores oligonucleótidos necesarios para amplificar dicho ADN diana del sujeto.

[0073] Los cebadores oligonucleótidos incluyen cebadores que tienen una secuencia seleccionada del grupo que incluye, pero no se limita a: SEQ ID NO: 6-10, o secuencias de cebadores sustancialmente complementarias o sustancialmente homólogas a las mismas. La secuencia de polinucleótido flanqueadora 5' y 3' diana tiene sustancialmente la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5, y secuencias sustancialmente complementarias u homólogas a las mismas. Otros cebadores oligonucleótidos para amplificar la CPSI serán conocidos o los podrán determinar fácilmente los expertos en la materia, dada la descripción presentada en la presente memoria.

[0074] Un kit descrito en el presente documento puede comprender además un reactivo o reactivos para extraer una muestra de ácido nucleico de una muestra biológica obtenida de un sujeto. Cualquiera de dichos reactivos, como será evidente para un experto en la materia, está contemplado que están dentro del alcance de la presente invención. A modo de ejemplo particular, un tampón de lisis adecuado para el tejido junto con una suspensión de perlas de vidrio para capturar la muestra de ácido nucleico y un tampón de elución para eluir la muestra de ácido nucleico de las perlas de vidrio, comprende reactivos para extraer una muestra de ácido nucleico de una muestra biológica obtenida de un sujeto.

[0075] Otros ejemplos incluyen productos disponibles en el comercio, como el kit GENOMIC ISOLATION KIT A.S.A.P.[™] (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), sistema de aislamiento de ADN genómico (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.), kit de purificación de ADN ELU-QUIK[™] (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.), kit de extracción de ADN (Stratagene, La Jolla, Calif.), kit de aislamiento TURBOGEN[™] (Invitrogen, San Diego, Calif.), y similares. El uso de estos kits de acuerdo con las instrucciones del fabricante en general es aceptable para la purificación del ADN antes de poner en práctica los procedimientos descritos en el presente documento.

45 C. Definiciones que afectan al polinucleótido que codifica la CPSI y polipéptidos CPSI codificados por el mismo

[0076] Se describen polinucleótidos que codifican CPSI purificados y aislados y polipéptidos de CPSI codificados por los mismos. Un polinucleótido que codifica la CPSI proporcionado en particular comprende un polinucleótido que codifica la CPSI que incluye una transversión de C a A en la base 4340, es decir en el exón 36, del gen de CPSI que cambia el código de triplete de ACC a AAC y conduce al cambio T1405N en el polipéptido de CPSI codificado. También se proporciona en particular el polipéptido de CPSI codificado que comprende el cambio T1405N. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos variantes alélicas y polipéptidos codificados por los mismos. Además, también se proporciona en el presente documento un polipéptido de CPSI biológicamente activo, así como un polinucleótido que codifica la CPSI que codifica dicho polipéptido de CPSI. Las actividades biológicas de ejemplo incluyen la actividad biológica de mediar la primera etapa del ciclo de la urea y la actividad biológica de reacción cruzada con un anticuerpo anti-CPSI.

[0077] Los polinucleótidos que codifican la CPSI y polipéptidos proporcionados tienen una amplia utilidad dada la importancia biológica del ciclo de la urea, como se conoce en la materia. A modo de ejemplo, los polinucleótidos que

codifican la CPSI y polipéptidos son útiles en la preparación de ensayos de cribado y kits de ensayo que se usan para detectar la presencia de proteínas y ácidos nucleicos de esta invención en muestras biológicas. Además, es bien conocido que los polipéptidos aislados y purificados tienen utilidad como aditivos alimentarios para el ganado y, por lo tanto, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos son útiles en la producción de polipéptidos.

5

[0078] Preferiblemente, los polinucleótidos y polipéptidos de CPSI se aíslan de fuentes de vertebrados e invertebrados. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento homólogos de CPSI, incluyendo, pero no limitado a homólogos de mamífero, levadura y bacterias. Los homólogos de mamíferos preferidos de miembros de CPSI incluyen, pero no se limita a homólogos de rata y seres humanos.

10

[0079] Las expresiones “producto génico de CPSI”, “proteína de CPSI” y “polipéptido de CPSI” se refieren a proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de aminoácidos naturales en la CPSI y que son biológicamente activas en cuanto que son capaces de mediar la síntesis de fosfato de carbamilo en el ciclo de la urea, o de reacción cruzada con anticuerpos dirigidos contra CPSI generados contra un polipéptido de CPSI.

15

[0080] Las expresiones “producto génico de CPSI”, “proteína de CPSI” y “polipéptido de CPSI” también incluyen análogos de moléculas de CPSI que presentan al menos alguna actividad biológica en común con los productos génicos de CPSI naturales. Además, los expertos en la técnica de la mutagénesis apreciarán que se pueden usar otros análogos, todavía no descritos o no descubiertos, para construir análogos de CPSI. No es necesario que un “producto génico de CPSI”, “proteína de CPSI” o “polipéptido de CPSI” comprenda toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de un producto génico de CPSI natural. Se prevé que secuencias más cortas o más largas serán útiles en el presente documento. Por lo tanto, la expresión “producto génico de CPSI” también incluye la fusión o polipéptidos y proteínas de CPSI recombinantes. Se describen en el presente documento procedimientos para preparar dichas proteínas.

20

25

[0081] Las expresiones “polinucleótido que codifica la CPSI”, “gen de CPSI”, “secuencia génica de CPSI” y “segmento génico de CPSI” se refieren a cualquier secuencia de ADN que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polinucleótido que codifica un producto génico de CPSI, proteína de CPSI o polipéptido de CPSI, como se ha definido antes. Los términos también se refieren a ARN, o secuencias de sentido contrario, compatibles con dichas secuencias de ADN. Un “polinucleótido que codifica la CPSI”, “gen de CPSI”, “secuencia génica de CPSI” y “segmento génico de CPSI” también pueden comprender cualquier combinación de secuencias de control asociadas.

30

35

[0082] La expresión “sustancialmente idéntico”, cuando se usa para definir un producto génico de CPSI o secuencia de aminoácidos de CPSI o un gen de CPSI o secuencia de ácido nucleico de CPSI, significa que una secuencia particular, por ejemplo, una secuencia mutante, varía de la secuencia de una CPSI natural en una o más eliminaciones, sustituciones o adiciones, cuyo efecto neto es retener al menos algo de actividad biológica de CPSI. Alternativamente, las secuencias análogas de ADN son “sustancialmente idénticas” a secuencias de ADN específicas descritas en el presente documento si: (a) la secuencia análoga de ADN se obtiene de regiones codificantes del gen de CPSI natural; o (b) la secuencia análoga de ADN es capaz de hibridar con secuencias de ADN de (a) en condiciones moderadamente restrictivas y que codifican el producto génico de CPSI biológicamente activo; o (c) las secuencias de ADN son degenerativas como resultado del código genético respecto de las secuencias análogas de ADN definidas en (a) y/o (b). Proteínas análogas sustancialmente idénticas serán más de aproximadamente 60% idénticas con la secuencia correspondiente de la proteína nativa. Secuencias que tienen menor grado de similitud pero actividad biológica comparable, se considera que son equivalentes. En la determinación de las secuencias de ácidos nucleicos, todas las secuencias de ácidos nucleicos objeto capaces de codificar secuencias de aminoácidos sustancialmente similares, se considera que son sustancialmente similares a una secuencia de ácido nucleico de referencia, independientemente de las diferencias en las secuencias de codones.

40

45

50

C.1. Porcentaje de similitud

[0083] El porcentaje de similitud se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando el programa de ordenador GAP, disponible en el Geneticist Computer Group de la University of Wisconsin. El programa GAP usa el procedimiento de alineamiento de Needleman y col., *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), revisado por Smith y col., *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido entre el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP

55

incluyen: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y de 0 para las no identidades) de nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y col., *Nucl. Acids. Res.* 14:6745 (1986), descrito por Schwartz y col., eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 357-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,01 para cada símbolo y cada hueco; y (3) sin penalización para huecos finales. Se describen otras técnicas de comparación en los ejemplos.

[0084] El término “homología” describe una comparación de base matemática de similitudes de secuencia, que se usa para identificar genes o proteínas con funciones o patrones similares. Por consiguiente, el término “homología” es sinónimo al término “similitud” y “porcentaje de similitud” como se ha definido antes. Por lo tanto, las frases “homología sustancial” o “similitud sustancial” tienen significados similares.

C.2. Secuencias de ácidos nucleicos

[0085] Se describe además en el presente documento el uso de genes de CPSI y productos génicos que incluyen en sus respectivas secuencias una secuencia que es esencialmente la de un gen de CPSI, o la correspondiente proteína. La expresión “una secuencia esencialmente como la de un gen de CPSI”, significa que la secuencia corresponde sustancialmente a una parte de un polipéptido de CPSI o polinucleótido que codifica la CPSI y tiene relativamente pocas bases o aminoácidos (sea ADN o proteína) que no sean idénticas a las de una proteína de CPSI o un gen de CPSI (o un equivalente biológicamente funcional, cuando se hace referencia a proteínas). La expresión “equivalente biológicamente funcional” se entiende bien en la técnica y se define además con detalle en el presente documento. Por consiguiente, las secuencias que tienen entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%; o más preferiblemente, entre aproximadamente 81% y aproximadamente 90%; o incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 91% y aproximadamente 99%; de aminoácidos que son iguales o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de una proteína de CPSI o gen de CPSI, serán secuencias que son “esencialmente las mismas”.

[0086] También se describen productos génicos de CPSI y los genes de CPSI que tienen codones funcionalmente equivalentes. La expresión “codón funcionalmente equivalente” se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los 6 codones para la arginina o serina, y también se refiere a los codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la tabla 1)

TABLA 1

35 Tabla de los códigos genéticos

Aminoácidos	Codones		
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	ACG AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

[0087] También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos

adicionales, tales como aminoácidos N o C terminales adicionales o secuencias 5' o 3', y ser todavía esencialmente como se expone en una de las secuencias descritas en el presente documento, siempre que la secuencia cumpla los criterios expuestos antes, incluyendo el mantenimiento de la actividad biológica de proteína cuando se refiere a la expresión de proteína. La adición de secuencias terminales se aplica en particular a secuencias de ácidos nucleicos que pueden incluir, por ejemplo, diferentes secuencias no codificantes flanqueadores de las partes 5' o 3' de la región codificante o puede incluir diferentes secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que aparecen dentro de los genes.

[0088] Se describe también además el uso de segmentos de ADN que son complementarios o esencialmente complementarios, de las secuencias expuestas en esta memoria descriptiva. Las secuencias de ácidos nucleicos que son "complementarias" son aquellas que dan apareamiento de bases de acuerdo con las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias complementarias" significa secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente complementarias, como puede evaluarse por la misma comparación de nucleótidos expuesta antes, o como se ha definido, siendo capaz de hibridar con el segmento de ácido nucleico en cuestión en condiciones relativamente restrictivas tales como las descritas en el presente documento. Un ejemplo particular de un segmento de ácido nucleico complementario contemplado es un oligonucleótido de sentido contrario.

[0089] A la hibridación de ácidos nucleicos le afectarán condiciones tales como la concentración salina, temperatura o disolventes orgánicos, además de la composición de bases, la longitud de las cadenas complementarias, y el número de apareamientos erróneos de bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos que hibridan, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Las condiciones de temperatura restrictivas en general incluirán temperaturas superiores a 30°C, típicamente superiores a 37°C, y preferiblemente superiores a 45°C. Las condiciones salinas restrictivas en general serán menores que 1.000 mM, típicamente menores que 500 mM y preferiblemente menores que 200 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medición de cualquier parámetro individual (véase, p. ej., Wetmur & Davidson, *J. Mol. Biol.* 31:349-370 (1968)).

[0090] Las secuencias de sonda también pueden hibridar específicamente con el ADN dúplex en determinadas condiciones para formar tríplex u otros complejos de ADN de orden superior. La preparación de dichas sondas y las condiciones de hibridación adecuadas son bien conocidas en la técnica.

[0091] Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que se ha aislado exenta de ADN genómico total de una especie particular. Además, un segmento de ADN que codifica un polipéptido de CPSI se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias que codifican la CPSI, que se ha aislado de o se ha purificado del ADN genómico total de una especie fuente, tal como *Homo sapiens*. Están incluidos dentro de la expresión "segmento de ADN" segmentos de ADN y fragmentos menores de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares.

[0092] Igualmente, un segmento de ADN que comprende un gen de CPSI aislado o purificado, se refiere a un segmento de ADN incluyendo secuencias que codifican la CPSI, aislado sustancialmente de otros genes o secuencias que codifican proteínas que se encuentran de forma natural. En relación con esto, el término "gen" se usa para simplificar, para referirse a una proteína funcional, polipéptido o unidad que codifica péptido. Como entenderán los expertos en la materia, este término funcional incluyen tanto secuencias genómicas como secuencias de ADNc. "Sustancialmente aislado de otras secuencias codificantes" significa que el gen de interés, en este caso, el gen de CPSI, forma la parte significativa de la región codificante del segmento de ADN, y que el segmento de ADN no contiene partes grandes de ADN codificante que se encuentra de forma natural, tal como fragmentos de cromosomas grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de ADNc. Por supuesto, estos se refiere al segmento de ADN como se aísla originalmente, y no excluye genes o regiones no codificantes añadidas posteriormente al segmento por la mano del hombre.

[0093] Se describen además en el presente documento, segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican un polipéptido de CPSI que incluye en su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14. Se describen además en el presente documento segmentos de ADN aislados que se refieren a la invención y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican una proteína que incluye en su secuencia de aminoácidos la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CPSI que corresponde a tejidos humanos.

[0094] También se entenderá que la descripción no está limitada a las secuencias particulares de ácidos nucleicos y aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-4 y 11-14. Los vectores recombinantes y segmentos de ADN aislados pueden por lo tanto incluir de distinto modo la propia región que codifica el polipéptido de CPSI, incluir regiones codificantes que llevan alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región codificante básica, o incluir polipéptidos más largos codificados que, no obstante, incluyen regiones que codifican el polipéptido de CPSI o pueden codificar proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales, que tienen secuencias de aminoácidos variantes.

[0095] Se describen además en el presente documento, segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que codifican una proteína o péptido que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14. Naturalmente, cuando el segmento de ADN o vector codifica un producto génico de CPSI de longitud completa, la secuencia de ácido nucleico más preferida es aquella que se expone esencialmente en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13 y que codifica una proteína que presenta actividad en el ciclo de la urea, como se puede determinar, por ejemplo, por ensayos colorimétricos para detectar la producción de fosfato de carbonilo a partir de amoniaco, como se describe en el presente documento en el ejemplo 1.

[0096] La expresión “una secuencia esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14” significa que la secuencia corresponde sustancialmente a una parte de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14 y tiene relativamente pocos aminoácidos que no son idénticos a, o un equivalente biológicamente funcional de los aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14. La expresión “equivalente biológicamente funcional” se entiende bien en la técnica y se define además con detalle en el presente documento. Por consiguiente, las secuencias que tienen entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%; o más preferiblemente, entre aproximadamente 81% y aproximadamente 90%; o incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 91% y aproximadamente 99%; de aminoácidos que son iguales o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14, serán secuencias con “una secuencia esencialmente como se expone en las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14”.

[0097] Se describen además en el presente documento procedimientos de terapia génica que usan segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican una proteína que incluye dentro de la secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14, secuencias que incluyen las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14 que se obtienen de tejido humano. Se describe además en el presente documento secuencias de ADN aisladas y vectores de ADN recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican una proteína que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos la secuencia de aminoácidos de la proteína de CPSI de tejido hepático humano.

[0098] Se describen además en el presente documento, segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incluyen en su secuencia una secuencia de ácido nucleico esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13. La expresión “una secuencia esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13” se usa en el mismo sentido descrito antes y significa que la secuencia de ácido nucleico corresponde sustancialmente a una parte de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13, respectivamente, y tiene relativamente pocos codones que no son idénticos, o funcionalmente equivalentes, a los codones de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13, respectivamente. De nuevo, los segmentos de ADN que codifican productos génicos que presentan actividad en el ciclo de la urea, reacción cruzada con un anticuerpo dirigido contra la CPSI, u otra actividad biológica del producto génico de CPSI, serán los más preferidos. La expresión “codón funcionalmente equivalente” se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los 6 codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la tabla 1).

[0099] Los segmentos de ácidos nucleicos descritos en el presente documento, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, se pueden combinar con otras secuencias de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede usar un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada preferiblemente la longitud total por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo de ADN recombinante previsto. Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de ácido nucleico que incluyen un tramo corto complementario de una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13, respectivamente, tal como de aproximadamente 10 nucleótidos, y que tienen hasta 10.000 o 5.000 pares de bases de longitud, siendo preferidos los segmentos de 3.000 en algunos casos. Los segmentos de ADN con longitudes totales de aproximadamente 1.000, 500, 200, 100 y aproximadamente 50 pares de base de longitud, también está

contemplado que son útiles.

[0100] Los segmentos de ADN descritos en el presente documento abarcan proteínas y péptidos de CPSI equivalentes biológicamente funcionales. Dichas secuencias pueden surgir como una consecuencia del exceso de 5 codones y equivalencias funcionales que se sabe que se producen de forma natural en las secuencias de ácidos nucleicos y las proteínas así codificadas. Alternativamente, las proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes se pueden crear mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que se pueden diseñar cambios en la estructura de proteína, basándose en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se cambian, p. ej., sustitución de Ile y Leu en los aminoácidos 4 y 5 de las SEQ ID NO: 11-14. Los cambios diseñados por el 10 hombre se pueden introducir mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis de sitio dirigido, p. ej., para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína o ensayar mutantes de CPSI con el fin de examinar la actividad en el ciclo de la urea, u otra actividad a nivel molecular.

[0101] Si se desea, también se pueden preparar proteínas y péptidos de fusión, p. ej., donde la región que codifica 15 la CPSI se alinea con la misma unidad de expresión con otras proteínas y péptidos que tienen funciones deseadas, tales como para propósitos de purificación o inmunodetección (p. ej., proteínas que se pueden purificar por cromatografía de afinidad y regiones que codifican marcadores enzimáticos, respectivamente).

[0102] Los vectores recombinantes forman aspectos adicionales importantes descritos en el presente documento. 20 Se contempla que los vectores particularmente útiles son aquellos vectores en los que la parte codificante del segmento de ADN se pone bajo el control de un promotor. El promotor puede estar en forma del promotor que está asociado de forma natural con el gen de CPSI, p. ej., en tejidos de mamífero, como se puede obtener aislando las secuencias 5' no codificantes situadas en dirección 5' de la secuencia codificante o exón, por ejemplo, usando tecnología de PCR y/o clonación recombinante, en relación con las composiciones descritas en el presente 25 documento.

[0103] En otras realizaciones, se contempla que se ganarán determinadas ventajas poniendo el segmento de ADN codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo. Como se usa en el presente documento, un 30 promotor recombinante o heterólogo se pretende que se refiera a un promotor que normalmente está asociado con un gen de CPSI en su entorno natural. Dichos promotores pueden incluir promotores aislados de células bacterianas, víricas, eucariotas o de mamífero. De forma natural, será importante usar un promotor que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula elegido para la expresión. El uso del promotor y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas, en general es conocido para los expertos en la materia de biología molecular, por ejemplo, véase Sambrook y col., 1989, incorporado en el presente documento por 35 referencia. Los promotores usados pueden ser constitutivos o inducibles, y se pueden usar en las condiciones adecuadas para dirigir niveles de expresión altos del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes. Los sistemas de promotores adecuados proporcionados para usar en expresión de alto nivel incluyen, pero no se limitan al promotor del virus vaccinia y el promotor de baculovirus.

[0104] Alternativamente, se describe en el presente documento un vector de expresión que comprende un 40 polinucleótido que codifica un polipéptido de CPSI que tiene actividad en el ciclo de la urea, reacción cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI, u otra actividad biológica de acuerdo con la presente descripción. También preferiblemente, un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un polinucleótido que codifica un producto génico de CPSI humana. Más preferiblemente, un vector de expresión descrito en el presente 45 documento comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14. Más preferiblemente, un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13.

[0105] Incluso más preferiblemente, un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un 50 polinucleótido operativamente unido a un potenciador-promotor. Más preferiblemente todavía, un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un polinucleótido operativamente unido a un promotor procariota. Alternativamente, un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un polinucleótido 55 operativamente unido a un potenciador-promotor que es un promotor eucariota, y el vector de expresión comprende además una señal de poliadenilación que está situada 3' del aminoácido carboxi terminal y dentro de una unidad de transcripción del polipéptido codificado.

[0106] En otra realización más descrita en el presente documento, se proporciona una célula hospedante

recombinante transfectada con un polinucleótido que codifica un polipéptido de CPSI que tiene actividad en la modulación del ciclo de la urea, reactividad cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI u otra actividad biológica de acuerdo con la presente invención. Las SEQ ID NO: 1-4 y 11-14 exponen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de un vertebrado de ejemplo, un ser humano. También se describen en el presente documento 5 polinucleótidos homólogos o biológicamente equivalentes y polipéptidos de CPSI encontrados en otros vertebrados, incluyendo la rata. La presente invención también proporciona polinucleótidos homólogos o biológicamente equivalentes y polipéptidos de CPSI encontrados en invertebrados, incluyendo bacterias y levaduras.

[0107] Preferiblemente, una célula hospedante recombinante descrita en el presente documento se transfecta con el polinucleótido que codifica el polipéptido de CPSI humana. Más preferiblemente, una célula hospedante recombinante descrita en la presente invención se transfecta con una secuencia de polinucleótido de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13. Incluso más preferiblemente, una célula hospedante descrita en el presente documento es una célula hospedante eucariota. Todavía más preferiblemente, una célula hospedante recombinante descrita en el presente documento es una célula de vertebrado. Preferiblemente, una célula hospedante 15 recombinante descrita en el presente documento es una célula de mamífero.

[0108] En otro aspecto, una célula hospedante recombinante descrita en el presente documento es una célula hospedante procariota. Preferiblemente, una célula hospedante recombinante descrita en el presente documento es una célula bacteriana, preferiblemente una cepa de *Escherichia coli*. Más preferiblemente, una célula hospedante recombinante comprende un polinucleótido bajo el control transcripcional de señales reguladoras funcionales en la 20 célula hospedante recombinante, en la que las señales reguladoras controlan de forma adecuada la expresión del polipéptido de CPSI de forma que permiten toda modificación transcripcional y postranscripcional necesaria.

[0109] Se describe además en el presente documento un procedimiento para preparar un polipéptido de CPSI que comprende transfectar una célula con polinucleótido que codifica un polipéptido de CPSI que tiene actividad en el ciclo de la urea, reacción cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI u otra actividad biológica, de acuerdo con la presente invención, para producir una célula hospedante transformada; y mantener la célula hospedante transformada en condiciones biológicas suficientes para la expresión del polipéptido. Más preferiblemente, la célula hospedante transformada es una célula eucariota. Más preferiblemente todavía, la célula eucariota es una célula de 30 vertebrado. Alternativamente, la célula hospedante es una célula procariota. Más preferiblemente, la célula procariota es una célula bacteriana de *Escherichia coli*. Incluso más preferiblemente, un polinucleótido transfectado en la célula transformada comprende una secuencia de bases de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13. Las SEQ ID NO: 1-4 y 11-14 exponen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de un vertebrado de ejemplo, un ser humano. También se describen en el presente documento polinucleótidos y polipéptidos de CPSI biológicamente equivalentes encontrados en otros vertebrados, en particular en vertebrados de sangre caliente, y 35 más en particular la rata. También se describen en el presente documento polinucleótidos homólogos o biológicamente equivalentes y polipéptidos de CPSI encontrados en invertebrados, incluyendo bacterias y levaduras.

[0110] Como se ha mencionado antes, en relación con las realizaciones de expresión para preparar proteínas y péptidos de CPSI recombinantes, se contempla que se usarán con más frecuencia segmentos de ADN más largos, siendo los más preferidos segmentos de ADN que codifican la proteína de CPSI entera, dominios funcionales o sus productos de escisión. Sin embargo, se apreciará que el uso de segmentos de ADN más cortos para dirigir la expresión de péptidos de CPSI o regiones centrales epitópicas, como pueden usarse para generar anticuerpos dirigidos contra CPSI, también están dentro del alcance de la invención. 45

[0111] Se contempla que son particularmente útiles los segmentos de ADN que codifican antígenos peptídicos de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o más, preferiblemente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. Los segmentos de ADN que codifican péptidos en general tendrán una longitud codificante mínima del orden de aproximadamente 45 a aproximadamente 150, o a 50 aproximadamente 90 nucleótidos. Los segmentos de ADN que codifican proteínas de longitud completa pueden tener una longitud codificante mínima del orden de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 4.600 nucleótidos para una proteína de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 12 y 14.

[0112] Naturalmente, se describen en el presente documento segmentos de ADN que son complementarios, o esencialmente complementarios, de las secuencias expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13. Las expresiones "complementario" y "esencialmente complementario" son como se han definido antes. Excepto las regiones intrónicas o flanqueadoras, cuyos detalles se describen de forma gráfica en la figura 9, y que permiten la degeneración del código genético, las secuencias que tienen entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%; o más preferiblemente, entre aproximadamente 81% y aproximadamente 90%; o incluso más preferiblemente,

entre aproximadamente 91% y aproximadamente 99% de nucleótidos que son iguales o funcionalmente equivalentes (es decir, codifican el mismo aminoácido) a los nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13, serán secuencias que son “una secuencia esencialmente como la expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13”. Las secuencias que son esencialmente las mismas que las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13 también se pueden definir funcionalmente como secuencias que son capaces de hibridar con un segmento de ácido nucleico que contiene el complemento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13, en condiciones relativamente restrictivas. Las condiciones de hibridación relativamente restrictivas se describen en el presente documento y serán bien conocidas para los expertos en la técnica.

10 C.3. Equivalentes biológicamente funcionales

[0113] Como se ha mencionado antes, se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de las proteínas y péptidos de CPSI descritos en el presente documento y obtener todavía una molécula que tiene características similares o deseables de otra forma. Por ejemplo, algunos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad interactiva con estructuras tal como, por ejemplo, en el núcleo de una célula. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define esta actividad funcional biológica de la proteína, se pueden hacer algunas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína (o, por supuesto, su secuencia de ADN codificante subyacente) y no obstante obtener una proteína con propiedades similares o incluso compensatorias (p. ej., antagonistas frente a agonistas). Por lo tanto, los autores de la invención contemplan que se pueden hacer diferentes cambios en la secuencia de las proteínas y péptidos de CPSI (o ADN subyacente) sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

[0114] Los expertos en la materia entienden bien que es inherente a la definición de una proteína o péptido equivalente biológicamente funcional, el concepto de que hay un límite en el número de cambio que se pueden hacer dentro de una parte definida de la molécula y producir todavía una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Por lo tanto, los péptidos equivalentes biológicamente funcionales se definen en el presente documento como aquellos péptidos en los que algunos, no la mayoría o todos, de los aminoácidos pueden estar sustituidos. Por supuesto, se puede hacer fácilmente una pluralidad de proteínas/péptidos distintos con diferentes sustituciones y usar de acuerdo con la descripción del presente documento.

[0115] También se entiende bien que cuando algunos restos se muestra que son particularmente importantes para las propiedades biológicas o estructurales de una proteína o péptido, p. ej., restos en sitios activos, dichos restos en general no se pueden intercambiar. Este es el caso como se describe en el presente documento, donde cualquier cambio, por ejemplo, en los dominios de fosforilación de un polipéptido de CPSI, podría producir una pérdida de un aspecto de la utilidad del péptido resultante de la presente invención.

[0116] Las sustituciones de aminoácidos, tales como las que se pueden usar en la modificación de proteínas y péptidos de CPSI descritos en el presente documento, en general se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos pone de manifiesto que la arginina, lisina e histidina son todos restos con carga positiva; que la alanina, glicina y serina son todos de tamaño similar; y que la fenilalanina, triptófano y tirosina tienen todos en general una forma similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, la arginina, lisina e histidina; la alanina, glicina y serina; y la fenilalanina, triptófano y tirosina, se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

[0117] Al hacer dichos cambios, debe tenerse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. Cada aminoácido tiene asignado un índice hidropático basado en su hidrofobicidad y características de carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

[0118] La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir la función biológica interactiva a una proteína se entiende en general en la técnica (Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982), incorporado en el presente documento por referencia). Se sabe que algunos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y conservar todavía una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de 2 del valor original, se prefieren en particular aquellos que están dentro de 1 del valor original, y son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de 0,5 del valor original.

[0119] También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer de forma eficaz basándose en la hidrofiliidad. La patente de EE.UU. n.º 4.554.101, incorporada en el presente documento por referencia, establece que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína. Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y obtener todavía una proteína biológicamente equivalente.

[0120] Como se describe en la patente de EE.UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5±1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

[0121] Al hacer cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de 2 del valor original, se prefieren en particular aquellos que están dentro de 1 del valor original, y son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de 0,5 del valor original.

[0122] Aunque la descripción se ha centrado en polipéptidos funcionalmente equivalentes que surgen de cambios de aminoácidos, se apreciará que estos cambios se pueden realizar por la alteración del ADN codificante, teniendo en cuenta también que el código genético es degenerado y que dos o más codones pueden codificar el mismo aminoácido.

C.4. Técnicas de modificación de secuencias

[0123] Las modificaciones en las proteínas y péptidos de CPSI descritas en el presente documento, se pueden llevar a cabo usando técnicas tales como la mutagénesis de sitio dirigido. La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil para preparar péptidos individuales o proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales, mediante mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica proporciona además una capacidad fácil para preparar y ensayar variantes de secuencias, por ejemplo, que incorporan una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis específica de sitio permite producir mutantes mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión por eliminación que se atraviesa. Típicamente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 30 nucleótidos de longitud, siendo alterados aproximadamente de 5 a 10 restos en ambos lados de la unión de la secuencia que se altera.

[0124] En general, la técnica de la mutagénesis de sitio específico es bien conocida en la técnica, e ilustrada en publicaciones (p. ej., Adelman y col., 1983). Como se apreciará, la técnica típicamente usa un vector fago que existe tanto una forma monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis de sitio dirigido incluyen vectores tales como el fago M13 (Messing y col., 1981). Estos fagos se obtienen fácilmente en el comercio y su uso en general es conocido para los expertos en la materia. También se usan de forma rutinaria plásmidos bicatenarios en la mutagénesis de sitio dirigido, que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

[0125] En general, la mutagénesis de sitio dirigido de acuerdo con este documento se lleva a cabo primero obteniendo un vector monocatenario o fundiendo aparte dos cadenas de un vector bicatenario que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica, por ejemplo, un polipéptido de CPSI humana. Un cebador oligonucleótido que lleva la secuencia mutada deseada se prepara en general de forma sintética, por ejemplo, por el procedimiento de Crea y col. (1978). Después el cebador se reasocia con el vector monocatenario, y se somete a enzimas polimerizadoras de ADN tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de E. coli, con el fin de completar la síntesis de la cadena que lleva la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena lleva la mutación deseada. Este vector heterodúplex después se usa para transformar células adecuadas, tales como células de E. coli y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada.

[0126] La preparación de variantes de secuencia del gen seleccionado usando la mutagénesis de sitio dirigido se proporciona como un medio de producción del polipéptido de CPSI potencialmente útil u otras especies que tienen

actividad en el ciclo de la urea, y no se pretende que sea limitante puesto que hay otras formas en las que se pueden obtener variantes de secuencia de estos péptidos. Por ejemplo, vectores recombinantes que codifican los genes deseados se pueden tratar con agentes mutagénicos para obtener variantes de secuencia (véase, p. ej. un procedimiento descrito por Eichenlaub, 1979) para la mutagénesis de ADN plasmídico usando hidroxilamina.

5

C.5. Otros equivalentes estructurales

[0127] Además de los compuestos de peptidilo de CPSI descritos en el presente documento, los autores de la invención también contemplan que se pueden formular otros compuestos estéricamente similares para imitar las partes clave de la estructura de péptido. Dichos compuestos se pueden usar de la misma forma que los péptidos de la invención y por lo tanto también son equivalentes funcionales. La generación de un equivalente funcional estructural se puede lograr por técnicas de modelización y diseño químico conocidas para los expertos en la materia.

D. Introducción de productos génicos

15

[0128] Cuando se usa el propio gen para introducir los productos génicos, un procedimiento conveniente de introducción será mediante el uso de un vector recombinante que incorpore el gen deseado, junto con sus secuencias de control asociadas. La preparación de vectores recombinantes es bien conocida para los expertos en la materia y se describe en muchas referencias, tales como, por ejemplo, Sambrook y col. (1989), incorporado específicamente en el presente documento por referencia.

20

[0129] En los vectores, se entiende que las secuencias que codifican el ADN que se va a expresar, en este caso las que codifican los productos génicos de CPSI, se colocan adyacentes a y bajo el control de un promotor. Se entiende en la técnica que para llevar una secuencia codificante bajo el control de dicho promotor, en general se coloca el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional del producto génico que se va a expresar, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos "en la dirección 3'" (es decir, 3' de) el promotor elegido. También se puede desear incorporar en la unidad transcripcional del vector un sitio de poliadenilación adecuado (p. ej., 5'-AATAAA-3'), si no hay uno contenido en el ADN insertado original. Típicamente, estos sitios de adición de poliA se colocan aproximadamente de 30 a 2000 nucleótidos "en la dirección 3'" de la secuencia codificante en una posición antes de la terminación de la transcripción.

25

[0130] Aunque se preferirá el uso de secuencias de control del gen específico (es decir, un promotor de CPSI para un gen de CPSI), no hay razón por la que no se puedan usar otras secuencias de control, siempre que sean compatibles con el genotipo de la célula que se va a tratar. Por lo tanto, se pueden mencionar otros promotores útiles a modo de ejemplo, incluyendo, p. ej., un promotor temprano de SV40, un promotor de repetición terminal larga de retrovirus, un promotor de actina, un promotor de choque térmico, un promotor de metalotioneína, y similares.

35

[0131] Como se conoce en la materia, un promotor es una región de una molécula de ADN típicamente dentro de aproximadamente 100 pares de nucleótidos en frente de (en la dirección 5') del punto en el que empieza la transcripción (es decir, un sitio de inicio de la transcripción). Esta región típicamente contiene varios tipos de elementos de secuencia de ADN que están localizados en posiciones relativas similares en diferentes genes. Como se usa en el presente documento, el término "promotor" incluye lo que se denomina en la materia una región de promotor en la dirección 5', una región de promotor, o un promotor de una unidad de transcripción para la ARN polimerasa II eucariota generalizada.

45

[0132] Otro tipo de elemento de secuencia regulador de la transcripción discreto es un potenciador. Un potenciador proporciona especificidad de tiempo, situación y nivel de expresión para una región codificante particular (p. ej., gen). Una función principal de un potenciador es aumentar el nivel de transcripción de una secuencia codificante en una célula que contiene uno o más factores de transcripción que se unen al potenciador. A diferencia de un promotor, un potenciador puede funcionar cuando está situado a distancias variables de los sitios de inicio de la transcripción, siempre que esté presente un promotor.

50

[0133] Como se usa en el presente documento, la frase "potenciador-promotor" significa una unida compuesta que contiene tanto elementos potenciadores como promotores. Un potenciador-promotor está operativamente unido a una secuencia codificante que codifica al menos un producto génico. Como se usa en el presente documento, la frase "operativamente unido" significa que un potenciador-promotor está conectado a una secuencia codificante de modo que la transcripción de esa secuencia codificante es controlada y regulada por este potenciador-promotor. Los medios para unir operativamente un potenciador-promotor a una secuencia codificante son bien conocidos en la

55

materia. Como también es bien conocido en la materia, la orientación y situación exactas con respecto a una secuencia codificante cuya transcripción es controlada, depende, entre otros, de la naturaleza específica del potenciador-promotor. Por lo tanto, un promotor mínimo caja TATA típicamente está situado de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 pares de bases en la dirección 5' de un sitio de inicio de la transcripción y típicamente un elemento promotor en la dirección 5' está situado de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 pares de bases en la dirección 5' de un sitio de inicio de la transcripción. En cambio, un potenciador puede estar situado en la dirección 3' del sitio de inicio y puede estar a una distancia considerable de este sitio.

[0134] Un potenciador-promotor usado en una construcción de vector descrita en el presente documento puede ser cualquier potenciador-promotor que dirija la expresión en una célula que se va a transfectar. Usando un potenciador-promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el patrón de expresión del producto génico.

[0135] Para introducir, por ejemplo, el gen de CPSI humana incluyendo variantes alélicas del mismo, se propone que se deseará preferiblemente usar una construcción de vector que suministre el gen deseado a las células afectadas. Esto requerirá en general, por supuesto, que la construcción sea suministrada a las células diana, por ejemplo, células hepáticas de mamífero. Se propone que esto se puede lograr lo más preferiblemente por introducción del gen deseado mediante el uso de un vector vírico para llevar la secuencia de CPSI para infectar las células de forma eficaz. Estos vectores preferiblemente serán un vector adenovírico, retrovírico, de virus vaccinia o adenoasociado. Estos vectores son preferidos porque se han usado con éxito para suministrar secuencias deseadas a células y tienden a tener una eficacia de infección alta. Las construcciones de vector-gen de CPSI adecuadas están adaptadas para la administración como composiciones farmacéuticas, como se describe en el presente documento más adelante.

[0136] Los promotores víricos usados habitualmente para vectores de expresión se obtienen de poliovirus, citomegalovirus, adenovirus 2 y virus de simio 40 (SV40). Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 son particularmente útiles, porque ambos se obtienen fácilmente del virus en forma de un fragmento que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. También se pueden usar fragmentos de SV40 más pequeños o más grandes, con la condición de que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio Hind III hacia el sitio Bgl I situado en el origen de replicación vírico. Además, se puede, y a menudo es conveniente, usar las secuencias de promotor o control normalmente asociadas con la secuencia de gen deseado, con la condición de que dichas secuencias de control sean compatibles con los sistemas de células hospedantes.

[0137] El origen de replicación se puede proporcionar por la construcción del vector para que incluya un origen exógeno, tal como puede derivarse de SV40 u otra fuente vírica (p. ej., Poliovirus, Adeno, VSV, BPV), o se puede proporcionar mediante el mecanismo de replicación de cromosomas de la célula hospedante. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula hospedante, a menudo este último es suficiente.

[0138] Cuando se usa el propio gen de CPSI, será más conveniente simplemente usar un gen de CPSI de tipo natural directamente. El gen de CPSI puede comprender, por lo tanto, el alelo que codifica treonina, de modo que el aminoácido 1405 del polipéptido codificado comprende treonina. Alternativamente, el gen de CPSI comprende el alelo que codifica arginina de modo que el aminoácido 1405 del polipéptido codificado comprende arginina. Además, se prevé que se pueden usar exclusivamente determinadas regiones de un gen de CPSI sin usar un gen de CPSI de tipo natural entero o una variante alélica entera del mismo. Se propone que finalmente será preferible usar la menor región necesaria para modular el ciclo de la urea, de modo que no se introduce ADN innecesario en las células que reciben una construcción de gen de CPSI. Técnicas bien conocidas para los expertos en la materia, tales como el uso de enzimas de restricción, permitirán la generación de regiones pequeñas de un gen de CPSI de ejemplo. La capacidad de estas regiones para modular el ciclo de la urea se puede determinar fácilmente mediante ensayos descritos en los ejemplos. En general, las técnicas para evaluar la modulación del ciclo de la urea son conocidas en la materia.

D.1. Animales transgénicos

[0139] También se proporciona en el alcance de la presente invención la preparación de un animal no humano transgénico que expresa un gen de CPSI de la presente invención, o en el cual la expresión de un gen de CPSI está "inactivada". Los animales no humanos transgénicos expresan la forma T1405 de la CPSI o la forma N1405 de la CPSI. Un animal transgénico preferido es un ratón.

[0140] Se conocen técnicas para preparar animales transgénicos en la materia. Se describen técnicas de ejemplo

en la patente de EE.UU. nº 5.489.742 (ratas transgénicas); patentes de EE.UU. nº 4.736.866, 5.550.316, 5.614.396, 5.625.125 y 5.648.061 (ratones transgénicos); patente de EE.UU. nº 5.573.933 (cerdos transgénicos); patente de EE.UU. nº 5.162.215 (especies de aves transgénicas) y patente de EE.UU. nº 5.741.957 (especies bovinas transgénicas), cuyo contenido entero de cada una de ellas se incorpora en el presente documento por referencia.

5

[0141] Con respecto a un procedimiento de ejemplo para preparar un ratón transgénico, se inyectan secuencias de ADN o segmentos de ADN sintéticos o recombinantes clonados que codifica un producto génico de CPSI, en óvulos de ratón fertilizados. Los óvulos inyectados se implantan en hembras pseudopreñadas y se desarrollan a término para proporcionar ratones transgénicos cuyas células expresan un producto génico de CPSI. Preferiblemente, las

10

secuencias inyectadas son construcciones que tienen secuencias de promotor conectadas de modo que expresan la proteína deseada en células hepáticas en los ratones transgénicos.

D.2. Terapia génica

[0142] Los genes de CPSI se pueden usar para terapia génica de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de terapia génica de ejemplo, incluyendo la transfección liposómica de ácidos nucleicos en células hospedantes, se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.279.833; 5.286.634; 5.399.346; 5.646.008; 5.651.964; 5.641.484; y 5.643.567, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

[0143] Brevemente, se describe la terapia génica de CPSI dirigida a la modulación del ciclo de la urea en una célula diana. Las células diana incluyen, pero no se limitan a células hepáticas y células intestinales. En una realización, un procedimiento terapéutico de la presente invención proporciona un procedimiento para modular el ciclo de la urea en una célula, que comprende las etapas de: (a) suministrar a la célula una cantidad eficaz de una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de CPSI que modula el ciclo de la

25

urea; y (b) mantener la célula en condiciones suficientes para la expresión de dicho polipéptido.

[0144] El suministro se lleva a cabo preferiblemente inyectando la molécula de ADN en la célula. Cuando la célula está en un sujeto, el suministro preferiblemente es la administración de la molécula de ADN en el sistema circulatorio del sujeto. En una realización preferida, la administración comprende las etapas de: (a) proporcionar un vehículo que

30

contiene la molécula de ADN; y (b) administrar el vehículo al sujeto.

[0145] Un vehículo preferiblemente es una célula transformada o transfectada con la molécula de ADN o una célula transfectada derivada de dicha célula transformada o transfectada. Una célula transformada o transfectada preferida y de ejemplo es una célula hepática. Se han expuesto antes medios para transformar o transfectar una

35

célula con una molécula de ADN de la presente invención.

[0146] Alternativamente, el vehículo es un virus o un anticuerpo que infecta o inmunorreacciona específicamente con un antígeno del tumor. Los retrovirus usados para suministrar las construcciones a los tejidos diana del hospedante, en general son virus, en los que se ha inactivado la 3'-LTR (región de transferencia lineal). Es decir, estas son 3'-LTR sin potenciador, a menudo denominadas SIN (virus autoinactivadores) porque después de infección productiva en la célula del hospedante, la 3'-LTR se transfiere al extremo 5' y ambas LTR del virus son inactivas con respecto a la actividad transcripcional. Un uso de estos virus bien conocidos por los expertos en la materia, es la clonación de genes para los que se insertan elementos reguladores del gen clonado en el espacio entre las dos LTR. Una ventaja del sistema de infección vírico es que permite un nivel muy alto de infección en la

45

célula receptora adecuada.

[0147] Se han usado anticuerpos para dirigir y suministrar moléculas de ADN. Un conjugado de poli-L-lisina (NPLL)-anticuerpo modificado en el extremo N forma fácilmente un complejo con ADN plasmídico. Se usó un complejo de anticuerpos monoclonales contra una trombomodulina de superficie celular conjugada con NPLL para dirigir un ADN plasmídico extraño a una línea de células endoteliales de pulmón de ratón que expresan antígeno y al pulmón de ratón. Estas células endoteliales a las que se dirigía expresaban el producto codificado por este ADN extraño.

50

dirigir un ADN plasmídico extraño a una línea de células endoteliales de pulmón de ratón que expresan antígeno y al pulmón de ratón. Estas células endoteliales a las que se dirigía expresaban el producto codificado por este ADN extraño.

[0148] También se prevé que esta realización, que no es una realización de acuerdo con la presente invención, se puede practicar usando vectores víricos o fagos alternativos, incluyendo vectores retrovíricos y virus vaccinia, cuyo genoma se ha manipulado de formas alternativas para hacer al virus no patógeno. Los procedimientos para crear dicha mutación vírica se exponen con detalle en la patente de EE.UU. nº 4.769.331, incorporada en el presente documento por referencia.

55

documento por referencia.

[0149] A modo de ejemplo específico, un polinucleótido que codifica la CPSI humana o un homólogo de polinucleótido que codifica la CPSI de otro vertebrado de sangre caliente o un homólogo que codifica la CPSI de una fuente de animal invertebrado, tal como bacterias o levaduras, se introduce en células hepáticas aisladas u otras células relevantes. La reinyección de las células que llevan transgén en el hígado u otros tejidos relevantes proporciona un tratamiento para la susceptibilidad de la hiperamonemia u otras enfermedades relevantes en seres humanos y animales.

E. Terapia de complementación

[0150] Además de su función en la eliminación de nitrógeno, el ciclo de la urea es la fuente intrínseca del cuerpo de arginina que actúa como un precursor del óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador. Se proporcionan procedimientos de tratamiento de la función subóptima del ciclo de la urea, de acuerdo con la presente invención, que incluyen el tratamiento por administración de precursores del óxido nítrico tales como la citrulina. Típicamente, la función subóptima del ciclo de la urea está asociada con el polimorfismo descrito en el presente documento. La función subóptima del ciclo de la urea puede comprender además hiperamonemia o una producción de arginina disminuida.

[0151] El sujeto que se va a tratar puede padecer un trastorno asociado con la función subóptima del ciclo de la urea. Dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a trastornos que implican tejido hepático y/o intestinal deteriorado o dañado. Los trastornos representativos incluyen, pero no se limitan a hepatitis (incluyendo hepatitis A, B y C), esclerosis, hipertensión pulmonar, toxicidad por trasplante de médula ósea en un sujeto sometido a trasplante de médula ósea, y combinaciones de los mismos.

[0152] El sujeto que se va a tratar también puede haber estado expuesto o va a ser expuesto a un estímulo ambiental asociado con la función subóptima del ciclo de la urea. Dichos estímulos ambientales incluyen, pero no se limitan a estímulos que implican el deterioro o daño al tejido hepático y/o intestinal. Los estímulos ambientales representativos incluyen, pero no se limitan a quimioterapia u otra terapia farmacéutica, cirugía cardíaca, estrés oxidativo aumentado, trasplante de médula ósea y combinaciones de los mismos.

[0153] Por lo tanto, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno relacionado con la función subóptima del ciclo de la urea en un sujeto de acuerdo con la presente invención. El procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un precursor de óxido nítrico, mediante lo cual se realiza el tratamiento o prevención del trastorno. El precursor de óxido nítrico puede incluir, pero no se limita a citrulina, arginina y combinaciones de los mismos. El precursor de óxido nítrico se administra en una dosis en el intervalo de aproximadamente de 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg, preferiblemente, en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg, y más preferiblemente, en un intervalo de dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg.

[0154] Opcionalmente, el procedimiento de terapia de complementación de la presente invención comprende además la etapa de detectar inicialmente un polimorfismo de un gen de la carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en el sujeto. El polimorfismo del polipéptido de la carbamil fosfato sintasa I preferiblemente comprende una transversión de C a A dentro del exón 36 de CPSI, más preferiblemente comprende una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI, e incluso más preferiblemente, la transversión de C a A en el nucleótido 4340 del ADNc corresponde al gen de CPSI que además comprende un cambio en el código de triplete de AAC a ACC, que codifica un polipéptido de CPSI que tiene un resto treonina en el aminoácido 1405.

[0155] Se observó una disminución significativa en los productos intermedios del ciclo de la urea (citrulina, arginina) en sujetos sometidos a BMT asociado con el polimorfismo de CPSI T1405N descrito en el presente documento. De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un procedimiento para el tratamiento o la profilaxis de la toxicidad en el BMT, tal como HVOD, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un precursor de NO, tal como citrulina y/o arginina, a un sujeto que lo necesite, de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el polimorfismo de CPSI T1405N descrito en el presente documento, está presente en el sujeto. Más preferiblemente, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de citrulina.

[0156] De acuerdo con la presente invención, se proporciona, por lo tanto, un procedimiento para reducir la toxicidad y/o la aparición de HVOD en un sujeto sometido a BMT. Este procedimiento comprende administrar al sujeto sometido a BMT una cantidad eficaz de arginina y/o citrulina, siendo preferida la citrulina, para reforzar la síntesis de arginina y NO en el sujeto. El refuerzo de la síntesis de arginina y NO en el sujeto reducirá y/o prevendrá sustancialmente la aparición de HVOD asociada con el BMT. La citrulina es un agente complementario preferido,

puesto que se convierte más fácilmente en NO. Adicional y preferiblemente, se contempla que los sujetos que tienen el polimorfismo de CPSI de la presente invención, son candidatos preferidos para la complementación de acuerdo con este procedimiento.

5 **[0157]** El sujeto tratado en la presente invención en sus muchas realizaciones, es convenientemente un sujeto humano, aunque debe entenderse que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todas las especies de vertebrados, incluyendo vertebrados de sangre caliente tales como mamíferos y aves, que se pretende que estén incluidos en el término "sujeto". En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en el que se desea el tratamiento de la hiperamonemia, toxicidad por BMT y otras
10 enfermedades asociadas con la función del ciclo de la urea deteriorada, en particular especies de mamíferos agropecuarios y domésticos.

[0158] Por lo tanto, se contempla el tratamiento de mamíferos tales como seres humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido a estar en peligro de extinción (tales como tigres siberianos), de importancia
15 económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoos) para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros distintos de seres humanos (tales como gatos y perros), animales porcinos (cerdos, puercos y jabalís), ruminantes (tales como ganado, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos), y caballos. También está contemplado el tratamiento de aves, incluyendo el tratamiento de las clases de aves que están en peligro de extinción, conservados en zoos, así como
20 aves de corral, y más en particular aves de corral domesticadas, es decir, aves de corral tales como pavos, pollos, patos, gansos, pintadas, y similares, ya que son también de importancia económica para los seres humanos. Por lo tanto, se contempla el tratamiento de ganado, incluyendo, pero no limitado a animales porcinos domesticados (cerdos y puercos), ruminantes, caballos, aves de corral y similares.

25 **[0159]** La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales vehículo para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del hospedante tratado y el modo de administración particular. Por ejemplo, una formulación prevista para la administración a seres humanos puede contener de 0,5 mg a 5 g de agente activo combinado con una cantidad adecuada y conveniente del material vehículo, que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 por ciento de la composición total. Por ejemplo, en un adulto humano,
30 las dosis por persona para la administración son en general, entre 1 mg y 500 mg hasta varias veces al día. Por lo tanto, las formas farmacéuticas unitarias, en general contendrán entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un principio activo, típicamente 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 800 mg, o 1000 mg.

35 **[0160]** Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, ruta de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que recibe terapia.

40 F. Composiciones farmacéuticas

[0161] Se describen además composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido como se describe en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable. Más preferiblemente, una composición farmacéutica comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de CPSI biológicamente activo. Alternativamente, se
45 proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden citrulina o arginina en dosificaciones como se han descrito antes.

[0162] Una composición descrita en el presente documento, típicamente se administra por vía oral o parenteral en formulaciones de dosificación unitaria que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos fisiológicamente no tóxicos
50 bien conocidos, estándar, según se desee. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial o técnicas de infusión.

[0163] Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se formulan de acuerdo con la técnica conocida, usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión
55 adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol.

[0164] Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están el agua, solución de Ringer, y

solución isotónica de cloruro sódico. Además, se usan convencionalmente aceites fijos, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede usar cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, tienen uso los ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de productos inyectables.

5

[0165] Los vehículos preferidos incluyen soluciones salinas neutras tamponadas con fosfato, lactato, Tris, y similares. Por supuesto, en el caso de una composición farmacéutica proporcionada para usar en terapia génica, se purifica el vector suficientemente para que esté esencialmente exento de contaminantes no deseables, tales como partículas de adenovirus defectuosas que interfieren o endotoxinas y otros pirógenos, de modo que no produzcan ninguna reacción adversa en el individuo que recibe la construcción de vector. Un medio preferido de purificación del vector implica el uso de gradientes de densidad de flotación, tal como gradiente de cloruro de cesio y centrifugación.

10

[0166] Una célula transfectada también puede servir como un vehículo. A modo de ejemplo, una célula hepática se puede separar de un organismo, transfectar con un polinucleótido de la presente invención usando procedimientos expuestos antes y después devolver la célula transfectada al organismo (p. ej., por inyección intravascular).

15

G. Generación de anticuerpos

[0167] Se describe además también un anticuerpo inmunorreactivo con un polipéptido o polinucleótido como se describe en el presente documento. Preferiblemente, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo monoclonal. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la materia (véase, p. ej., *Antibodies A Laboratory Manual*, E. Howell y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos más preferidos distinguen entre las diferentes formas de CPSI que comprenden el polimorfismo de CPSI.

20

[0168] Brevemente, un anticuerpo policlonal se prepara por inmunización de un animal con un inmunógeno que comprende un polipéptido o polinucleótido descrito en el presente documento, y recolección de antisuero de este animal inmunizado. Se puede usar una amplia variedad de especies animales para la producción de antisuero. Típicamente, un animal usado para la producción de antisuero es un conejo, un ratón, una rata, un hámster o una cobaya. Debido al volumen de sangre relativamente grande de los conejos, un conejo es una elección preferida para producir anticuerpos policlonales.

25

30

[0169] Como se conoce bien en la materia, un polipéptido o polinucleótido dado puede variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, a menudo es necesario acoplar el inmunógeno (p. ej., un polipéptido o polinucleótido) de la presente invención, con un vehículo. Los vehículos preferidos y de ejemplo son la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la albúmina de suero bovino (BSA). También se pueden usar como vehículos otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo.

35

[0170] Los medios para conjugar un polipéptido o un polinucleótido con una proteína vehículo son bien conocidos en la materia e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

40

[0171] Como también es bien conocido en la materia, la inmunogenicidad frente a un inmunógeno particular se puede potenciar por el uso de estimulantes no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes preferidos y de ejemplo incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

45

[0172] La cantidad de inmunógeno usado para la producción de anticuerpos policlonales varía, entre otros, por la naturaleza del inmunógeno, así como por el animal usado en la inmunización. Se puede usar una variedad de rutas para administrar el inmunógeno, p. ej., subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal. La producción de anticuerpos policlonales se controla por toma de muestra de sangre del animal inmunizado en diferentes puntos después de inmunización. Cuando se ha obtenido el nivel de inmunogenicidad deseado, se puede extraer la sangre del animal inmunizado y aislar y almacenar el suero.

50

[0173] En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento de producción de un anticuerpo inmunorreactivo con un polipéptido de CPSI, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) transfectar células hospedantes recombinantes con un polinucleótido que codifica este polipéptido; (b) cultivar las células hospedantes en condiciones suficientes para la expresión del polipéptido; (c) recuperar el polipéptido; y (d) preparar anticuerpos contra el polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido de CPSI es capaz de mediar la primera etapa del ciclo de la

55

urea, de reacción cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI, u otra actividad biológica como se describe en el presente documento. Se describe incluso además en el presente documento, anticuerpos preparados de acuerdo con el procedimiento descrito antes.

5 **[0174]** Un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento se puede preparar fácilmente mediante el uso de técnicas bien conocidas, tales como las ilustradas en la patente de EE.UU. nº 4.196.265, incorporadas en el presente documento por referencia. Típicamente, una técnica implica primero inmunizar un animal adecuado con un antígeno seleccionado (p. ej., un polipéptido o polinucleótido de la presente invención) de una forma que proporcione una respuesta inmunitaria. Los roedores tales como ratones y ratas son animales preferidos. Después las células de
10 bazo del animal inmunizado se fusionan con células de mieloma inmortal. Cuando el animal inmunizado es un ratón, una célula de mieloma preferida es una célula de mieloma NS-1 murina.

[0175] Las células de bazo/mieloma fusionadas se cultivan en medio selectivo para seleccionar las células de bazo/mieloma fusionadas de las células parentales. Las células fusionadas se separan de la mezcla de las células
15 parentales no fusionadas, por ejemplo, por adición de agentes que bloquean la síntesis nueva de nucleótidos en el medio de cultivo tisular. Los agentes de ejemplo y preferidos son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis nueva tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea solo la síntesis de purinas. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, el medio se complementa con hipoxantina y timidina como una fuente de nucleótidos. Cuando se usa la azaserina, el medio se complementa
20 con hipoxantina.

[0176] Este cultivo proporciona una población de hibridomas de los cuales se seleccionan hibridomas específicos. Típicamente, la selección de hibridomas se lleva a cabo cultivando las células mediante dilución de un solo clon en placas de microvaloración, seguido de ensayo de la reactividad de los líquidos sobrenadantes clonales individuales
25 con un antígeno-polipéptido. Estos clones seleccionados después se pueden propagar indefinidamente para proporcionar el anticuerpo monoclonal.

[0177] A modo de ejemplo específico, para producir un anticuerpo como se describe en el presente documento, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal entre aproximadamente 1-200 g de un antígeno que comprende un
30 polipéptido de la presente invención. Se estimulan los linfocitos B para el crecimiento inyectando el antígeno asociado con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene Mycobacterium tuberculosis muerto). En algún momento (p. ej., al menos dos semanas) después de la primera inyección se administra refuerzo a los ratones por inyección con una segunda dosis del antígeno mezclado con adyuvante incompleto de Freund.
35

[0178] Unas semanas después de la segunda inyección, se extrae sangre de la cola de los ratones y se realiza la titulación del suero por inmunoprecipitación frente a antígeno radiomarcado. Preferiblemente, el procedimiento de refuerzo y titulación se repite hasta que se logra el título adecuado. Se retira el bazo del ratón con el título más alto y se obtienen los linfocitos del bazo por homogeneización del bazo con una jeringa. Típicamente, un bazo de un ratón
40 inmunizado contiene aproximadamente de 5×10^7 a 2×10^8 linfocitos.

[0179] Las células linfocitos mutantes conocidas como células de mieloma se obtienen de animales de laboratorio en los que se ha inducido el desarrollo de dichas células mediante una variedad de procedimientos bien conocidos. Las células de mieloma carecen de la ruta de recuperación de la biosíntesis de nucleótidos. Debido a que las células
45 de mieloma son células tumorales, se pueden propagar indefinidamente en el cultivo tisular, y por lo tanto se denominan inmortales. Se han establecido numerosas líneas celulares cultivadas de células de mieloma de ratones y ratas, tales como células de mieloma NS-1 murino.

[0180] Las células de mieloma se combinan en condiciones adecuadas para fomentar la fusión, con las células productoras de anticuerpos normales del bazo del ratón o rata inyectado con el antígeno/polipéptido de la presente invención. Las condiciones de fusión incluyen, por ejemplo, la presencia de polietilenglicol. Las células fusionadas resultantes son células de hibridoma. Como las células de mieloma, las células de hibridoma crecen indefinidamente en cultivo.
50

[0181] Las células de hibridoma se separan de las células de mieloma no fusionadas por cultivo en un medio de selección tal como medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Las células de mieloma no fusionadas carecen de las enzimas necesarias para sintetizar nucleótidos de la ruta de recuperación, porque mueren en presencia de aminopterina, metotrexato o azaserina. Los linfocitos no fusionados tampoco continúan el crecimiento en el cultivo tisular. Por lo tanto, solo pueden crecer en el medio seleccionado las células que se han fusionado con éxito (células
55

de hibridoma).

- [0182]** Cada una de las células de hibridoma que sobreviven producen un solo anticuerpo. Después estas células se criban según la producción del anticuerpo específico inmunorreactivo con un antígeno/polipéptido de la presente invención. Los hibridomas de una sola célula se aíslan limitando las diluciones de los hibridomas. Los hibridomas se diluyen de forma seriada muchas veces y, después de dejar desarrollarse las diluciones, se ensaya en el líquido sobrenadante la presencia del anticuerpo monoclonal. Los clones que producen este anticuerpo después se cultivan en grandes cantidades para producir un anticuerpo de la presente invención en cantidad conveniente.
- 10 **[0183]** Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento, los polipéptidos y polinucleótidos específicos descritos en el presente documento se pueden reconocer como antígenos, y por lo tanto identificar. Una vez identificados, estos polipéptidos y polinucleótidos se pueden aislar y purificar por técnicas tales como cromatografía de afinidad de anticuerpo. En la cromatografía de afinidad de anticuerpo, se une un anticuerpo monoclonal a un sustrato sólido y se expone a una solución que contiene el antígeno deseado. El antígeno se
15 separa de la solución mediante una reacción inmunespecífica con el anticuerpo unido. El polipéptido o polinucleótido después se separa fácilmente del sustrato y se purifica.

H. Detección de un polinucleótido o un polipéptido de la presente invención

- 20 **[0184]** Alternativamente, se describe en el presente documento un procedimiento para detectar un polipéptido como se describe en el presente documento, en donde el procedimiento comprende hacer inmunorreaccionar los polipéptidos con anticuerpos preparados de acuerdo con los procedimientos descritos antes, para formar conjugados de anticuerpo-polipéptido, y detectar los conjugados.
- 25 **[0185]** Se describe además en el presente documento un procedimiento para detectar transcritos de ARN mensajero que codifican un polipéptido de la presente invención, en donde el procedimiento comprende hibridar los transcritos de ARN mensajero con secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido para formar dúplex; y detectar el dúplex. Alternativamente, se describe un procedimiento para detectar moléculas de ADN que codifican un polipéptido de la presente invención, en donde el procedimiento comprende hibridar moléculas de ADN con un
30 polinucleótido que codifica este polipéptido para formar dúplex; y detectar los dúplex.

[0186] La detección y ensayos de cribado descritos en el presente documento, se pueden usar como una herramienta de pronóstico. Los polinucleótidos que codifican la CPSI humana, así como sus productos proteínicos, se pueden usar fácilmente en el marco clínico como un indicador de pronóstico para el cribado de la susceptibilidad a la
35 hiperamonemia y a otras enfermedades hereditarias relacionadas con la CPSI en seres humanos.

[0187] La detección y ensayos de cribado descritos en el presente documento, también se pueden usar como parte de un procedimiento de diagnóstico. Los polinucleótidos que codifican la CPSI humana, así como sus productos proteínicos, se pueden usar fácilmente en el marco clínico para el diagnóstico de la susceptibilidad a la
40 hiperamonemia y a otras enfermedades hereditarias relacionadas con la CPSI en seres humanos.

H.1. Ensayos de cribado de un polipéptido de la presente invención

[0188] Se describe en el presente documento un procedimiento de cribado en una muestra biológica de la
45 presencia de un polipéptido de CPSI. Preferiblemente, el polipéptido de CPSI tiene actividad en el ciclo de la urea, reactividad cruzada con un anticuerpo dirigido contra la CPSI, u otra actividad biológica como se describe en el presente documento. Una muestra biológica que se va a cribar puede ser un fluido biológico tal como fluido extracelular o intracelular o un extracto u homogeneizado celular o tisular. Una muestra biológica también puede ser una célula aislada (p. ej., en cultivo) o una colección de células tal como en una muestra de tejido o muestra de
50 histología. Una muestra de tejido se puede suspender en un medio líquido o se puede fijar sobre un soporte sólido tal como un portaobjetos de microscopio. Los tejidos hepáticos comprenden tejidos particularmente contemplados.

[0189] Preferiblemente, se proporcionan anticuerpos que distinguen entre el polipéptido de CPSI N1405 y el polipéptido de CPSI T1405. Dichos anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales pero preferiblemente
55 son anticuerpos monoclonales preparados como se ha descrito que lo que antecede.

[0190] De acuerdo con un procedimiento de ensayo de cribado, una muestra biológica se expone a un anticuerpo inmunorreactivo con el polipéptido cuya presencia se está ensayando. Típicamente, la exposición se lleva a cabo formando una mezcla en un medio líquido que contiene tanto el anticuerpo como el polipéptido candidato. El

anticuerpo o la muestra con el polipéptido se pueden fijar a un soporte sólido (p. ej., una columna o placa de microvaloración).

[0191] La muestra biológica se expone al anticuerpo en condiciones de reacción biológicas y durante un periodo de tiempo suficiente para la formación del conjugado anticuerpo-polipéptido. Las condiciones de reacción biológicas incluyen composición y concentración iónica, temperatura, pH y similares.

[0192] La composición y concentración iónica pueden estar en el intervalo desde la del agua destilada hasta una solución 2 molar de NaCl. Preferiblemente, la osmolaridad es de aproximadamente 100 mosmol/l a aproximadamente 400 mosmol/l, más preferiblemente de aproximadamente 200 mosmol/l a aproximadamente 300 mosmol/l. La temperatura preferiblemente es de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 100 °C, más preferiblemente de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 50 °C, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40°C. El pH preferiblemente es de un valor aproximadamente de 4,0 a un valor de aproximadamente 9,0, más preferiblemente de un valor aproximadamente de 6,5 a un valor de aproximadamente 8,5, incluso más preferiblemente de un valor aproximadamente de 7,0 a un valor de aproximadamente 7,5. El único límite en las condiciones de reacción biológicas es que las condiciones seleccionadas permitan la formación del conjugado de anticuerpo-polipéptido y que las condiciones no afecten de forma adversa al anticuerpo o al polipéptido.

[0193] El tiempo de exposición variará entre otros con las condiciones biológicas usadas, la concentración de anticuerpo y polipéptido y la naturaleza de la muestra (p. ej., muestra de fluido o tejido). Los medios para determinar el tiempo de exposición son bien conocidos para el experto en la materia. Típicamente, cuando la muestra es fluida y la concentración de polipéptido en esa muestra es aproximadamente 10^{-10} M, el tiempo de exposición es de aproximadamente 10 min a aproximadamente 200 min.

[0194] La presencia del polipéptido de la muestra se detecta detectando la formación y presencia de conjugados de anticuerpo-polipéptido. Los medios para detectar dichos conjugados o complejos de anticuerpo-polipéptido (p. ej., polipéptido receptor) son bien conocidos en la materia e incluyen procedimientos tales como centrifugación, cromatografía de afinidad y similares, unión de un anticuerpo secundario a un complejo de anticuerpo-receptor de candidato.

[0195] Por ejemplo, la detección se lleva a cabo detectando un indicador fijado en el anticuerpo. Dichos indicadores de ejemplo y bien conocidos incluyen marcadores radiactivos (p. ej., ^{32}P , ^{125}I , ^{14}C), un anticuerpo secundario o una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante. Los medios para fijar indicadores a anticuerpos son bien conocidos en la materia. Hay disponibles kits comerciales.

H.2. Ensayo de cribado para anticuerpo dirigido contra polipéptido

[0196] Se describe además un procedimiento de cribado en una muestra biológica de la presencia de anticuerpos inmunorreactivos con un polipéptido de CPSI. Preferiblemente, el polipéptido de CPSI tienen actividad en el ciclo de la urea, reactividad cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI, u otra actividad biológica de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con dicho procedimiento, se expone una muestra biológica a un polipéptido de CPSI en condiciones biológicas y durante un periodo de tiempo suficiente para la formación del conjugado de anticuerpo-polipéptido y se detectan los conjugados formados.

H.3. Ensayo de cribado del polinucleótido que codifica un polipéptido de CPSI como se describe en el presente documento

[0197] Se puede usar una molécula de ácido nucleico y, en particular una molécula sonda, para la hibridación como una sonda de oligonucleótido con una fuente de ácido nucleico que se sospecha que codifica un polipéptido de CPSI como se describe en el presente documento. De forma óptima, el polipéptido de CPSI tiene actividad en el ciclo de la urea, reactividad cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI, u otra actividad biológica descrita en el presente documento. La hibridación normalmente se lleva a cabo por hibridación del oligonucleótido con una fuente de ADN que se sospecha que tienen un gen de CPSI. En algunos casos, las ondas constituían sólo una sonda individual, y en otros las sondas constituyen una colección de sondas basadas en una secuencia o secuencias de aminoácidos del polipéptido y dan cuenta en su diversidad de la repetición inherente en el código genético.

[0198] Una fuente adecuada de ADN para la hibridación de esta forma, es capaz de expresar un polipéptido de la presente invención y puede ser una genoteca de una línea celular de interés. Alternativamente, una fuente de ADN

puede incluir ADN total de la línea celular de interés. Una vez que el procedimiento de hibridación de la invención ha identificado un segmento de ADN candidato, se confirma que se ha obtenido un clon positivo mediante la hibridación adicional, cartografía con enzimas de restricción, secuenciación y/o expresión y ensayo.

5 **[0199]** Alternativamente, dichas moléculas de ADN se pueden usar en una serie de técnicas que incluyen su uso como: (1) herramientas de diagnóstico para detectar secuencias de ADN normales y anómalas en el ADN obtenido de células del sujeto, tal como un polimorfismo de CPSI descrito en el presente documento; (2) medio para detectar y aislar otros miembros de la familia de polipéptidos y polipéptidos relacionados de una biblioteca de ADN que contiene potencialmente dichas secuencias; (3) cebadores para la hibridación con secuencias relacionadas con el
10 propósito de amplificar esta secuencias; (4) cebadores para alterar secuencias de ADN de CPSI natural; así como otras técnicas que se basan en la similitud de las secuencias de ADN con las de los segmentos de ADN descritos en el presente documento.

[0200] Como se ha expuesto antes, en determinados aspectos, la información de la secuencia de ADN
15 proporcionada por la invención, permite la preparación de secuencias de ADN (o ARN) relativamente cortas (p. ej., sondas) que hibridan específicamente con secuencias codificantes de un gen de CPSI seleccionado. En estos aspectos, se preparan sondas de ácido nucleico de una longitud adecuada basándose en una consideración de la secuencia codificante para un polipéptido descrito en el presente documento. La capacidad de dichas sondas de ácido nucleico para hibridar específicamente con otras secuencias codificantes les da utilidad particular en una
20 variedad de realizaciones. Lo que es más importante, las sondas se pueden usar en una variedad de ensayos para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Sin embargo, están previstos otros usos, incluyendo el uso de la información de secuencia para preparar cebadores de especies mutantes, o cebadores para usar en la preparación de otras construcciones genéticas.

25 **[0201]** Para proporcionar algunas de las ventajas descritas en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico preferida usada para estudios o ensayos de hibridación incluye secuencias de sonda que son complementarias de al menos un tramo de 1 a 40 nucleótidos o más largo, de una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento, tal como una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID: 1, 3, 11 y 13. Un tamaño de al menos 14 nucleótidos de longitud ayuda a asegurar que el fragmento es de longitud suficiente para
30 formar una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Las moléculas que tienen secuencias complementarias a lo largo de tramos mayores que 14 bases de longitud en general son preferidas, para así aumentar la estabilidad y selectividad del híbrido, y de esta forma mejorar la calidad y grado de las moléculas híbridas específicas obtenidas. En general se prefieren diseñar moléculas de ácido nucleico que tiene tramos complementarios de gen de 14 a 20 nucleótidos, o incluso más largos cuando se desee. Dichos fragmentos se
35 pueden preparar fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, por aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tal como la tecnología de la PCR de la patente de EE.UU. nº 4.683.202, incorporada en el presente documento por referencia, o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante.

40 **[0202]** Por consiguiente, una secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento, se puede usar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios del gen. Dependiendo del aplicación prevista, se usa una variedad de condiciones de hibridación para lograr grados distintos de selectividad de la sonda frente a la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren un grado alto de selectividad, típicamente se usan condiciones relativamente restrictivas para formar los híbridos. Por ejemplo, se
45 seleccionan unas condiciones de concentración salina relativamente baja y/o temperatura alta, tal como las proporcionadas por concentración salina 0,02 M - 0,15 M, a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, incluyendo en particular temperaturas de aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C y aproximadamente 65 °C. Dichas condiciones son particularmente selectivas, y toleran pocos, sí toleran alguno, apareamientos erróneos entre la sonda y el molde o la cadena diana.

50 **[0203]** Por supuesto, para algunas aplicaciones, por ejemplo, cuando se desea preparar mutantes usando una cadena de cebador mutante hibridada con un molde subyacente, o cuando se busca aislar secuencias que codifican el polipéptido de la especie relacionada, equivalentes funcionales, o similares, típicamente se necesitan condiciones de hibridación menos restrictivas para permitir la formación de heterodúplex. En dichas circunstancias, se usan
55 condiciones tales como concentración salina 0,15 M - 0,9 M, a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C, incluyendo en particular temperaturas de aproximadamente 25 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 45 °C y aproximadamente 50 °C. De esta forma se pueden identificar fácilmente las especies de hibridación cruzada como señales de hibridación positiva con respecto a las hibridaciones de control. En cualquier caso, en general se aprecia que las condiciones se pueden hacer más restrictivas por adición de

cantidades crecientes de formamida, que sirven para desestabilizar el dúplex híbrido de la misma forma que el aumento de temperatura. Por lo tanto, las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente, y por lo tanto en general será un procedimiento de elección dependiendo de los resultados deseados.

- 5 **[0204]** En algunas realizaciones, es ventajoso usar un ácido nucleico como se describe en el presente documento en combinación con medios adecuados, tal como un marcador, para determinar la hibridación. Se conocen en la materia una amplia variedad de medios indicadores adecuados, incluyendo ligandos radiactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que son capaces de dar una señal detectable. En realizaciones preferidas, es probable que se use un marcador enzimático tal como una ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radiactivos u otros reactivos ambientalmente no deseables. En el caso de marcadores enzimáticos, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden usar para proporcionar un medio visible para el ojo humano o por medios espectrofotométricos, para identificar hibridaciones específicas con muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios.
- 10
- 15 **[0205]** En general, se prevé que las sondas de hibridación descritas en el presente documento, sean útiles tanto como reactivos en hibridación en solución como en realizaciones que usan una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, la muestra que contiene el ADN (o ARN) de ensayo se adsorbe o se fija de otra forma en una matriz o superficie seleccionada. Después, este ácido nucleico monocatenario así fijado se somete a hibridación específica con sondas seleccionadas, en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependen, entre otros, de las circunstancias particulares basadas en los criterios particulares requeridos (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.). Después de lavado de la superficie hibridada para así separar las moléculas de sonda no unidas específicamente, se detecta la hibridación específica o incluso se cuantifica mediante el marcador.
- 20

25 H.4. Kits de ensayo

- [0206]** Se describe además en el presente documento un kit de ensayo de diagnóstico para detectar la presencia de un polipéptido descrito en el presente documento en muestras biológicas, donde el equipo comprende un primer recipiente que contiene un primer anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con el polipéptido, con el primer anticuerpo presente en una cantidad suficiente para llevar a cabo al menos un ensayo. Preferiblemente, los kits de ensayo de la invención comprenden además un segundo recipiente que contiene un segundo anticuerpo que inmunorreacciona con el primer anticuerpo. Más preferiblemente, los anticuerpos usados en los kits de ensayo descritos en el presente documento son anticuerpos monoclonales. Incluso más preferiblemente, el primer anticuerpo se fija sobre un soporte sólido. Más preferiblemente todavía, el primer y segundo anticuerpos comprenden un indicador, y preferiblemente, el indicador es un marcador radiactivo o una enzima.
- 30
- 35

- [0207]** Se describe además también un kit de diagnóstico para agentes de cribado. Dicho kit puede contener un polipéptido descrito en el presente documento. El kit puede contener reactivos para detectar una interacción entre un agente y un receptor de la presente invención. El reactivo proporcionado puede estar radiomarcado. El kit puede contener un agente radiomarcado conocido capaz de unirse o interaccionar con un receptor descrito en el presente documento.
- 40

- [0208]** Alternativamente, se describen en el presente documento kits de ensayo de diagnóstico para detectar la presencia, en muestras biológicas, de un polinucleótidos que codifica un polipéptido como se escribe en el presente documento, comprendiendo los kits un primer recipiente que contiene un segundo polinucleótido idéntico o complementario de un segmento de al menos 10 bases de nucleótidos contiguas de, como un ejemplo preferido, cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 11 y 13.
- 45

- [0209]** Se describen además kits de ensayo de diagnóstico para detectar la presencia, en una muestra biológica, de anticuerpos inmunorreactivos con un polipéptido como se describe en el presente documento, comprendiendo los kits un primer recipiente que contiene un polipéptido de CPSI, que inmunorreacciona con los anticuerpos, con el polipéptido presente en una cantidad suficiente para llevar a cabo al menos un ensayo. Preferiblemente, el polipéptido de CPSI tienen actividad en el ciclo de la urea, reactividad cruzada con un anticuerpo dirigido contra CPSI, u otra actividad biológica descrita en el presente documento. Los reactivos del kit se pueden proporcionar como una solución líquida, unidos a un soporte sólido, o en forma de polvo seco. Preferiblemente, cuando el reactivo se proporciona en una solución líquida, la solución líquida es una solución acuosa. Preferiblemente, cuando el reactivo se proporciona unido a un soporte sólido, el soporte sólido puede ser un medio cromatográfico o un portaobjetos de microscopio. Cuando el reactivo proporcionado es un polvo seco, el polvo se puede reconstituir por la adición de un disolvente adecuado. El disolvente se puede proporcionar.
- 50
- 55

EJEMPLOS

[0210] Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar modos preferidos de la materia objeto descrita antes. Algunos aspectos de los siguientes ejemplos se describen en términos de técnicas o procedimientos que los autores de la presente invención han encontrado o contemplan que funcionan bien en la práctica de la invención. Estos ejemplos se ilustran mediante el uso de prácticas de laboratorio estándar. A la luz de la presente descripción y el nivel general del experto en la materia, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos se pretende que sean sólo ilustrativos, en cuanto que se pueden usar numerosos cambios, modificaciones y alteraciones.

10

Materiales y procedimientos usados en los ejemplos de referencia 1-2 y el ejemplo 1

[0211] Los siguientes materiales y procedimientos se usan en cada uno de los ejemplos de referencia 1-2 y en el ejemplo 1. También se describen materiales y procedimientos adicionales en cada ejemplo.

15

[0212] Reclutamiento clínico/pacientes: se reclutaron más de 200 pacientes que se sometían a BMT en el Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, en el estudio de BMT-Lesión pulmonar después de injerto (LIFE) dirigido a entender los mecanismos de la lesión pulmonar aguda y el fallo multiorgánico después de trasplante. Se buscó el consentimiento de pacientes consecutivos que se sometían a BMT o PBSCT para el tratamiento de tumor maligno. Las definiciones de insuficiencia orgánica (incluyendo HVOD) y la inversión se definieron previamente y los datos se recogieron simultáneamente durante la hospitalización. Se recogieron el plasma, sedimentos celulares y orina en el momento del reclutamiento en el estudio (antes de recibir quimioterapia) y el día del trasplante (antes de infusión de médula) después de completar la quimio-radioterapia de destrucción.

[0213] Análisis de aminoácidos. La sangre y la orina se centrifugaron inmediatamente después de recogerla. Todas las muestras se mantuvieron sobre hielo, después se almacenaron a -70°C hasta el análisis. En estas condiciones de almacenamiento, se sabe que la glutamina, cisteína y homocisteína disminuyen, por lo que estos no se usaron en el análisis. Se midieron los aminoácidos del plasma en el Vanderbilt Diagnostic Laboratories, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee. Brevemente, se preparó un extracto de plasma exento de proteínas por precipitación de proteínas con ácido sulfosalicílico y filtración a través de un filtro de 0,45 mm ACRODISC™ 4 (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan). Los aminoácidos se separaron por cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema de 4 componentes de tampón de citrato de litio de fuerza iónica y pH escalonados en un analizador de aminoácidos Beckmann 7300 (Beckmann, Palo Alto, California). La derivatización después de columna de los aminoácidos con ninhidrina permitió la detección de aminoácidos primarios a 570 nm, y aminos secundarios a 440 nm. La cuantificación se logró por calibración del instrumento con materiales de referencia estándar (Sigma, St. Louis, Missouri).

[0214] Estadística. Los valores de aminoácidos del plasma se expresaron como la media ETM. Las comparaciones entre los valores iniciales y los valores de aminoácidos después de quimioterapia se hicieron usando la prueba T de Student. Se comparó la frecuencia alélica entre pacientes con y sin HVOD usando análisis de Chi cuadrado.

[0215] Pacientes. Los pacientes se identificaron a partir de los reclutados en el estudio BMT Lift Study en la Vanderbilt University. Se aisló el ADN de muestras de sangre u orina centrifugada antes de trasplante. El estado de HVOD se determinó usando los criterios de Baltimore:

45

Bilirrubina > 2,0 mg/dl

Hepatomegalia

50 Ganancia de peso repentina 2%

[0216] Genotipado. Se aisló ADN usando el kit de sangre QIAmp (Qiagen). El polimorfismo T1405N cambia la secuencia de ADN como sigue:

55 CCT-GCC-ACC-CCA-GTG Normal

CCT-GCC-AAC-CCA-GTG Cambio

[0217] La transversión de C a A sustituye la pirimidina C por la purina A que destruye un sitio Ms/I. El uso de un

cebador de dentro del intrón 35 de CPSI y un cebador exótico del exón 36 del gen de CPSI amplifica por PCR de forma fiable un fragmento de 387 pb que abarca la región que contiene el cambio. Esta combinación da una amplificación robusta. También se usan perlas de PCR Ready-to-Go en la amplificación (Pharmacia).

5 **[0218]** El polimorfismo se detectó usando un gen no desnaturalizante para aprovechar las estructuras secundarias creadas por la transversión de C a A. Este cambio crea suficiente estructura secundaria para prevenir que la digestión fiable por enzimas de restricción (Msl I) detecte el polimorfismo. Este cambio también interfiere con el análisis de secuencia directo salvo que ITP se sustituye por GTP en la reacción. Los geles no desnaturalizantes aprovechan las estructuras secundarias creadas por este cambio. Se compararon 15 individuos por este
10 procedimiento y análisis de secuencia.

[0219] Para detectar los fragmentos de ADN en el gel, se adaptó una técnica de tinción con plata. Este procedimiento rápido y barato permitía la visualización de bandas poco después de electroforesis.

15 **[0220]** Análisis estadístico. Se obtuvo un tamaño de muestra suficiente para realizar el análisis de Chi cuadrado de los resultados. Se usó la ecuación de Hardy-Weinburg para calcular las frecuencias esperadas para los genotipos ($p^2 + 2pq + q^2$). Los p valores se obtuvieron de una tabla de Chi cuadrado de referencia usando 2 grados de libertad.

Ejemplo de referencia 1

20 Los alelos del polimorfismo exónico de CPSI (T1405N) no están en un equilibrio de Hardy-Weinburg con la presencia o ausencia de HVOD

[0221] De acuerdo con la presente invención, se ha identificado un polimorfismo común cerca del extremo 3' del ARNm de CPSI (heterocigosidad aproximadamente 0,44). El análisis de secuencia de este cambio puso de manifiesto una transversión C a A en la base 4340 cambiando el código de triplete de ACC a AAC. Esto produce una sustitución de treonina por asparagina en el aminoácido 1405 (denominado en el presente documento ("T1405N")). La treonina está en el dominio alostérico, precediendo la secuencia firma PV(A/S)WP(T/S)(A/Q)E, una secuencia que es importante en la unión del cofactor N-acetil-glutamato (NAG).
25

30 **[0222]** En todas las CPSI activadas por NAG conocidas, un resto treonina está entre los dos restos que preceden la secuencia firma. (Rubio, *Biochemical Society Transactions* 21:198-202 (1998)). Basándose en los estudios de estructura-función, se cree que la formación de enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del grupo acetamido del NAG tiene una función en la unión de este activador. (Stapleton y col., *Biochemistry* 35:14352-14361 (1996);
35 Javid-Majd y col., *Biochemistry* 35:14362-14369 (1996)). La sustitución de la cadena lateral de treonina por asparagina se prevé que va a alterar la formación del enlace de hidrógeno con el NAG y produce un cambio cualitativo en la función enzimática de la CPSI y en la sensibilidad al grupo de NAG disponible. Aunque los autores de la invención no quieren estar ligados por ninguna teoría de operación particular, se especula que basándose en los precedentes sobre los efectos de otros xenobióticos, esta disponibilidad limitada al NAG después de
40 quimioterapia con escalado de dosis es uno de los mecanismos que promueven la disfunción del ciclo de la urea.

[0223] Se llevó a cabo el genotipado de 126 individuos del grupo del estudio BMT-Life. 30 individuos pusieron de manifiesto la evidencia de HVOD en este grupo (24%). Se llevó a cabo el genotipado de 70 pacientes a partir de muestras de sangre y 56 a partir de sedimentos celulares de orina. Las muestras de 15 pacientes se reamplificaron
45 por PCR y se secuenciaron para confirmar la consistencia de los resultados.

[0224] Las tablas 2 y 3 muestran los resultados del análisis de genotipo para el polimorfismo T1405N entre pacientes HVOD+ y HVOD-. El alelo C, también denominado en el presente documento el alelo CPSIa o el alelo que codifica treonina, tiene una frecuencia de 0,62 en la población examinada y el alelo A, también denominado en el
50 presente documento el alelo CPSIb o el alelo que codifica asparagina, tiene una frecuencia de 0,38. El valor de Chi cuadrado para la tabla es 4,3 (P=0,1) indicando que el polimorfismo probablemente no está en equilibrio de Hardy-Weinburg con la presencia de HVOD. Por lo tanto, estos resultados proporcionan evidencia del desequilibrio en la distribución de los alelos T1405N en pacientes de BMT con HVOD, indicando que el polimorfismo se puede usar para identificar sujetos que son susceptibles a toxicidad en el BMT.

55

Tabla 2

Genotipo	HVOD+	HVOD-
CC	13 (esperado 11,4)	32 (esperado 36,5)
AC	16 (esperado 14,1)	50 (esperado 45,1)
AA	1 (esperado 4,5)	14 (esperado 14,4)

5

Tabla 3

Alelos totales:	Frecuencias esperadas
A: 96	AA: 0,15
C: 62	AC: 0,47
	CC: 0,38

[0225] Datos adicionales reunidos de un estudio de aproximadamente 200 pacientes proporcionaron evidencia estadística adicional que apoyaba el uso del polimorfismo en la detección de la susceptibilidad a la función subóptima del ciclo de la urea. Estos datos se sometieron a los procedimientos estadísticos descritos antes.

[0226] La toxicidad en el trasplante de médula ósea produce una morbilidad y mortalidad significativas. La HVOD está asociada con un mal pronóstico en pacientes de BMT. Este estudio se llevó a cabo para evaluar una asociación entre la enzima CPSI y la aparición de HVOD. El polimorfismo T1405N afecta a la función de la CPSI. Su amplia distribución en la población sugiere que ambas formas proporcionan la función adecuada del ciclo de la urea en condiciones normales. La adición de factores estresantes metabólicos (tales como quimioterapia de dosis alta) sirve para disminuir la eficacia de la CPSI por debajo de un umbral de eficacia. El análisis de los datos sugiere, por lo tanto, que es más probable que se produzca la HVOD en pacientes con el alelo que codifica treonina que aquellos con asparagina. El alelo que codifica la treonina es compartido por la forma de CPSI de roedor.

20

Ejemplo de referencia 2

Alteraciones bioquímicas y genéticas en la carbamil fosfato sintasa I en pacientes con complicaciones después de trasplante de médula ósea

25

[0227] El trasplante de médula ósea (BMT) y trasplantes de citoblastos de sangre periférica (PBSCT) se usan cada vez más como terapia primaria para tumores malignos seleccionados. El uso de soporte de citoblastos para la reconstitución hematopoyética permite el escalado sustancial en la dosis de quimioterapia para intentar erradicar cánceres potencialmente letales. Con mejoras en la profilaxis para la infección y prevención de la enfermedad de injerto contra hospedante discapacitante, la disfunción orgánica inducida por quimioterapia sigue siendo una barrera significativa para extender más el uso de este tratamiento.

[0228] La enfermedad venooclusiva hepática (HVOD), un síndrome clínico de hiperbilirrubinemia (bilirrubina en el suero > 2,0 mg/dl), hepatomegalia, y retención de fluidos pronto después de BMT, es una toxicidad importante limitante de la dosis después de BMT, que afecta hasta 54% de los pacientes. Muchos pacientes que desarrollan HVOD después de BMT también cumplirán los criterios de lesión pulmonar aguda (ALI). Casi la mitad de los pacientes con HVOD grave requieren ventilación mecánica, acompañado de una mortalidad de más de 90%. Dichos datos subrayan el gran impacto en la mortalidad de la disfunción orgánica secuencial, incluso en una población de pacientes jóvenes, y refuerza la importante asociación clínica de mal pronóstico después de lesión pulmonar aguda en pacientes con disfunción hepática. Los mecanismos responsables de esta interacción orgánica permanecen completamente incomprendidos.

[0229] En este ejemplo, se analizó si la quimioterapia de acondicionamiento administrada antes del BMT puede afectar a enzimas tempranas del CU y secundariamente predisponer a los pacientes a la disfunción hepática y fallo multiorgánico. Los análisis de aminoácidos en el plasma apoyan la idea tanto de la función del UC deteriorada como la menor producción de óxido nítrico (NO_x). A la vista de estos descubrimientos, se hizo el cribado de pacientes con polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) exónico en la CPS-I descrita en el presente documento. Se encontró que la homocigosidad para el SNP estaba asociado con una menor incidencia de HVOD y supervivencia temprana potenciada después de BMT, acorde con una interacción farmacogenética significativa.

50

Procedimientos

- [0230] Reclutamiento clínico/pacientes:** A lo largo de los últimos tres años se han reclutado 200 pacientes que se sometían a BMT en el Vanderbilt University Medical Center en el estudio de trasplante de médula ósea-lesión pulmonar después de injerto (BMT-LIFE), una investigación exploratoria clínica-bioquímica coordinada dirigida a 5 entender los mecanismos de la lesión pulmonar aguda y fallo multiorgánico después de trasplante. Las definiciones de fallo orgánico e inversión fueron definidas previamente y los datos se recogieron simultáneamente durante la hospitalización y hasta 60 días después de BMT. Los criterios de exclusión incluían terapia vírica activa y de escalado de dosis previa con soporte de citoblastos hematopoyéticos (PBSCT o BMT).
- 10 **[0231]** La enfermedad venooclusiva hepática (HVOD), se identificó en pacientes con bilirrubina > 2,0 mg/dl antes de 21 días después de trasplante con ganancia de peso >5% del valor inicial, o inicio nuevo de hepatomegalia tierna. La lesión pulmonar aguda (ALI) se definió como infiltrados bilaterales en la radiografía de pecho durante tres fechas consecutivas con una relación de presión parcial de oxígeno en la sangre arterial a la fracción de la concentración de oxígeno inspirado (PaO₂/FiO₂) menor de 300 en ausencia de disfunción cardíaca clínica. Los pacientes vivos 60 días 15 después del trasplante se definieron como supervivientes. Se recogieron el plasma, sedimentos celulares de la circulación y orina en el reclutamiento del estudio (antes de recibir quimioterapia) y el día del BMT, varios días después de completar la quimioterapia de dosis alta pero antes de la infusión de médula. Las muestras se dividieron en partes alícuotas y se pusieron inmediatamente en hielo antes de almacenar a -80°C antes del análisis.
- 20 **[0232] Análisis de aminoácidos.** El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en muestras de plasma crioconservadas desde el día -8 y 0 (pretratamiento y día de trasplante) en 60 pacientes. Las muestras de los pacientes inicialmente se seleccionaron aleatoriamente para los estudios piloto; posteriormente las muestras analizadas se aumentaron específicamente para incluir pacientes extra con el genotipo SNP AA de la CPSI-I (véase más adelante) y pacientes adicionales con las complicaciones post-BMT de HVOD y ALI. Se preparó un extracto de 25 plasma exento de proteínas por precipitación de proteínas con ácido sulfosalicílico y filtración a través de 0,45 µm Acrodisc 4 (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan).
- [0233]** Los aminoácidos se separaron por cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema de 4 componentes de tampón de citrato de litio de pH y fuerza iónica escalonados en un analizador de aminoácidos 30 Beckmann 7300 (Beckmann, Palo Alto, California). La derivatización después de columna de aminoácidos con ninhidrina permitió la detección de aminoácidos primarios a 570 nm, y aminas secundarias a 440 nm. La cuantificación se logró por calibración del instrumento con materiales de referencia estándar (Sigma, St. Louis, Missouri). La citrulina, arginina y ornitina se examinaron como índices de flujo medibles de productos intermedios a través del ciclo de la urea.
- 35 **[0234] Medición de metabolitos del óxido nítrico (NOx) del plasma.** El NOx del plasma se midió en un subgrupo de pacientes usando reactivos Griess modificados después de separar las proteínas de las muestras e incubar con perlas de cadmio para convertir el nitrato en nitrilo.
- 40 **[0235]** Detección del polimorfismo T1405N. Los cebadores oligonucleótidos de dentro del exón 36 (CGGAAGCCACATCAGACTGG (SEQ ID NO: 15)) y el intrón (GGAGAGTGAACTTGACAATCATC (SEQ ID NO: 16)) de CPS1 y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar de forma segura un fragmento de 251 pb que abarca la región que contiene el cambio del ADN genómico, se obtuvieron de preparaciones de capa leucocitaria o sedimento urinario. Esta combinación de cebadores dio amplificación reproducible usando perlas de 45 PCR Ready-to-Go (Pharmacia) y las siguientes condiciones de ciclos de la PCR: 35 ciclos de 1 min de reasociación a 55 °C, 1 min de extensión a 72 °C y 1 min de desnaturalización a 94 °C.
- [0236]** Después de tratamiento con formamida, las muestras se sometieron a electroforesis durante 4 h a 4 °C en un gel de MDE no desnaturalizante (FMC, Rockland, Maine), y después se tiñeron con nitrato de plata para detectar 50 fragmentos de ADN. El genotipado confirmatorio de 17 individuos usando tanto electroforesis en gel no desnaturalizante como el análisis de secuencia directo, dieron resultados idénticos. Los pacientes se clasificaron según tuvieran los genotipos de SNP homocigotos de CC a AA, o los tuvieran heterocigotos (AC). Como comparación, usando procedimientos idénticos, se analizó una cohorte de 100 pacientes con enfermedad de Alzheimer para evaluar la distribución de los genotipos de SNP de la CPSI.
- 55 **[0237] Análisis estadístico.** Se compararon los niveles de aminoácidos en el plasma antes y después de quimioterapia y los niveles entre grupos de pacientes, usando la prueba T de Student o la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (si los datos no seguían una distribución normal). La distribución de genotipos de la CPSI se comparó a través de grupos calculando la frecuencia alélica para el grupo entero y buscando pruebas del

desequilibrio de Hardy-Weinberg en subgrupos específicamente seleccionados usando el análisis de P^2 . La sensibilidad, especificidad, valores predictivos, y evaluaciones de riesgo relativas, se generaron de tablas de contingencia de dos por dos construidas usando valores de aminoácidos específicos en grupos de pacientes dividido entre la presencia y ausencia de resultados clínicos específicos (p. ej., HVOD, ALI y muerte).

5

RESULTADOS

[0238] Se reclutaron 200 pacientes en el estudio de BMT-LIFE. El 52% se sometió a trasplante autólogo (edad media 46 ± 1 años); 48% recibieron injertos alogénicos (edad media 40 ± 1 años). De los pacientes sometidos a trasplantes alogénicos, 24% recibieron injertos de donantes no relacionados con HLA correspondiente. Casi dos tercios de los pacientes en el grupo autólogo eran mujeres, reflejando la prevalencia creciente de cáncer de mama en esta población. Las indicaciones para el trasplante eran diversas, pero 79% de los pacientes eran trasplantados para cáncer de mama, leucemia o linfoma de no Hodgkin. Los diferentes regímenes preparativos usados antes del BMT incluían CTC (ciclofosfamida, tiotepá, carboplatino), BuCy (busulfán, ciclofosfamida), CVP16TBI (ciclofosfamida, etopósido, irradiación corporal total), CBVP16 (ciclofosfamida, biscloroetilnitrosourea, etopósido) y TC (tiotepá, ciclofosfamida).

[0239] Ni la morbilidad ni la mortalidad son infrecuentes después del BMT. Aunque la mortalidad global el día 60 en el estudio era 14%, era 20% en los pacientes que recibían aloinjertos. Las complicaciones de lesión pulmonar aguda (ALI) y enfermedad venooclusiva hepática (HVOD) se produjeron cada una en 19% de los pacientes. Estas complicaciones eran más de dos veces más comunes en pacientes que recibían aloinjertos. En el grupo de pacientes que desarrollaban HVOD, 62% (24/38) también cumplieron el criterio para la hospitalización durante la ALI. Solo 38% (14/38) de los casos de ALI se produjeron en pacientes que no habían cumplido nunca los criterios para HVOD.

25

[0240] En un subconjunto (60/200) de los pacientes, aumentado específicamente durante la selección de muestras con pacientes extra con genotipo de SNP AA de la CSP-I y pacientes adicionales con complicaciones postrasplante, se hicieron determinaciones de aminoácidos en el plasma antes de la administración de quimioterapia y el día del trasplante. La comparación de niveles de aminoácidos seleccionados que participaban en el UC (citrulina, ornitina y arginina) antes y después de quimioterapia puso de manifiesto diferencias significativas. Los niveles de citrulina disminuyeron en prácticamente todos los pacientes con una disminución media de grupo de $23,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$ a $9,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ($P < 0,05$). Los niveles de arginina subieron en aproximadamente 35% ($P < 0,05$), y los niveles de ornitina subieron en 21% ($P < 0,05$).

[0241] La relación de ornitina/citrulina (relación O/C), un índice de flujo a través de las etapas tempranas del CU (es decir, valores menores indican mejor flujo del ciclo), aumentaron de $3,9 \pm 0,7$ en el reclutamiento del estudio a $11,8 \pm 1,8$ después de quimioterapia de inducción ($P < 0,05$). También se produjeron cambios en aminoácidos que no son parte del CU. Los niveles de glicina y alanina, dos aminoácidos alifáticos, disminuyeron significativamente en 11% y 19%, respectivamente, en un patrón no acorde con el menor flujo de productos intermedios a través del ciclo, simplemente debido a la menor ingestión de proteínas (agudo o crónico). Los niveles de fenilalanina y metionina subieron en 43% y 23%, respectivamente, sugiriendo disfunción hepática subclínica.

[0242] Los niveles plasmáticos iniciales de citrulina y la relación O/C tenía importancia de pronóstico. Los supervivientes de 60 días del BMT tenían niveles iniciales más altos de citrulina que los no supervivientes ($24,4 \pm 1,3$ frente a $17,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$, respectivamente; $P < 0,05$). El riesgo relativo de muerte antes de 60 días después del BMT era 2,92 para pacientes con un nivel de citrulina en el reclutamiento menor que 20. El valor predictivo negativo para la muerte, de un valor de citrulina en el plasma mayor de $20 \mu\text{M}$ era 90%. Las relaciones O/C en el reclutamiento eran significativamente menores en pacientes que no habían desarrollado nunca HVOD ($2,8 \pm 0,2$) o ALI ($2,9 \pm 0,2$) cuando se compararon con pacientes que posteriormente desarrollaron esas complicaciones ($5,8 \pm 1,9$ y $6,5 \pm 2,7$, respectivamente; $P < 0,05$). La comparación de las relaciones O/C entre los supervivientes de 60 días y los no supervivientes de BMT en el reclutamiento del estudio mostraron una tendencia hacia niveles menores en los supervivientes ($3,3 \pm 0,2$ frente a $6,9 \pm 3,9$; $P = 0,06$). El valor predictivo para la muerte en 60 días después de BMT asociado con una relación O/C inicial menor que 2,5 era 92%.

[0243] Varios niveles de productos intermedios de aminoácidos del ciclo de la urea después de la terapia preparativa, el día del BMT, también tenían significación. Los niveles de arginina en el plasma eran mayores en los supervivientes ($114,5 \pm 5,9 \mu\text{M}$) cuando se compraron con los no supervivientes ($92,3 \pm 10,4 \mu\text{M}$) ($P < 0,05$). Las relaciones O/C eran significativamente mayores, sugiriendo más UCF deteriorado, en pacientes que más tarde desarrollaron ALI, cuando se compararon con los que no desarrollaron nunca disfunción pulmonar grave ($18,4 \pm 5,9$

frente a $9,5 \pm 0,7$; $P < 0,05$). Aunque el valor predictivo negativo para el desarrollo de ALI de una relación O/C después de quimioterapia menor de diez veces era alto (86%), el riesgo relativo para la mortalidad asociada con este umbral era solo 1,44. Había una tendencia a mayores relaciones O/C en los pacientes el día del BMT en pacientes que posteriormente desarrollaron HVOD ($P = 0,09$).

5

[0244] Se midieron los niveles de metabolitos de óxido nítrico (NO_x) en el plasma en 62 pacientes. Los niveles de NO_x en el plasma disminuyeron 20% después de la terapia de inducción, de $40 \pm 2 \mu\text{M}$ en el reclutamiento del estudio a $32 \pm 2 \mu\text{M}$ el día de BMT ($P < 0,05$). La mediana del valor de NO_x el día del BMT en 20 pacientes que desarrollaron HVOD o ALI era $28 \mu\text{M}$; para los pacientes sin dichas complicaciones, el NO_x en el plasma era $35 \mu\text{M}$.

10 No se observaron diferencias claras del NO_x en el plasma cuando se compararon pacientes con diferentes genotipos de SNP de la CPSI.

[0245] Para evaluar si algunos pacientes pueden tener una predisposición genética a desarrollar complicaciones mórbidas después de terapia de inducción y BMT, se llevó a cabo el genotipado de todos los pacientes en el estudio de un SNP de CPSI. De los 200 pacientes, se analizaron datos de 196 pacientes (es decir, 2 exclusiones clínicas; 2 amplificaciones de PCR sin éxito) para determinar si el SNP C4340A de la CPS-I estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg con el desarrollo de HVOD. La distribución de los genotipos de SNP de CPSI en pacientes que se sometían a BMT era idéntica a los del grupo de control (100 pacientes con enfermedad de Alzheimer); 44% CC (tipo natural), 45% AC (heterocigoto) y 11% AA (homocigoto para la transversión). La tasa de ataque de la HVOD en aquellos con el genotipo CC o AC era 18% y 24%, respectivamente. No había casos de HVOD en pacientes con el genotipo AA.

[0246] El descubrimiento de que esta distribución alélica no estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg con el desarrollo de HVOD ($P^2 = 5,06$, $P < 0,05$) sugiere que el genotipo AA del SNP altera la susceptibilidad a la toxicidad hepática después de quimioterapia de inducción. También había tendencias a diferencias en la mortalidad 60 días después de BMT entre los genotipos de SNP. Los no supervivientes constituían 15% y 20% de los grupos de genotipo AC y CC, respectivamente. Es interesante que todos los pacientes con el genotipo AA sobrevivieron 60 días después del BMT ($P^2 = 3,36$; $P = 0,06$). Es de destacar que todas las puntuaciones de P^2 venían de la célula que sobrevive/AA. No había diferencias significativas entre pacientes con diferentes genotipos C4340A del SNP en la tasa de ataque de ALI (16%, 15%, y 25% en los grupos de AA, AC, y CC, respectivamente). Mientras que ALI estaba asociado con mortalidad significativa en pacientes con los genotipos AC o CC (71% y 66%, respectivamente), todos los pacientes con el genotipo AA que desarrollaron ALI finalmente tuvieron un resultado tanto de infiltrados pulmonares bilaterales en CXR e intercambio de gases deteriorado y sobrevivieron 60 días después del BMT.

35

Discusión

[0247] Los datos presentados en este ejemplo reflejan una asociación cercana entre la HVOD y ALI en los pacientes después de BMT, con aproximadamente 2/3 de los pacientes con HVOD que cumplan los criterios para la ALI. En este estudio 68% (26/38) de los pacientes que desarrollaron ALI necesitaron ventilación mecánica. Rubenfeld y Crawford han descrito una supervivencia significativa, definida como extubación seguida de alta del hospital con supervivencia de 30 días, de sólo 6% en pacientes que requerían ventilación mecánica después del BMT. Véase, Rubenfeld, G. D. y Crawford, S. W., *Annals of Internal Medicine* (1996) 125:625-33.

45 **[0248]** La HVOD sigue siendo la principal toxicidad limitante de la dosis de la quimioterapia con escalado de dosis. Se caracteriza clínicamente por retención de fluidos, ictericia y agrandamiento hepático doloroso que se produce en las 3 semanas del BMT. Los estudios de autopsias de los pacientes que no sobrevivieron que cumplían estos criterios clínicos proporcionan la confirmación histológica en >80% de los casos y están de acuerdo con la idea de que la trombosis local potenciada puede ser un suceso iniciador en la patogénesis de la HVOD.

50

[0249] La disminución significativa de los niveles de citrulina y aumento en el plasma de los niveles de ornitina de los pacientes que se sometían a BMT sugiere una alteración significativa en el flujo de los productos intermedios de carbono a través del UC en pacientes después de quimioterapia de inducción. El análisis de los patrones de otros aminoácidos indica que este efecto no se debe simplemente a la menor ingestión de proteínas. A diferencia de los patrones vistos en pacientes con desnutrición, donde los niveles de glicina y aminoácidos de cadena lateral ramificada (BCAA) normalmente son significativamente elevados, se observó una disminución en la glicina y no había cambios significativos en los BCAA. Además, la desnutrición tiende a aumentar la actividad de la CPSI en el hígado y no debería conducir a aumentos de la ornitina en el plasma.

55

[0250] La capacidad del pretratamiento de pacientes que se someten a BMT para mantener el flujo de productos intermedios a través del CU tenía una importancia de pronóstico particular. Los pacientes que no sobrevivían a los 60 días después de BMT y aquellos pacientes que desarrollaban HVOD o ALI tenían niveles de significativamente menores de citrulina y relaciones O/C mayores comparados con los pacientes que no desarrollaban estas complicaciones. Era interesante la observación de que los pacientes que nos sobrevivían al BMT tenían valores menores de arginina en el plasma después de terapia de inducción, cuando se comparaban con pacientes que sobrevivían. En vista del agrupamiento de células que contienen enzimas del UC tempranas alrededor de las vénulas hepáticas terminales, las concentraciones locales tanto de arginina como de óxido nítrico (NO) podrían ser mucho mayores y podrían tener una función importante en el mantenimiento de la permeabilidad de estos vasos y la regulación del flujo sanguíneo hepático regional. Los estudios que muestran una reducción significativa de los niveles de NOx en el plasma después de quimioterapia de inducción, apoyan la idea de que la producción de NO está alterada durante el BMT.

[0251] La aparente discrepancia entre los niveles plasmáticos de arginina aparentemente normales el día del trasplante y el NOx plasmático notablemente reducido, resalta la compleja cinética in vivo del flujo de arginina y citrulina a través de diferentes lechos de órganos. Los estudios con isótopos estables de homeostasia de arginina de todo el cuerpo han indicado que sólo aproximadamente 15% de la renovación de arginina del plasma está asociada con la formación de urea, y que sólo 1,2% de la renovación de arginina del plasma está asociada con la formación de NO. Además, estudios in vitro han documentado la canalización sustancial de productos intermedios del ciclo de la urea, de la citrulina a la arginina, que no está influida por la provisión exógena de sustrato. La capacidad de un paciente individual para mantener la función del ciclo de la urea y la producción de NO hepática durante el estrés de la quimioterapia de inducción, puede influir en parte, en su resistencia a las complicaciones después del BMT.

[0252] Puesto que no hay disparidad de géneros en la aparición de la HVOD, los autores de la invención se concentraron en los potenciales problemas farmacogenéticos relacionados con CPSI, un gen codificado de forma autosómica, en lugar de en el gen de la ornitina transcarbamilasa ligado al cromosoma X. Aunque caracteriza los cambios moleculares que subyacen en las causas de la deficiencia de CPSI neonatal y de inicio tardío, se identificó un SNP común cerca del extremo 3' del ARNm de CPSI (heterocigosidad 0,44). Esta transversión C4340A codifica una sustitución prevista de treonina (ACC) por asparagina (AAC) en el aminoácido 1405 (T1405N). Esta treonina está en el dominio alostérico, precediendo a la secuencia PV(A/S)WP(T/S)(A/Q)E importante en la unión de un cofactor, el n-acetilglutamato (NAG), que aumenta la actividad enzimática. Aunque los autores de la invención no quieren estar ligados por ninguna teoría de funcionamiento particular, se especula que, basándose en los precedentes de los efectos de otros xenobióticos, esta disponibilidad limitada del NAG después de quimioterapia con escalado de dosis es uno de los mecanismos que promueven la disfunción del ciclo de la urea. No obstante, parece que la presencia del genotipo AA de SNP de CPS-I está asociado con protección contra el desarrollo de la HVOD, resolución de ALI si ocurre, y supervivencia de 60 días mejorada después de BMT. Por lo tanto, los datos sugieren que la alteración en el CU tiene una función en la modificación de la interacción hígado-pulmón durante la septicemia y lesión pulmonar aguda.

[0253] En resumen, este ejemplo documenta el deterioro significativo en la función hepática del UC en pacientes que reciben quimioterapia con escalado de dosis antes de BMT. Los pacientes con trastorno más grave en el ciclo de la urea tienen más probabilidad de desarrollar complicaciones mórbidas después del BMT. Además, se ha encontrado una asociación significativa entre un SNP C4340A de CPS-I y tanto complicaciones post-BMT como en la supervivencia a corto plazo. Dichos datos son útiles para evaluar el riesgo para pacientes que se someten a BMT y proporcionar una base lógica para los intentos terapéuticos para soportar la función del UC durante la quimioterapia con dosis alta.

Ejemplo 1

50 Terapia complementaria de arginina/citrulina

[0254] La disminución añadida en los productos del ciclo de la urea (arginina y citrulina) y el aumento en precursores (amoniaco, glutamina, etc.) que resultan del polimorfismo, contribuyen a la toxicidad asociada con el BMT. Como parte del estudio BMT-Life, se midieron los niveles de citrulina y arginina en 10 pacientes que se sometieron a BMT.

[0255] La quimioterapia de dosis alta usada en el BMT altera las funciones normales de las enzimas del ciclo de la urea y contribuye a la aparición de o a la toxicidad asociada con la HVOD. Para evaluar más esta información, se llevó a cabo un análisis de plasma almacenado de 10 pacientes que se sometieron a BMT, antes del tratamiento y

después de completar la quimioterapia de inducción. Se determinaron los perfiles de aminoácidos de todas las muestras. Se puso particular atención en los productos intermedios del ciclo de la urea citrulina, arginina y ornitina. Como se muestra en la tabla 4, hay una disminución notable de los niveles de citrulina de todos los pacientes desde el valor inicial medio antes de tratamiento de $24 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ hasta la media después de tratamiento de $8 \pm 1 \mu\text{mol/l}$ ($P < 0,001$). Los niveles de arginina en el plasma disminuyeron desde una media de $91 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ hasta $70 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ ($P < 0,05$), a pesar del uso de nutrición parenteral que contenía arginina en varios pacientes:

Tabla 4

Aminoácido	Antes de quimio.	Después de quimio.	P valor
Citrulina	$24 \pm 3 \mu\text{M}$	$8 \pm 1 \mu\text{M}$	$<0,001$
Arginina	$91 \pm 6 \mu\text{M}$	$70 \pm 6 \mu\text{M}$	0,03

10

[0256] La disminución de la citrulina y arginina eran similares en los pacientes que recibieron y en los que no recibieron nutrición parenteral total y era la misma en hombres y mujeres. Las disminuciones en citrulina sugieren que hay una disminución en el flujo a través de las primeras etapas del ciclo de la urea (figura 1).

15 **[0257]** Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para reducir la toxicidad y/o la aparición de HVOD en un paciente que se somete a BMT. Este procedimiento comprende administrar al pacientes de BMT arginina y/o citrulina, siendo preferida la citrulina, en una cantidad eficaz para reforzar la arginina y síntesis de NO en el paciente. El refuerzo de arginina y síntesis de NO en el paciente reduce y/o previene sustancialmente la aparición de HVOD asociada con el BMT. La citrulina es un agente complementario preferido puesto que se convierte más fácilmente en NO.

20

Ejemplo de referencia 3

Construcción de un clon de expresión de CPSI de longitud completa funcional

25

[0258] Después de intentar una serie de estrategias, se construyó un clon de expresión de ADNc de CPSI humana que contenía la región codificante entera. Las figuras 6 y 7 presentan diagramas esquemáticos que ilustran el procedimiento usado para construir el clon de expresión. Este clon se ha secuenciado completamente y no contiene ningún cambio de la secuencia de CPSI consenso que se ha caracterizado en la materia.

30

[0259] La capacidad del clon para hacer la proteína CPSI se ensayó en células COS-7. Se eligieron células COS-7 por su falta de actividad o producción de CPSI natural. Se preparó un análisis de transferencia western de las células COS-7 transfectadas con la construcción flCPSI-PCDNA3.1. Se usaron extractos de células HepG2 como un control ya que las células derivadas del hígado tienen actividad de CPSI retenida. Se usaron células COS-7 no transfectadas como un control negativo. A diferencia de las células COS-7 no transfectadas, las células HepG2 y COS-7-flCPSI demostraron la banda de 160 kDa esperada usando un anticuerpo de conejo dirigido contra CPSI de rata. Además, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico para detectar la producción de fosfato de carbamilo a partir de amoniaco. Como se muestra gráficamente en la figura 8, las células transfectadas demostraron actividad similar a las células HepG2, mientras que las células COS-7 no transfectadas no mostraron actividad.

40

[0260] Se ha llevado a cabo la mutagénesis de sitio dirigido en el inserto de CPSI que contiene T1405 y se ha creado una copia con el codón polimórfico N1405. El codón polimórfico N1405 se secuenció para su longitud entera y no se detectaron otros cambios. Se usó el sistema QuikChange (Stratagene), que aprovecha la metilación introducida en el ADN por bacterias hospedantes, para preparar esta construcción.

45

[0261] Estas construcciones se usan para proporciona un suministro constante de proteína CPSI recombinante codificada por ambos alelos (T1405, N1405) usando células COS y las respectivas construcciones CPSI/PC DNA 3.1 como un sistema de expresión. Se ha producido CPSI enzimáticamente activa usando este sistema, como se muestra por la gráfica en la figura 8.

50

[0262] Un componente de estos experimentos es determinar el efecto in vitro del polimorfismo T1405N en la función de la CPSI. Como se discute en los ejemplos de referencia 1 y 2, este cambio afecta a la sensibilidad de la enzima a las concentraciones de NAG. El cribado en 20 individuos del cambio de C a A, mostró una tasa de heterocigosidad de 50% con 25% del grupo homocigoto AA. Esto sugiere que una parte significativa de la población general tiene una anomalía cualitativa potencial en la función de la CPSI. Esta anomalía, aunque está silenciosa en condiciones normales, se desenmascara en condiciones de estrés y toxinas tales como la quimioterapia de dosis

55

alta o la administración de ácido valproico.

5 **[0263]** La comparación de los productos de proteínas se hace entonces por etapas. La primera etapa examina las características físicas del ARNm expresado y proteína. Usando el inserto de flCPSI como sonda, se hibridan transferencias Northern de mensaje preparadas a partir de las líneas celulares COS-7 que expresan. Los controles positivos incluyen HepG2 y mensaje de hígado humano. Los controles negativos eran células COS-7 transfectadas con casete vacío pcDNA3.1. La flCPSI expresada derivada de mensaje es algo menor que la CPSI natural (4,9 kb frente a 5,7 kb) puesto que el clon no contiene la región 3' no traducida de 1 kb.

10 **[0264]** Usando los mismos controles, se llevó a cabo el análisis de transferencia Western de lisados celulares por SDS-PAGE. Se usa la tinción con azul Comassie para examinar la producción total de proteínas. Para la detección específica de CPSI, se usa un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CPSI de rata. Este anticuerpo detecta la CPSI expresada a partir de células COS-7, así como las muestras de control. Finalmente, se determinan cambios en la estructura de proteínas examinando el patrón de movilidad por electroforesis 2D, una herramienta útil para
15 detectar cambios conformacionales. Cualquier cambio grande en la conformación explica probablemente la alteración en la función de CPSI para esta mutación.

[0265] La siguiente etapa implica medir las características funcionales de las enzimas expresadas. Se ha modificado un ensayo colorimétrico sensible para este propósito (Pierson, D. L., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 3:31-
20 37 (1980)). El ensayo modificado permite 4-5 análisis de 20-50 mg de tejido o células. El tejido se homogeneiza primero en KCl 0,75 M. Se separan las moléculas pequeñas, incluyendo el ATP y NAG, mediante una columna SEPHADEX G25 (Boehringer). La mezcla de reacción contiene bicarbonato amónico, ATP, DTT de magnesio, n-acetilglutamato (NAG), y trietanolamina. Se puede variar la concentración de cualquier reactivo, y los experimentos en células HepG2 muestran menor actividad tanto con concentraciones bajas como altas de NAG (0,50 mM). La
25 ausencia de NAG en la expresión de células COS-7 preliminarmente, da actividad enzimática no medible.

[0266] Puesto que la CPSI es una enzima alostérica, no sigue la cinética de Michaelis-Menton variando las concentraciones de NAG; sin embargo, cuando se fija el NAG, la producción de fosfato de carbamilo es constante. Como se muestra en la figura 8, la producción de fosfato de carbamilo se mide por la adición de hidroxilamina a la
30 solución después de incubación a 37°C para periodos de tiempo variables (0, 5, 10, 20, 25, 30 minutos). Esta etapa, llevada a cabo a 95 °C, también sirve para inactivar la enzima y prevenir la producción adicional de fosfato de carbamilo. La hidroxilamina convierte el fosfato de carbamilo en hidroxilurea que posteriormente se trata con solución de ácido sulfúrico/acético con butanodiona para obtener un compuesto con una absorción máxima a 458 nm. Después, se mide
35 la absorbancia a 458 nm para cada reacción. Típicamente la actividad empieza a disminuir después de 20-30 min de reacción.

[0267] Se reúnen una serie de sedimentos de células que expresan para el análisis. Para asegurar que las mediciones de actividad se basan en cantidades uniformes de enzima, se cuantifica la CPSI expresada por análisis
40 de transferencia Western de la muestra reunida, usando un anticuerpo para CPSI tal como el de conejo dirigido contra CPSI de rata, descrito en lo que antecede. Primero se determina la actividad basal usando cantidades fijas de sustrato y cofactor y un análisis del transcurso del tiempo. Después se usan cantidades variables de amoniaco, bicarbonato, ATP y NAG para determinar la eficacia de unión para estos elementos. Estos elementos se varían de 0 a 10 veces la cantidad normal. La actividad enzimática también se mide después de tratamiento térmico del
45 homogeneizado. Los experimentos de marcaje de proteínas (pulso y caza) se llevan a cabo para determinar la estabilidad de la proteína a lo largo del tiempo.

[0268] La expresión de la proteína CPSI estable se obtiene usando los procedimientos descritos antes. El establecimiento de líneas celulares transfectadas estables, permite la producción de cantidades suficientes de
50 ambas variedades de CPSI para llevar a cabo estos estudios. En los estudios de actividad, se observan cambios de actividad para el tipo N1405 comparado con el tipo T1405 de CPSI. También se observa un cambio en la actividad enzimática con concentraciones de NAG que varían. Estos resultados apoyan la función del polimorfismo de la presente invención en la predicción de la susceptibilidad a la función subóptima del ciclo de la urea e hiperamonemia y menor producción de arginina asociados con el mismo.

55

Ejemplo de referencia 4

Relación del polimorfismo T1405N y los productos intermedios del ciclo de la urea con el aumento de amoniaco observado en pacientes con tratamiento con ácido valproico

[0269] El ácido valproico (VPA) se usa habitualmente como medicación en las convulsiones, en particular para el tratamiento de convulsiones de ausencia o como una terapia adyuvante de otros trastornos de convulsiones. La toxicidad del tratamiento con VPA es un proceso complejo y multivariante y probablemente refleja varias alteraciones metabólicas. La hiperamonemia y la esteatosis hepática microvesicular y necrosis son las complicaciones médicas graves referidas más habitualmente.

[0270] Aunque el desarrollo de hiperamonemia tóxica implica solo un pequeño número de pacientes, lleva una morbilidad y mortalidad significativas, y se han atribuido varias muertes a esta complicación. El desarrollo de hiperamonemia asintomática (nivel de amoniaco en el plasma mayor que 60 $\mu\text{mol/l}$) se produce en el espacio de 1 hora de la administración de VPA, y, sin embargo, es relativamente común.

[0271] Mecanismos de hiperamonemia inducida por VPA. Los mecanismos por los cuales el VPA produce hiperamonemia han sido objeto de mucho debate, y actualmente se apoyan en la materia una serie de teorías diferentes. Un modelo renal proponía que el cambio en el metabolismo de la glutamina producía una carga de amoniaco aumentada al hígado, mientras que la mayoría de las otras teorías se concentran en aspectos diferentes de la función del ciclo de la urea. Véase, por ejemplo, Warter y col., *Revue Neurologique*, 139:753-757 (1983). Puesto que el ciclo de la urea es el mecanismo principal para separar el amoniaco en seres humanos, se cree que la hiperamonemia surge de alguna forma de las interacciones inhibitorias del VPA y/o sus metabolitos con la función y capacidad del ciclo de la urea.

[0272] La prueba de la disfunción del ciclo de la urea en la terapia con VPA viene de una serie de observaciones experimentales y clínicas aparte de elevaciones en el amoniaco del plasma descritas antes. Por ejemplo, Marrini y col., midieron una reducción tanto en la actividad de CPSI inicial como estimulada en animales que no han sufrido nefrectomía después de una carga de aminoácidos y VPA (Marrini y col., *Neurology* 38:365-371 (1988)). Marrini y col. también observaron que las ratas que habían sufrido nefrectomía a las que se inyectó una carga de aminoácidos y VPA también desarrollaron hiperamonemia. Otro grupo, Castro-Gago y col., midieron los aminoácidos del suero en 22 niños epilépticos tratados con VPA y encontraron reducción en el ácido aspártico y la ornitina, implicando una disminución en la eficacia del ciclo de la urea en lugar de un aumento en precursores (Castro-Gago y col., *Childs Neurons System* 6:434-436 (1990)).

[0273] Importancia de la carbamil fosfato sintasa I. Los mecanismos de las deficiencias del ciclo de la urea inducidas por VPA giran en torno a la carbamil fosfato sintasa I (CPSI) mitocondrial. Se encontró que un paciente con toxicidad grave después de sobredosis de VPA tenía 50% de la actividad normal de la CPSI (Bourrier y col., *Prese Medicale* 17:2063-2066 (1988)). Los autores de la invención han observado varios pacientes con deficiencia de CPSI suave que sufrían deterioro cuando se les daba ácido valproico con inversión rápida tras interrupción.

[0274] Función del NAG. El N-acetilglutamato (NAG) es un cofactor alostérico necesario para la CPSI. El NAGA es sintetizado a partir de glutamato y acetil CoA en mitocondrias, con una distribución celular que refleja la del CPSI (Shigesada y col., *Journal of Biological Chemistry* 246: 5588-5595 (1971)). Es sintetizado a partir de glutamato (a partir del catabolismo de aminoácidos) y acetil CoA. Hay varias formas en las que se prevé que una alteración de la disponibilidad del NAG reduzca la actividad del CPSI. Se han observado deficiencias genéticas en la NAG sintetasa, y se sabe que esta enzima es inhibida de forma competitiva por sustratos alternativos tales como el propionil CoA o succinato (Bachmann y col., *New England Journal of Medicine* 304:543 (1981); Kamoun y col., *Lancet* 48 (1987); Coude y col., *J. Clin. Invest.* 64:1544-1551 (1979); Rabier y col., *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 91:456-460 (1979); Rabier y col., *Biochimie* 68:639-647 (1986)). Se ha mostrado experimentalmente que la CPSI es inhibida de una forma competitiva por la presencia de cantidades aumentadas de propionil CoA, y que el tratamiento con VPA produce un aumento de la concentración de propionato en la sangre (Coulter y col., *Lancet* 1 (8181): 1310-1311 (1980); Gruskay y col., *Ped. Res.* 15:475 (1981); Schmidt, R. D., *Clin. Chim. Acta.* 74:39-42 (1977)). Se ha mostrado también que la exposición al VPA disminuye las concentraciones de NAG en hepatocitos intactos, disminuyendo las concentraciones tanto de acetil CoA como de glutamina (Coude y col., *Biochem. J.* 216:233-236 (1983)). La disminución de la concentración de glutamina se atribuye a la inhibición tanto de la piruvato deshidrogenasa como de la piruvato carboxilasa.

[0275] Alternativamente, se ha sugerido que la reducción de la acetil CoA mitocondrial se produce debido a que la CoA se desvía en el tratamiento con VPA a la fabricación de valproil CoA (Becker y col., *Archives of Biochemistry & Biophysics* 223:381-392 (1983)). Es bien conocido que el VP también altera la oxidación de ácidos grasos, con la disminución resultante de acetil CoA (Eadie y col., *Med. Toxicol.* 3:85-106 (1988)). Todos estos mecanismos podrían conducir a una carencia de NAG puesto que se sintetiza a partir de acetil CoA. Dados los efectos del VPA en la

disponibilidad del NAG, se sigue que cualquier cambio en las propiedades de unión del CPSI para el NAG afectarían a su actividad.

[0276] Por lo tanto, este ejemplo establece la experimentación para determinar la correlación entre la presencia o ausencia del polimorfismo de la presente invención en el gen de CPSI con la susceptibilidad a la hiperamonemia usando VPA como un agente modelo para la producción de hiperamonemia. Inicialmente, el ADN genómico se aísla de pacientes que están empezando el tratamiento con ácido valproico, para el genotipado del polimorfismo T1405N de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, tales como la amplificación por PCR y el uso de geles no desnaturizantes. Después del genotipado de estos pacientes, se lleva a cabo para estos pacientes la determinación de aminoácidos y amoniaco antes y después de tratamiento. En particular, se aísla ADN de sangre entera usando el kit QIAmp (Qiagen) descrito en el ejemplo de referencia 1.

[0277] Después, se determina la concentración de VPA total en el plasma por una técnica de inmunoensayo mediado por enzima (EMIT Syva-Behring, San Jose, California en un analizador Syva 30R). Esta técnica usa la unión competitiva para los sitios de unión del anticuerpo de VPA entre el VPA en el plasma del paciente y el que forma complejo con la enzima G6PDH. La liberación del complejo enzimático con VPA del anticuerpo reactiva la enzima, y su actividad se evalúa por la tasa de formación de NADH tras la adición de sustrato. La producción de NADH se controla por espectroscopía a 340 nanómetros (nm). El VPA libre (no unido a proteína) se aísla del plasma usando un dispositivo de filtro de micropartición centrífugo con un corte de exclusión de peso molecular de 3000 Dalton (CENTRIFREE, Aimcon, Beverley, Massachusetts). La concentración de VPA en el ultrafiltrado de plasma se mide como se ha descrito para el VPA total.

[0278] Se analizan las correlaciones entre genotipo y fenotipo de los datos recogidos de pacientes de VPA. Además, se evalúan el fraccionamiento de VPA libre y conjugado para evaluar los efectos en la producción de NAG y disponibilidad. Se prepara esta última comparación dado que hay efectos conocidos del VPA en la disponibilidad del NAG. Por ejemplo, la exposición del VPA se ha mostrado que disminuye las concentraciones de NAG en hepatocitos intactos, disminuyendo las concentraciones tanto de acetil CoA como de glutamina. Véase, Coude y col., *Biochem. J.*, 216:233-236 (1983). Por lo tanto, esta comparación refleja que cambios en las propiedades de unión de la CPSI para el NAG afectan a la actividad de la CPSI.

Ejemplo de referencia 5

Detección de polimorfismos adicionales en CPSI

[0279] Usando las técnicas desarrolladas para el análisis de mutaciones del mensaje de CPSI, se criba en 10 pacientes no relacionados no deficientes en CPSI el polimorfismo adicional en la región codificante. Esto se hace usando transcritos "ilegítimos" de líneas de células linfoblastoides y fibroblastos. Los polimorfismos con un efecto extendido en la población deberían ser evidentes en este tamaño de muestra. Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, el término "polimorfismo" se refiere a la aparición de dos o más secuencias alternativas genéticamente determinadas o alelos en una población. Un marcador polimórfico es el locus en el que se produce la divergencia. Los marcadores preferidos tienen al menos dos alelos, cada uno aparece con una frecuencia mayor que 1%. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Por lo tanto, los marcadores polimórficos proporcionados incluyen polimorfismos de longitud de fragmento de restricción, número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos y repeticiones de tetranucleótidos.

[0280] Se han llevado a cabo una serie de técnicas de detección de "mutación", todas las cuales se basan en cambios detectables en la movilidad del ADN monocatenario no desnaturizado, como describen Summar, M., *J. Inherited Metabolic Disease* 21:30-39 (1998). Los ejemplos de mutaciones de CPSI identificadas por estas técnicas se describen en la figura 3. Debido al gran tamaño del mensaje de CPSI (aproximadamente 5.700 bases) se prefiere un procedimiento para cribar una gran cantidad de ADN en algunas reacciones. La huella de las endonucleasas de restricción (REF) proporciona el cribado de fragmentos de ADN largos, de hasta aproximadamente 2.000 pb, con sensibilidad excelente.

[0281] Las reacciones de transcriptasa inversa (RT) se llevan a cabo usando 1 g de ARN total y un cebador oligo-dT o un cebador de sentido contrario desde el punto medio del mensaje de CPSI. Usando el producto de la RT como molde, se llevan a cabo reacciones de PCR con 4 conjuntos de cebadores diferentes, creando 4 fragmentos que se solapan abarcando la región codificante de 4.600 bases. Se llevan a cabo reacciones de PCR de control con cada conjunto de experimentos, para asegurar que no se amplifica molde contaminante. No se prefiere el ADN genómico

para este estudio debido al tamaño del gen (80.000+ pb), el número de intrones (36) y que no se ha completado la secuenciación de los límites de intrón y exón para la CPSI. Sin embargo, las localizaciones intrónicas se caracterizan gráficamente en la figura 9.

5 **[0282]** Los 4 productos de RT/PCR que se superponen descritos antes se usan para el cribado de mutaciones. El análisis cuidadoso de los mapas de restricción conduce a la selección de tres enzimas de restricción para cada fragmento, que los cortan en trozos en el intervalo de 100-250 pb. Los fragmentos de este tamaño son ideales para el análisis del polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). Las enzimas se seleccionan de modo que cada fragmento se puede evaluar uniformemente a lo largo de su longitud.

10

[0283] Antes de la digestión, los productos de la PCR se purifican por electroforesis en gel y se aíslan de los portaobjetos de agarosa. Después de 3 horas, los fragmentos digeridos se hacen precipitar en etanol. Estos fragmentos se separan en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6% a 4 °C, con ejecución a 35 w constantes. Estas condiciones maximizan la detección de cambios conformacionales en los fragmentos monocatenarios, como describen Liu, Q. y Sommer, S. S., *Biotechniques* 18(3):470-477 (1995). La detección del ADN se hace por tinción con plata y los geles se puntúan para los desplazamientos de movilidad. Basándose en la situación de cualquiera de los fragmentos desplazados, el análisis de secuencia directa del producto de RT/PCR se lleva a cabo usando un protocolo de secuenciación cíclica. Para eliminar la posibilidad de una mutación que resulta de errores de la polimerasa Taq, se amplifica un producto de RT reciente y se secuencian en cada caso. Las 4.600 bases enteras del mensaje codificante se criban rápidamente, de esta forma cualquier región que contiene áreas que no están claras es secuenciada, buscando cambios en la secuencia esperada.

[0284] Los productos de digestión de restricción de cada fragmento de RT/PCR se aíslan. Después, estos fragmentos individuales se llevan a un gel no desnaturizante frente a la digestión combinada como se ha descrito antes. Mediante la caracterización del patrón de fragmentos de esta forma, se identifican fácilmente las partes del mensaje de la CPSI implicadas en cualquier desplazamiento de movilidad observado.

[0285] Se lleva a cabo el genotipado de los polimorfismos detectados en estos experimentos frente al panel de progenitores del Centre d'Etude Polymorphism Humanise (CEPH) para establecer la frecuencia. Se examina el efecto de todos los cambios en el uso de codones y los que dan mutaciones de sentido alterado se examinan usando los datos de caracterización de la CPSI descritos en el presente documento.

[0286] Las técnicas descritas en el ejemplo 1 se usan para expresar mutantes de sitio dirigido que contienen estos cambios. Usando este sistema se observan los efectos in vitro de los cambios en la producción y actividad de CPSI.

35

[0287] Se detectó un polimorfismo T344A en CPSI. Se usaron cebadores oligonucleótidos del décimo exón (U1119: tactgctcagaatcatggc - SEQ ID NO: 17) y el intrón (L110+37: tcatcaccaactgaacagg - SEQ ID NO: 18) para amplificar un fragmento de 91 pb que contiene el cambio. Las condiciones de ciclo de la PCR eran: 35 ciclos de 1 minuto de reasociación a 59 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C y 1 minuto de desnaturización a 94 °C. Los pacientes se clasificaron según tuvieran los genotipos de SNP homocigotos AA o TT, o los heterocigotos (AT). La distribución en la población adulta de este polimorfismo es 35% AA, 44% AT, y 21% TT.

[0288] El polimorfismo 118-CTT también se detectó en CPSI. Se usaron cebadores oligonucleótidos de la región 5' no traducida (U5'-74: ggtaagagaaggaggagctg - SEQ ID NO: 19) y el intrón (L175: aaccagtcttcagtgtcctca - SEQ ID NO: 20) para amplificar un fragmento de 249 pb que contiene el cambio. Las condiciones de ciclo de la PCR eran: 35 ciclos de 1 minuto de reasociación a 59 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C y 1 minuto de desnaturización a 94 °C. Los pacientes se clasificaron según tuvieran un genotipo homocigoto con la inserción o eliminación del trinucleótido 118, o heterocigoto. La distribución en la población adulta de este polimorfismo es 34% CTT-, 43% heterocigoto, y 23% CTT+.

50

Ejemplo de referencia 6

Alteraciones bioquímicas y genéticas en la carbamil fosfato sintasa I en pacientes neonatales con hipertensión pulmonar persistente

55

[0289] Este ejemplo investiga la función de la limitación de la producción de NO endógeno en la patogénesis de la hipertensión pulmonar persistente (PPHN) en el neonato a término. El NO endógeno es el producto de la arginina intermedia del ciclo de la urea. La producción de arginina depende de la enzima determinante de la velocidad del ciclo de la urea, la carbamil fosfato sintasa (CPSI). Los recién nacidos tienen menos de la mitad de la función normal

del ciclo de la urea, haciendo que sean particularmente susceptibles a cambios minoritarios en la forma y función de la enzima. Se ha observado un polimorfismo exónico común (T1405N) en CPSI que afecta al flujo a través de la primera etapa del ciclo de la urea.

- 5 **[0290]** En este ejemplo, se ensayó si los recién nacidos que desarrollaban PPHN tendrían menor cantidad de precursores de NO (arginina y citrulina) que los controles correspondientes. También se analizó si los pacientes de PPHN tienen predominantemente los genotipos de CPSI CC (treonina/treonina) o AC (asparagina/treonina) que están asociados con menor función que el genotipo de CPSI AA (asparagina/asparagina).
- 10 **[0291]** Procedimientos. Se reclutaron 47 recién nacidos >2 kg, >35 semanas y < 72 horas de edad, que fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos neonatal de Vanderbilt con (n=22) y sin (n=25) hipertensión pulmonar documentada por ecocardiograma. Se registraron mediciones clínicamente importantes de la gravedad de la dificultad respiratoria. Se obtuvieron los niveles de amoníaco y los perfiles de aminoácidos del plasma. Se determinaron los genotipos llevando el ADN amplificado por PCR a geles de MDE no desnaturizantes.
- 15 **[0292]** Resultados. Los pacientes que desarrollaron PPHN tenían una arginina media de 21,5 $\mu\text{mol/l}$, mientras que los que no la desarrollaron tenían una media de 38,3 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0,0004$). Las medias de la citrulina eran 6,1 $\mu\text{mol/l}$ y 10,3 $\mu\text{mol/l}$ respectivamente ($p=0,02$). Los niveles de arginina y citrulina se correlacionaron inversamente con la gravedad de la hipoxemia medido por el índice de oxigenación, días de ventilación mecánica y días que requerían O_2 complementario. El análisis del genotipo de los pacientes de PPHN para T1405N mostró 5 CC, 17 AC, y 0 AA, mientras que los controles tenían 7 CC, 16 AC, y 2 AA (Chi-cuadrado $p=0,005$ usando la frecuencia de alelos en la población esperada). Los bebés con el genotipo CC tenían menores medias de arginina y citrulina (21,5 $\mu\text{mol/l}$ y 5,8 $\mu\text{mol/l}$) que los bebés con el genotipo AA (31,5 $\mu\text{mol/l}$ y 13,5 $\mu\text{mol/l}$) de acuerdo con una diferencia funcional entre las dos formas de la enzima.
- 20 **[0293]** Conclusiones. Este ejemplo muestra que el desarrollo de PPHN en recién nacidos enfermos está asociado con la disponibilidad inadecuada de los productos intermedios arginina y citrulina del ciclo de la urea. El polimorfismo T1405N en el ADN de CPSI conduce a la función enzimática disminuida y posteriores niveles menores de precursores de NO.
- 25 **[0294]** Discusión. La carbamil fosfato sintasa (CPS I) cataliza la etapa determinante de la velocidad en el ciclo de la urea, determinando de esta forma los niveles tisulares de los productos intermedios del ciclo de la urea que incluyen arginina y citrulina. Como se describe en el presente documento, un polimorfismo exónico de C a A ampliamente distribuido en el gen de CPSI cambia una treonina conservada por una asparagina en la posición 1405 cerca del dominio de unión del N-acetilglutamato crítico. Los datos han mostrado que la versión de la CPSI que contiene asparagina presenta cinéticas más eficientes en los estudios de función enzimática.
- 30 **[0295]** El alelo T1405N presenta 50% de heterocigosidad y parece que es una variante silenciosa en adultos sanos normales. Sin embargo, las consecuencias del cambio cualitativo pueden ser desenmascaradas por condiciones estresantes. Se describe en los ejemplos de referencia 1-2 y el ejemplo 1, que en los adultos expuestos a quimioterapia de alta dosis en la preparación para trasplante de médula ósea, la enzima que contiene treonina produce niveles inadecuados de arginina y citrulina y está asociado con una incidencia mayor de enfermedad venooclusiva hepática, lesión pulmonar aguda y muerte. Puesto que el óxido nítrico (NO) es generado en células endoteliales a partir de L-arginina, por la óxido nítrico sintetasa (NOS), niveles disminuidos de productos intermedios del ciclo de la urea podrían predisponer a alteraciones en el tono vascular, limitando la producción de NO endógeno.
- 35 **[0296]** En el estudio de cohorte prospectivo de este ejemplo, se investigó la posibilidad de que pudiera estar implicado un procedimiento similar en la patogénesis de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN). El NO producido de forma endógena funciona en la regulación de la resistencia vascular pulmonar y en la transición de la circulación fetal a la neonatal. Lipsitz, E. C., y col., *J Pediatr Surg* (1996) 31:137-140; Abman, S.H., y col., *Am J Physiol* (1990) 259:H1921-H1927. Entre las 20 semanas de gestación y el nacimiento a término, la producción de CPSI y función son menores de 50% de los niveles del adulto. Esta deficiencia fisiológica podría desenmascarar el efecto de la mutación del gen T1405N, en particular si está acoplado con otros estreses neonatales que afecten a la función hepática; por ejemplo, asfixia o septicemia.
- 40 **[0297]** Los pacientes elegibles para este estudio incluían recién nacidos adecuadamente desarrollados de 35 semanas de gestación y 2 kg de peso en el nacimiento, que fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos neonatal del Vanderbilt University Medical Center (NICU) entre el 1 de julio de 1999 y el 29 de febrero de 2000, por síntomas de dificultad respiratoria. Se excluyeron los bebés con múltiples anomalías congénitas, síndromes
- 45

genéticos conocidos, y causas anatómicas de hipertensión pulmonar (hernia diafragmática congénita, síndrome de Potter, distrofia asfixiante torácica, etc.). Se obtuvo el consentimiento parental para todos los reclutados. Se extrajo 3 cc de sangre de 51 recién nacidos en las primeras 72 horas de vida para los perfiles de aminoácidos plasmáticos, niveles de amoniaco y BUN, determinación de metabolitos del óxido nítrico, y genotipado de CPSI. La sangre se extrajo antes de transfusión de sangre, ingestión de proteínas enteral o parenteral, administración de óxido nítrico inhalado o canulación de ECMO.

[0298] Los datos recogidos de los reclutados incluían (1) características iniciales (peso en el nacimiento, edad gestacional, sexo, raza, puntuaciones de Apgar, diagnóstico primario y cualquier complicación pulmonar, y la edad postnatal en el momento de extracción de la sangre) y (2) mediciones del soporte respiratorio (FiO_2 , MAP, iNO, ECMO) y respuesta clínica (ABG, durante la ventilación mecánica y O_2 complementario, supervivencia). Se usó el índice de oxigenación máximo [$\text{OI} = \text{FiO}_2 \times \text{MAP} / \text{PaO}_2$] como una medida de la gravedad de la dificultad respiratoria. El diagnóstico primario predominante incluía (1) asfixia en el nacimiento: puntuación de Apgar a los 5 min <5 con una acidosis mixta en el primer ABG o gases en sangre del cordón umbilical más evidencia o disfunción neurológica y otras lesiones finales de órganos, (2) síndrome de dificultad respiratoria (RDS): síntomas clínicos de dificultad respiratoria con campos pulmonares en vidrio esmerilado y broncograma aéreo en la radiografía de tórax, además combinado hipercapnia/hipoxia en ABG (Nota: dada la edad gestacional de estos recién nacidos, los bebés con esta imagen podrían haber tenido deficiencia de tensioactivos o neumonía congénita; sin embargo, en ningún caso se había obtenido un cultivo de aspirado traqueal positivo), y (3) síndrome de aspiración de meconio (MAS): historia de teñido de meconio durante el parto, más síntomas clínicos de dificultad respiratoria, hipoxemia, e infiltrados gruesos en la radiografía de tórax.

[0299] Se definía que los bebés tenían hipertensión pulmonar (PPHN) si desarrollaban hipoxemia significativa ($\text{PaO}_2 < 100$ en $100\% \text{O}_2 > 6$ horas) con anatomía intracardiaca normal y evidencia ecocardiográfica de presión arterial pulmonar elevada. Esto último se definió como (1) flujo a través del foramen oval y ductal de derecha a izquierda o bidireccional, o (2) presión arterial pulmonar elevada (>35 mm Hg) basado en evaluación Doppler del chorro de regurgitación tricuspídea leído con triple ocultación.

[0300] Se llevaron a cabo análisis de aminoácidos en muestras de plasma recientes en 47 pacientes. Se preparó un extracto de plasma exento de proteínas por precipitación de proteínas con ácido sulfosalicílico y filtración a través de Acrodisc 4 de $0,45 \mu\text{m}$ (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan). Los aminoácidos se separaron por cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema de 4 componentes de tampón de citrato de litio de fuerza iónica y pH escalonados en un analizador de aminoácidos Beckmann 7300 (Beckmann, Palo Alto, California). La derivatización después de columna de aminoácidos con ninhidrina permitió la detección de aminoácidos primarios a 570 nm , y aminas secundarias a 440 nm . La cuantificación se logró por calibración del instrumento con materiales de referencia estándar (Sigma, St. Louis, Missouri). La citrulina y la arginina se detectaron como índices medibles del flujo de los productos intermedios a través del ciclo de la urea.

[0301] Medición de metabolitos del óxido nítrico (NO_x) del plasma. Se midieron los NO_x del plasma en un subgrupo de pacientes usando reactivos Griess modificados después de separar las proteínas de las muestras e incubarlas con perlas de cadmio para convertir el nitrato en nitrito.

[0302] Detección de SNP. Los cebadores oligonucleótidos dentro del exón 36 (U4295 - SEQ ID NO: 15) y el intrón (LI36 - SEQ ID NO: 16) de CPS1 y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar de forma segura un fragmento de 251 pb que abarca la región que contiene el cambio del ADN genómico, se obtuvieron de preparaciones de sangre entera. Esta combinación de cebadores dio amplificación reproducible usando la polimerasa Taq (Promega) y las siguientes condiciones de ciclos de la PCR: 35 ciclos de 1 min de reasociación a 67°C , 1 min de extensión a 72°C y 1 min de desnaturalización a 94°C . Después de tratamiento con formamida, las muestras se sometieron a electroforesis durante 5 horas a 4°C en un gel de MDE no desnaturalizante (FMC, Rockland, Maine), después se tiñeron con nitrato de plata para detectar fragmentos de ADN. Los pacientes se clasificaron según tuvieran los genotipos de SNP homocigotos CC o AA, o tuvieran los heterocigotos (AC). El genotipado usando electroforesis en gel no desnaturalizante y análisis de secuencia directa dieron resultados idénticos a los descritos antes. Por lo tanto, se determinó que la distribución en la población adulta de este polimorfismo T1405N era 45% CC, 44% AC, y 11% AA.

[0303] Se usó una técnica idéntica a la descrita antes para detectar el polimorfismo T344A. Se usaron cebadores oligonucleótidos del décimo exón (U1119: tactgctcagaatcatggc - SEQ ID NO: 17) y el intrón (LI10+37: tcatccaactgaacagg - SEQ ID NO: 18) para amplificar un fragmento de 91 pb que contiene el cambio. Las condiciones de ciclo de la PCR eran: 35 ciclos de 1 minuto de reasociación a 59°C , 1 minuto de extensión a 72°C y

1 minuto de desnaturalización a 94 °C. Los pacientes se clasificaron según tuvieran los genotipos de SNP homocigotos AA o TT, o tuvieran los heterocigotos (AT). La distribución en la población adulta de este polimorfismo es 35% AA, 44% AT, y 21% TT.

5 **[0304]** Se usó una técnica idéntica a la descrita antes para detectar el polimorfismo 118-CTT. Se usaron cebadores oligonucleótidos de la región 5' no traducida (U5'-74: ggtaagagaaggaggagctg - SEQ ID NO: 19) y el intrón (L175: aaccagtcttcagtgctctca - SEQ ID NO: 20) para amplificar un fragmento de 249 pb que contiene el cambio. Las condiciones de ciclo de la PCR eran: 35 ciclos de 1 minuto de reasociación a 59 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C y 1 minuto de desnaturalización a 94 °C. Los pacientes se clasificaron según tuvieran un genotipo
10 homocigoto con la inserción o eliminación del trinucleótido 118 o lo tuvieran heterocigoto. La distribución en la población adulta de este polimorfismo es 34% CTT-, 43% heterocigoto, y 23% CTT+.

[0305] Se compararon los niveles de amoníaco y aminoácidos del plasma entre los grupos de pacientes usando la prueba T de Student. Se compararon las distribuciones de los genotipos de CPSI a través de los grupos calculando
15 la frecuencia alélica del grupo entero y buscando pruebas del desequilibrio de Hardy-Weinberg en subgrupos específicamente seleccionados usando análisis de Chi-cuadrado. De los 51 recién nacidos originalmente reclutados, 25 desarrollaron PPHN mientras que 26 no la desarrollaron. No había diferencias estadísticamente significativas en las características iniciales de los dos grupos que incluían el peso en el nacimiento, edad gestacional, raza, o edad postnatal en horas de los bebés en el reclutamiento. Sin embargo, había un pequeño predominio de hombres en el
20 grupo de control.

[0306] La distribución de los diagnósticos primarios estaba distribuida uniformemente. En el grupo de PPHN, 5 bebés tenían asfixia en el nacimiento, 9 bebés tenían RDS, 5 bebés tenían síndrome de aspiración de meconio y 6 bebés tenían otros diagnósticos, incluyendo 4 bebés con PPHN primaria. En el grupo de control, 4 bebés tenían
25 asfixia en el nacimiento, 8 bebés tenían RDS, 3 bebés tenían MAS y 11 bebés tenían otros diagnósticos. Los otros diagnósticos incluían taquicardia supraventricular, anemia, traumatismo en el nacimiento y septicemia vírica. Ningún bebé del estudio tenía un cultivo de sangre positivo para bacterias.

[0307] Como se esperaba, los bebés que tenían PPHN que complicaba su patología primaria desarrollaron
30 enfermedad más grave que los controles por algunos criterios clínicos. Ocho de los bebés con PPHN requirieron tratamiento con NO inhalado (iNO), 2 requirieron ECMO, y 2 murieron (un bebé con asfixia y fallo multiorgánico en iNO; otro bebé con displasia capilar alveolar se retiró de la ECMO). Evidentemente, ninguno de los controles se trató con iNO o ECMO; y no hubo mortalidad en el grupo de control.

35 **[0308]** Se excluyeron 3 bebés del grupo de PPHN del análisis. Se consideró que el bebé que se encontró que tenía displasia capilar alveolar en la biopsia pulmonar, tenía etiología anatómica para hipertensión pulmonar. Otro bebé se reclutó equivocadamente con una hernia diafragmática congénita, y el tercero se reclutó a las 119 horas de edad después de haber iniciado la TPN. Un bebé en el grupo de control se excluyó del análisis después de que el análisis de cariotipo pusiera de manifiesto que la etiología de esta hipotonía era el síndrome de Prader-Willi.
40

[0309] Los bebés que desarrollaron PPHN tenían niveles de arginina y citrulina en el suero más bajos en el análisis de aminoácido. El nivel medio de arginina en los casos de PPHN era $21,5 \pm 9,2 \mu\text{mol/l}$, mientras que la arginina media del grupo de control era $38,3 \pm 18,4 \mu\text{mol/l}$ ($p = 0,0004$). La citrulina media en los casos de PPHN era $6,1 \pm 3,6 \mu\text{mol/l}$ comparado con $10,3 \pm 7 \mu\text{mol/l}$ en el grupo de control ($p = 0,02$). No había diferencias significativas
45 en los niveles de otros aminoácidos entre los dos grupos incluyendo glutamina, glicina, alanina, lisina, valina, ornitina y leucina. El nivel total de aminoácidos esenciales (TEAA) era ligeramente menor en los casos de PPHN, aproximadamente $537 \mu\text{mol/l}$ frente a aproximadamente $654 \mu\text{mol/l}$, pero esta diferencia no era estadísticamente significativa ($p = 0,08$), por peso en el nacimiento, edad gestacional, o número de horas de vida posnatal. Se encontró que el nivel de TEAA era significativamente mayor en los 4 bebés cuya sangre se extrajo antes de las 6
50 horas de edad (aproximadamente $1021,5 \mu\text{mol/l}$ frente a aproximadamente $542 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,0026$). Se supone que esta diferencia refleja la terminación reciente del influjo de proteínas parenterales en estos bebés de la circulación placentaria.

[0310] No se encontraron diferencias en los niveles de arginina y citrulina cuando se analizaron por separado las
55 categorías de diagnóstico primario de asfixia, RDS, MAS y "otros". En cada grupo, los bebés con hipertensión pulmonar tendían a tener valores menores, pero los resultados no eran estadísticamente significativos dado el pequeño número de bebés en cada grupo. Por ejemplo, los bebés con asfixia con PPHN tenían una arginina media de aproximadamente $18,5 \mu\text{mol/l}$ comparado con aproximadamente $52,7 \mu\text{mol/l}$ en controles con asfixia ($p = 0,06$) y una citrulina media de aproximadamente $6,8 \mu\text{mol/l}$ comparado con aproximadamente $14,3 \mu\text{mol/l}$ ($p = 0,04$).

- [0311]** Había una relación inversa entre los niveles de arginina y citrulina en el suero y la gravedad de la hipoxemia. Los valores de arginina y citrulina disminuían progresivamente al aumentar el índice de oxigenación, aumentar los días de ventilación mecánica y aumentar los días que requerían oxígeno complementario, peso en el nacimiento, edad gestacional o número de horas de vida posnatal. Los niveles de NH₃ en bebés con PPHN tendían a ser ligeramente más altos en los controles ($54 \pm 18,1 \mu\text{mol/l}$ frente a $45,6 \pm 12 \mu\text{mol/l}$) pero estos valores no eran estadísticamente significativos ($p = 0,08$). En el análisis del genotipo de CPSI T1405N, de los 22 bebés que desarrollaron PPHN, 5 eran CC y 17 eran AC. No había AA en los casos de PPHN. En los 25 controles, había 7 CC, 16 AC y 2 AA. Estas distribuciones de genotipos se compararon entonces calculando la frecuencia alélica esperada para todo el grupo, poniendo de manifiesto pruebas del desequilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de PPHN. En el análisis de Chi-cuadrado, estos dos grupos eran significativamente diferentes entre sí con un p valor = 0,005. De los dos bebés con el genotipo AA, un bebé tenía RDS mientras que el otro sufría de asfisia de nacimiento. Ningún bebé alcanzó nunca un OI 15; ambos estuvieron < 1 semana en el ventilador y < 10 días con oxígeno.
- 15 **[0312]** Los bebés con el genotipo CC tenían niveles medios de arginina de $21,9 \pm 7 \mu\text{mol/l}$ y niveles de citrulina de $5,8 \pm 1,8 \mu\text{mol/l}$ mientras que los bebés con el genotipo AA tenían un nivel medio de arginina de $31,5 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$ y un nivel medio de citrulina de $13,5 \pm 6,4 \text{ mmol/l}$. De nuevo, dado el pequeño número de AA, estos datos no llegan a significación estadística con p valores de 0,1 y 0,006, respectivamente.

20 REFERENCIAS

- [0313]** Las referencias citadas a continuación así como todas las referencias citadas en la memoria descriptiva, complementan, explican, proporcionan unos antecedentes o enseñan la metodología, técnicas y/o composiciones usadas en el presente documento.
- 25 Abman, S. H., et al., Am J Physiol (1990) 259:H1921-H1927.
- Adelman et al., DNA 2:183 (1983).
- 30 Alonso, E. and Rubio, V., European Journal of Biochemistry 229:377-384 (1995).
- Artymiuk, P. J. et al., Nature Struct. Biol. 3:128-132 (1996).
- Bachmann et al., New England Journal of Medicine 304:543 (1981).
- 35 Batshaw ML, Brusilow SW. Annals of Neurology 1982; 11:319-21.
- Bearman SI, Journal of Clinical Oncology 1993; 11:1729-36.
- 40 Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859-1862 (1981).
- Beaumier L, Biomedical & Environmental Sciences 1996; 9:296-315.
- Becker et al., Archives of Biochemistry & Biophysics 223:381-392 (1983).
- 45 Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. Intensive Care Medicine 1994; 20:225-32.
- Blau N, Duran, M., and Blaskovics, M.E. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases
- 50 London: Chapman&Hall Medical, 1996.
- Bourrier et al., Prese Medicale 17:2063-2066 (1988).
- Castillo, L., et al., Pediatr Res (1995) 38:17-24.
- 55 Castillo L, et al., Journal of Biological Chemistry 1989; 264:4038-44.
- Castro-Gago et al., Child Neuro Systems 6:434-436 (1990).

- Cervera, J. et al., *Biochemistry* 35:7247-7255 (1996).
- Cohen PP. *Current Topics in Cellular Regulation* 1981; 18:1-19.
- 5 Coude et al., *Biochem. J.* 216:233-236 (1983).
- Coude et al., *J. Clin. Invest.* 64: 1544-1551 (1979).
- Coulter et al., *Lancet* 1 (8181): 1310-1311 (1980).
- 10 Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5765 (1978).
- Davies et al., *Bone Marrow Transplantation* 17:1119-1125 (1996).
- 15 de Groot, C. J., et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 124:882-888 (1984).
- Eadie et al., *Med. Toxicol.* 3:85-106 (1998).
- Eichenlaub et al., *J. Bacteriol.* 138:559-566 (1979).
- 20 Faber-Langendoen K, et al. *Bone Marrow Transplantation* (1993) 12:12501-7.
- Gribskov et al., *Nucl. Acids. Res.* 14:6745 (1986).
- 25 Gruskay et al., *Ped. Res.* 15:475 (1981).
- Guillou, F., et al. *Proc Natl Acad Sci* 86:8304-8308 (1989).
- Guy, H. I. et al., *Journal of Biological Chemistry* 270:2190-2197 (1995).
- 30 Hauser ER, et al., *New England Journal of Medicine* 1990; 322:1641-5.
- Hebert PC, *Chest* 1993; 104:230-5.
- 35 Howell et al., *Antibodies A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory*, (1988).
- Jackson, M. J. et al., *Annual Review of Genetics* 20:431-464 (1986).
- Jackson MJ, *Annual Review of Genetics* 1986; 20:431-64.
- 40 Javid-Majd et al., *Biochemistry* 35:14362-14369 (1996).
- Jones RJ, et al. *Transplantation* 1987; 44:778-83.
- 45 Kamoun et al., *Lancet* 48 (1987).
- Kinsella, J. P., et al., *Lancet* (1992) 340:819-820.
- Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982).
- 50 Lagace, M. et al., *Journal of Biological Chemistry* 262:10415-10418 (1987).
- Lipsitz, E. C. , et al., *J Pediatr Surg* (1996) 31:137-140.
- 55 Liu, Q. and Sommer, S. S., *Biotechniques* 18(3):470-477 (1995).
- Maniatis et. al. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., p 280-281 (1982).
- Marrini et al., *Neurology* 38:365-371 (1988).

- Marshall JC, et al., *Critical Care Medicine* (1995) 23:1638-52.
- Matuschak, G. M., *Clinics in Chest Medicine* (1996) 17:83-98.
- 5 Matuschak, G. M. and Rinaldo, J. E., *Chest* (1988) 94:400-6.
- Matuschak et al., *American Review of Respiratory Disease* 1990; 141:1296-306.
- 10 McCaffrey, M. J., et al., *Biol Neonate* (1995) 67:240-243.
- McDonald, G. B., et al., *Annals of Internal Medicine* 1993; 118:255-67.
- Meister, A., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 62:315-374 (1989).
- 15 Messing et al., *Third Cleveland Symposium on Macro Molecular and Recombinant DNA* Ed. Walton, A., (Elsevier, Amsterdam) (1981).
- 20 Mitchell RB, Wagner JE, Karp JE, et al. *American Journal of Medicine* 1988; 85:662-7.
- Mitchell et al., *Amer. J. Med.*85:662-667 (1988).
- Moncada S, Higgs A. *New England Journal of Medicine* 1993; 329:2002-12.
- 25 Moorman, A. F. et al. *Histochemical Journal* 22:457-468 (1990).
- Needleman et al., *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970).
- 30 Nuzum, C. T. and Snodgrass, P. J., *Science* 1971; 172:1042-3.
- Nyunoya, H., et al., *Journal of Biological Chemistry* 260:9346-9356 (1985).
- Palmer RMJ, et al., *Biochem Biophys Res Commun* (1988) 153:1251-1256.
- 35 PCR. *A Practical Approach*, ILR Press, Eds. McPherson, et al. (1992).
- Pierson, D.L., *J. Biochem. Biophys. Methods* 3:31-37 (1980).
- 40 Price, K. J., et al., *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 1998; 158:876-84.
- Rabier et al., *Biochem. & Biophys. Research Comm.* 91:456-460 (1979).
- Rabier et al., *Biochimie* 68:639-647 (1986).
- 45 Raiha, N. C. R. and Suihkonen, J. *Acta Paediatrica Scand* 57:121-127 (1968).
- Richardson, P. and Bearman, S. I., *Leukemia & Lymphoma* (1998) 31:267-77.
- 50 Rinaldo JE, et al., *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 1994; 11:625-30.
- Roberts, J. D., et al., *Lancet* (1992) 340:818-819.
- Rodriguez-Aparicio, L. B. et al., *Biochemistry* 28:3070-3074 (1989).
- 55 Rubinfeld GD, Crawford SW. *Annals of Internal Medicine* 1996; 125:625-33.
- Rubio, V. and Grisolia, S., *Enzyme* 26:233-239 (1981).

Saiki et al., *Bio/Technology* 3:1008-1012 (1985).

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) (1989).

5 Schmidt, R. D., *Clin. Chim. Acta.* 74:39-42 (1977).

Schwartz et al., eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp.

10 357-358 (1979).

Shulman HM, et al., *Hepatology* 1994; 19:1171-81.

Smith et al., *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981).

15 Stapleton et al., *Biochemistry* 35:14352-14361 (1996).

Summar ML. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1998; 21 Suppl 1:30-9.

20 Summar, M., *J. Inherited Metabolic Disease* 21:30-39 (1998).

Summar ML, et al., *Cytogenetics & Cell Genetics* 1995; 71:266-7.

Takiguchi MaM, M., *Biochem J.* (1995) 312:649-659.

25 Toh, H. et al., *European Journal of Biochemistry* 215:687-696 (1993).

Tse et al., *American Journal of Hematology* 38:140-141 (1991).

30 U.S. Patent No. 5,399,346

U.S. Patent No. 5,162,215

U.S. Patent No. 5,279,833

35 U.S. Patent No. 5,643,567

U.S. Patent No. 4,683,202

40 U.S. Patent No. 4,683,195

U.S. Patent No. 5,286,634

U.S. Patent No. 5,646,008

45 U.S. Patent No. 4,196,265

U.S. Patent No. 5,489,742

50 U.S. Patent No. 5,550,316

U.S. Patent No. 5,573,933

U.S. Patent No. 5,614,396

55 U.S. Patent No. 5,625,125

U.S. Patent No. 5,641,484

U.S. Patent No. 5,648,061

U.S. Patent No. 5,651,964

5 U.S. Patent No. 4,965,188

U.S. Patent No. 4,769,331

U.S. Patent No. 5,741,957

10

U.S. Patent No. 4,458,066

U.S. Patent No. 4,554,101

15 U.S. Patent No. 4,736,866

van den Hoff, M. J. et al, Journal of Molecular Evolution 41:813-832 (1995). Vosatka RJ, et al., Biol Neonate (1994)

66:65-70.

20

Warter et al., Revue Neurologique 139:753-757 (1983).

Wingard JR, et al. Bone Marrow Transplantation 1989; 4:685-9.

25 Zamora, S. A., et al., Crit Care Med (1998) 26: 1271-1276.

[0314] Se entenderá que diferentes detalles de la invención se pueden cambiar sin salirse del alcance de la invención. Además, la descripción anterior tiene solo el propósito de ilustrar y no el propósito de limitar la invención que está definida por las reivindicaciones.

30

[0315] Se describe en el presente documento lo siguiente (no de acuerdo con la presente invención):

1. Un procedimiento de cribado de la susceptibilidad a la función subóptima del ciclo de la urea en un sujeto, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

35

(a) obtener una muestra de ácido nucleico del sujeto; y

(b) detectar un polimorfismo de un gen de la carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en la muestra de ácido nucleico del sujeto, indicando la presencia del polimorfismo la susceptibilidad del sujeto a la función subóptima del ciclo de la urea.

40

2. El procedimiento de la realización 1, en el que la susceptibilidad del sujeto a la función subóptima del ciclo de la urea se caracteriza además como susceptibilidad a la hiperamonemia o menor producción de arginina.

45 3. El procedimiento de la realización 1, en el que el polimorfismo del polipéptido de la carbamil fosfato sintasa I comprende una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.

4. El procedimiento de la realización 3, en el que el polimorfismo del polipéptido de la carbamil fosfato sintasa I comprende una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.

50

5. El procedimiento de la realización 4, en el que la transversión de C a A en el nucleótido 4340 del ADNc que corresponde al gen de CPSI, comprende además un cambio en el código de triplete de AAC a ACC, que codifica un polipéptido de CPSI que tiene un resto treonina en el aminoácido 1405.

55 6. El procedimiento de la realización 1, en el que el polimorfismo se detecta por amplificación de un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto, usando una técnica de amplificación.

7. El procedimiento de la realización 6, en el que el polimorfismo se detecta por amplificación de un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto usando una pareja de oligonucleótidos, en el que un primer

oligonucleótido de la pareja híbrida con una primera parte del gen de CPSI, en el que la primera parte incluye el polimorfismo del gen de CPSI, y en el que el segundo de la pareja de oligonucleótidos híbrida con una segunda parte del gen de CPSI que es adyacente a la primera parte.

- 5 8. El procedimiento de la realización 5, en el que la primera parte del gen de CPSI incluye el exón 36.
9. El procedimiento de la realización 8, en el que la primera parte del gen de CPSI incluye el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 10 10. El procedimiento de la realización 7, en el que el primer y el segundo oligonucleótidos comprende cada uno un marcador detectable, y en el que el marcador del primer oligonucleótido se distingue del marcador del segundo oligonucleótido.
11. El procedimiento de la realización 10, en el que dicho primer marcador de dicho primer oligonucleótido es un radiomarcador y en el que dicho marcador de dicho segundo oligonucleótido es un marcador de biotina.
- 15 12. El procedimiento de la realización 1, en el que el polimorfismo se detecta por secuenciación de un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto.
- 20 13. El procedimiento de la realización 12, en el que la secuenciación comprende la secuenciación didesoxi.
14. El procedimiento de la realización 1, en el que la etapa de detección del polimorfismo se detecta poniendo en contacto un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto con un reactivo que detecta la presencia de un polimorfismo de CPSI y detectando el reactivo.
- 25 15. El procedimiento de la realización 14, en el que el reactivo detecta una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.
16. El procedimiento de la realización 15, en el que el reactivo detecta una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 30 17. El procedimiento de la realización 2, en el que la hiperamonemia se describe además como hiperamonemia asociada con la exposición del sujeto a una toxina.
- 35 18. El procedimiento de la realización 17, en el que la exposición del sujeto a una toxina comprende además exposición a alcohol, exposición a medicación, terapia por trasplante de médula ósea, tratamiento con ácido valproico o combinaciones de los mismos.
19. El procedimiento de la realización 1, en el que el sujeto es un sujeto humano.
- 40 20. Un procedimiento de cribado de la susceptibilidad a toxicidad en el trasplante de médula ósea en un candidato para un trasplante de médula ósea, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 45 (a) obtener una muestra de ácido nucleico del candidato; y
- (b) detectar un polimorfismo de un gen de la carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en la muestra de ácido nucleico del candidato, indicando la presencia del polimorfismo la susceptibilidad del candidato a la toxicidad en el trasplante de médula ósea.
- 50 21. El procedimiento de la realización 20, en el que el polimorfismo del polipéptido de la carbamil fosfato sintasa I comprende una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.
22. El procedimiento de la realización 21, en el que el polimorfismo del polipéptido de la carbamil fosfato sintasa I comprende una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 55 23. El procedimiento de la realización 22, en el que la transversión de C a A en el nucleótido 4340 del ADNc que corresponde al gen de CPSI, comprende además un cambio en el código de triplete de AAC a ACC, que codifica un polipéptido de CPSI que tiene un resto treonina en el aminoácido 1405.

24. El procedimiento de la realización 20, en el que el polimorfismo se detecta por amplificación de un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto, usando una técnica de amplificación.
25. El procedimiento de la realización 24, en el que el polimorfismo se detecta por amplificación de un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto usando una pareja de oligonucleótidos, en el que un primer oligonucleótido de la pareja hibrida con una primera parte del gen de CPSI, en el que la primera parte incluye el polimorfismo del gen de CPSI, y en el que el segundo de la pareja de oligonucleótidos hibrida con una segunda parte del gen de CPSI que es adyacente a la primera parte.
- 10 26. El procedimiento de la realización 26, en el que la primera parte del gen de CPSI incluye el exón 36.
27. El procedimiento de la realización 26, en el que la primera parte del gen de CPSI incluye el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 15 28. El procedimiento de la realización 25, en el que el primer y el segundo oligonucleótidos comprende cada uno un marcador detectable, y en el que el marcador del primer oligonucleótido se distingue del marcador del segundo oligonucleótido.
29. El procedimiento de la realización 28, en el que dicho primer marcador de dicho primer oligonucleótido es un radiomarcador y en el que dicho marcador de dicho segundo oligonucleótido es un marcador de biotina.
- 20 30. El procedimiento de la realización 20, en el que el polimorfismo se detecta por secuenciación de un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto.
- 25 31. El procedimiento de la realización 20, en el que la secuenciación comprende la secuenciación didesoxi.
32. El procedimiento de la realización 20, en el que la etapa de detección del polimorfismo se detecta poniendo en contacto un ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico del sujeto con un reactivo que detecta la presencia de un polimorfismo de CPSI y detectando el reactivo.
- 30 33. El procedimiento de la realización 32, en el que el reactivo detecta una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.
34. El procedimiento de la realización 33, en el que el reactivo detecta una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 35 35. El procedimiento de la realización 20, en el que la toxicidad en el trasplante de médula ósea es la enfermedad venooclusiva hepática.
- 40 36. El procedimiento de la realización 20, en el que el candidato es un candidato humano.
37. Una pareja de oligonucleótidos, en el que un primer oligonucleótido de la pareja hibrida con una primera parte del gen de CPSI, en el que la primera parte incluye el polimorfismo del gen de CPSI, y en el que el segundo de la pareja de oligonucleótidos hibrida con una segunda parte del gen de CPSI que es adyacente a la primera parte.
- 45 38. La pareja de oligonucleótidos de la realización 37, en la que la primera parte del gen de CPSI incluye el exón 36.
39. La pareja de oligonucleótidos de la realización 38, en la que la primera parte del gen de CPSI incluye el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 50 40. La pareja de oligonucleótidos de la realización 37, en la que dicho primer y el segundo oligonucleótidos comprende cada uno un marcador detectable, y en el que dicho marcador de dicho primer oligonucleótido se distingue de dicho marcador de dicho segundo oligonucleótido.
- 55 41. La pareja de oligonucleótidos de la realización 40, en el que dicho marcador de dicho primer oligonucleótido es un radiomarcador y en el que dicho marcador de dicho segundo oligonucleótido es un marcador de biotina.
42. Un conjunto de cebadores oligonucleótidos que comprende un cebador de sentido contrario y un cebador de sentido directo, en el que dicho conjunto de cebadores oligonucleótidos es adecuado para amplificar una parte del

gen de CPSI, en el que la parte incluye un polimorfismo del gen de CPSI.

43. El conjunto de oligonucleótidos de la realización 42, en el que la parte del gen de CPSI incluye el exón 36.

5 44. El conjunto de oligonucleótidos de la realización 43, en la que la primera parte del gen de CPSI incluye el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.

45. El conjunto de oligonucleótidos de la realización 42, en el que dicho cebador de sentido contrario tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10; y
10 en el que dicho cebador de sentido directo tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

46. Un kit para detectar un polimorfismo en un gen que codifica la carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en un sujeto, comprendiendo el kit:

15

(a) un reactivo para detectar la presencia de un polimorfismo del gen de CPSI en una muestra de ácido nucleico del sujeto; y

(b) un recipiente para el reactivo.

20

47. El kit de la realización 46, en el que el reactivo para detectar la presencia del polimorfismo del gen de CPSI comprende un reactivo que detecta una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.

48. El kit de la realización 47, en el que el reactivo para detectar la presencia del polimorfismo del gen de CPSI
25 comprende un reactivo que detecta una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.

49. El kit de la realización 46, que además comprende medios para amplificar una molécula de ácido nucleico que contiene un polimorfismo del gen de CPSI.

30

50. El kit de la realización 49, en el que el medio de amplificación incluye una enzima polimerasa adecuada para usar en una reacción en cadena de la polimerasa y una pareja de oligonucleótidos.

51. El kit de la realización 46, en el que un primer oligonucleótido de la pareja de oligonucleótidos hibrida con una
35 primera parte del gen de CPSI, en el que la primera parte incluye el polimorfismo del gen de CPSI, y en el que el segundo de la pareja de oligonucleótidos hibrida con una segunda parte del gen de CPSI que es adyacente a la primera parte.

52. El kit de la realización 51, en la que la primera parte del gen de CPSI incluye el exón 36.

40

53. El kit de la realización 52, en la que la primera parte del gen de CPSI incluye el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.

54. El kit de la realización 46, que además comprende medios para extraer una muestra de ácido nucleico de una
45 muestra biológica obtenida de un sujeto.

55. Un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I (CPSI) humana biológicamente activo, aislado y purificado, que tiene una transversión de treonina a asparagina en un dominio alostérico del polipéptido.

50 56. El polipéptido de la realización 55, que además se caracteriza como un polipéptido recombinante.

57. El polipéptido de la realización 55, en el que el polipéptido de carbamil fosfato sintasa comprende un aminoácido esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

55 58. El polipéptido de la realización 55, modificado para ser una forma marcada de manera detectable.

59. Un anticuerpo aislado y purificado capaz de unirse con preferencia al polipéptido de la realización 55.

60. El anticuerpo de la realización 59, caracterizado además como un anticuerpo monoclonal o como un anticuerpo

policlonal.

61. Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 60.

5 62. Una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I (CPSI) humana biológicamente activo que tiene una transversión de treonina a asparagina en un dominio alostérico del polipéptido.

10 63. La molécula de ácido nucleico de la realización 62, caracterizada además como un ADNc aislado y purificado que corresponde a un gen de CPSI natural y que tiene una transversión de C a A en el nucleótido 4340 que cambia un codón aquí de ACC a AAC.

15 64. La molécula de ácido nucleico de la realización 63, en la que el polipéptido de CPSI codificado comprende un aminoácido como se expone esencialmente en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

65. La molécula de ácido nucleico de la realización 64, definida además como que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la CPSI como se expone esencialmente en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13.

20 66. La molécula de ácido nucleico de la realización 65, caracterizada además como una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:

25 (a) una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida con una secuencia de ácido nucleico esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, en condiciones restrictivas de lavado representadas por una solución de lavado que tiene una concentración salina aproximadamente 200 mM y una temperatura de lavado de al menos aproximadamente 45 °C, y que codifica un polipéptido de CPSI; y

30 (b) una molécula de ácido nucleico aislada que difiere de la molécula de ácido nucleico aislada de (a) anterior en la secuencia de nucleótidos, debido a la degeneración del código genético, y que codifica una polipéptido de CPSI codificado por la molécula de ácido nucleico aislada de (a) anterior.

67. La molécula de ácido nucleico de la realización 62, definida además como una molécula de ADN.

35 68. La molécula de ácido nucleico de la realización 62, en la que un segmento de la misma que codifica la CPSI está situado bajo el control de un promotor.

69. La molécula de ácido nucleico de la realización 62, que además comprende un vector recombinante.

40 70. La molécula de ácido nucleico de la realización 69, en la que el vector es un vector de expresión recombinante.

71. Una célula hospedante recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 62.

45 72. La célula hospedante recombinante de la reivindicación 71, en la que la célula hospedante es una célula procariota o es una célula eucariota.

73. Un procedimiento de preparación de un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I, que comprende: transformar una célula con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 62 para producir un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.

50 74. Un procedimiento de detección en una muestra de un ARN que codifica el polipéptido de carbamil fosfato sintasa I codificado por el ácido nucleico de la reivindicación 62, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

55 (a) poner en contacto dicha muestra en condiciones de hibridación con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 62 para formar un dúplex; y

(b) detectar la presencia de dicho dúplex.

75. Un procedimiento de detección de una molécula de ADN que codifica un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) hibridar las moléculas de ADN con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 62 para formar un dúplex; y
- (b) detectar la presencia de dicho dúplex.
- 5 76. Un procedimiento de producción de un anticuerpo inmunorreactivo con un polipéptido de carbamil fosfato sintasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) transfectar una célula hospedante recombinante con una molécula de ácido nucleico de la realización 62, que
10 codifica un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I;
- (b) cultivar la célula hospedante en condiciones suficientes para la expresión del polipéptido;
- (c) recuperar el polipéptido; y
15 (d) preparar el anticuerpo contra el polipéptido.
77. El procedimiento de la realización 76, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.
20
78. El procedimiento de la realización 76, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13.
- 25 79. Un anticuerpo producido por el procedimiento de la realización 76.
80. Un procedimiento de detección de un polipéptido de carbamil fosfato sintasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 30 (a) hacer inmunorreaccionar el polipéptido con un anticuerpo preparado de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 76 para formar conjugado de anticuerpo-polipéptido; y
- (b) detectar el conjugado.
- 35 81. Un kit de ensayo para detectar la presencia de un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I en una muestra biológica, comprendiendo el kit un primer recipiente que contiene un primer anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I de la realización 55, en el que el primer anticuerpo está presente en una cantidad suficiente para llevar a cabo al menos un ensayo.
- 40 82. El kit de ensayo de la realización 81, que además comprende un segundo recipiente que contiene un segundo anticuerpo que inmunorreacciona con el primer anticuerpo.
83. El kit de ensayo de la realización 81, en el que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo comprenden anticuerpos monoclonales.
45
84. El kit de ensayo de la realización 81, en el que el primer anticuerpo se fija a un soporte sólido.
85. El kit de ensayo de la realización 81, en el que el primer y segundo anticuerpos comprende cada uno un indicador.
50
86. El kit de ensayo de la realización 85, en el que el indicador es un marcador radiactivo o una enzima.
87. Un kit de ensayo para detectar la presencia en una muestra biológica de un anticuerpo inmunorreactivo con un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I, comprendiendo el kit un primer recipiente que contiene un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I de la realización 55 que inmunorreacciona con el anticuerpo, con el polipéptido presente en una cantidad suficiente para llevar a cabo al menos un ensayo.
88. Un kit de ensayo para detectar la presencia en muestras biológicas de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de carbamil fosfato sintasa I, comprendiendo el kit un primer recipiente que contiene una

molécula de ácido nucleico idéntica o complementaria a una molécula de al menos 10 bases de nucleótidos contiguas de la molécula de ácido nucleico de la realización 62.

5 89. Un animal no humano transgénico que tiene incorporado en su genoma una molécula de ácido nucleico de la realización 88, estando presente el segmento de ácido nucleico en dicho genoma en un número de copias eficaz para conferir expresión en el animal de un polipéptido de CPSI.

10 90. El animal no humano transgénico de la realización 89, en el que la expresión del polipéptido de CPSI se confiere en un tejido hepático del animal.

15 91. Un procedimiento para potenciar el metabolismo del amoniaco en un sujeto vertebrado, comprendiendo el procedimiento introducir en un tejido en dicho sujeto vertebrado, asociado con el metabolismo del amoniaco una construcción que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico de CPSI operativamente unido a un promotor, en el que la producción del producto génico de CPSI produce el metabolismo potenciado del amoniaco.

92. El procedimiento de la realización 91, en el que la construcción comprende además un vector seleccionado del grupo que consiste en un vector plasmídico o un vector vírico.

20 93. El procedimiento de la realización 92, en el que la construcción comprende además un complejo liposómico.

94. El procedimiento de la realización 91, en el que el producto génico de CPSI comprende una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

25 95. El procedimiento de la realización 91, en el que la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en:

30 (a) una secuencia de ADN esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13 o sus cadenas complementarias;

35 (b) una secuencia de ADN que hibrida con una secuencia de ácido nucleico esencialmente como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, en condiciones de lavado restrictivas representadas por una solución de lavado que tiene una concentración salina aproximadamente 200 mM y una temperatura de lavado de al menos aproximadamente 45 °C, y que codifica un polipéptido de CPSI; y

40 (b) una secuencia de ADN que difiere de una molécula de ácido nucleico aislada de (a) o (b) anterior, debido a la degeneración del código genético, y que codifica una polipéptido de CPSI codificado por la molécula de ácido nucleico aislada de (a) o (b) anterior.

45 96. Un procedimiento de tratamiento o prevención de la función subóptima del ciclo de la urea en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un precursor de óxido nítrico, por el cual se lleva a cabo el tratamiento o prevención de la función subóptima del ciclo de la urea.

97. El procedimiento de la realización 96, en el que la función subóptima del ciclo de la urea comprende además hiperamonemia o producción de arginina disminuida.

50 98. El procedimiento de la realización 96, en el que el sujeto padece un trastorno asociado con la función subóptima del ciclo de la urea o en el que el sujeto se expone o se va a exponer a un estímulo ambiental asociado con la función subóptima del ciclo de la urea.

55 99. El procedimiento de la realización 98, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en hepatitis, esclerosis, hipertensión pulmonar, toxicidad en el trasplante de médula ósea en un sujeto que se somete a trasplante de médula ósea y combinaciones de los mismos.

100. El procedimiento de la realización 98, en el que el estímulo ambiental se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, cirugía cardíaca, estrés oxidativo aumentado, trasplante de médula ósea y combinaciones de los mismos.

101. El procedimiento de la realización 96, en el que el precursor del óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en citrulina, arginina y combinaciones de los mismos.
- 5 102. El procedimiento de la realización 96, en el que el precursor del óxido nítrico se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg.
103. El procedimiento de la realización 102, en el que el precursor del óxido nítrico se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg.
- 10 104. El procedimiento de la realización 103, en el que el precursor del óxido nítrico se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg.
105. El procedimiento de la realización 96, en el que el sujeto es un ser humano.
- 15 106. El procedimiento de la realización 96, que además comprende la etapa de detectar inicialmente un polimorfismo de un gen de carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en el sujeto.
107. El procedimiento de la realización 106, en el que el polimorfismo del polipéptido de carbamil fosfato sintasa comprende una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.
- 20 108. El procedimiento de la realización 107, en el que el polimorfismo del polipéptido de carbamil fosfato sintasa comprende una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.
- 25 109. El procedimiento de la realización 108, en el que la transversión de C a A en el nucleótido 4340 del ADNc que corresponde al gen de CPSI, comprende además un cambio en el código de triplete de AAC a ACC, que codifica un polipéptido de CPSI que tiene un resto treonina en el aminoácido 1405.
110. Un procedimiento de tratamiento o prevención de toxicidad en el trasplante de médula ósea en un sujeto que se somete a trasplante de médula ósea, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un precursor de óxido nítrico, de modo que se trata o previene la toxicidad en el trasplante de médula ósea en el sujeto.
- 30 111. El procedimiento de la realización 110, en el que el precursor de óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en citrulina, arginina y combinaciones de los mismos.
- 35 112. El procedimiento de la realización 110, en el que el precursor del óxido nítrico se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg.
- 40 113. El procedimiento de la realización 112, en el que el precursor del óxido nítrico se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg.
114. El procedimiento de la realización 113, en el que el precursor del óxido nítrico se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg.
- 45 115. El procedimiento de la realización 110, en el que la toxicidad en el trasplante de médula ósea comprende la enfermedad venooclusiva hepática.
116. El procedimiento de la realización 110, en el que el sujeto es un ser humano.
- 50 117. El procedimiento de la realización 116, que además comprende la etapa de detectar inicialmente un polimorfismo de un gen de carbamil fosfato sintasa I (CPSI) en el sujeto.
118. El procedimiento de la realización 117, en el que el polimorfismo del polipéptido de carbamil fosfato sintasa comprende una transversión de C a A en el exón 36 de CPSI.
- 55 119. El procedimiento de la realización 118, en el que el polimorfismo del polipéptido de carbamil fosfato sintasa comprende una transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI.

120. El procedimiento de la realización 119, en el que la transversión de C a A en el nucleótido 4340 de un ADNc que corresponde al gen de CPSI comprende además un cambio en el código del triplete de AAC a ACC, que codifica un polipéptido de CPSI que tiene un resto treonina en el aminoácido 1405.

5 LISTA DE SECUENCIAS

[0316]

- <110> Summar, Marshall
- 10 L. Christman, Brian
- <120> POLIMORFISMO DE LA CARBAMIL FOSFATO SINTASA I HUMANA Y PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS RELACIONADOS CON EL MISMO
- 15 <130> N° de expediente del apoderado 1242-19 PCT
- <140> PCT/US00/15079
- <141> 2000-06-01
- 20 <150> 09/323.472 <151> 1999-06-01
- <160> 20
- 25 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 5761
- <212> ADN
- 30 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (124)..(4626)
- 35 <400> 1

```

gtcagcetta aacctgact gcacccctcc cagatttctt ttacattaac taaaaagtct 60
tatcacacaa tctcataaaa tttatgtaat ttcatttaat tttagccaca aatcatcttc 120
aaa atg acg agg att ttg aca gct ttc aaa gtg gtg agg aca ctg aag 168
Met Thr Arg Ile Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys
      1           5           10           15
act ggt ttt ggc ttt acc aat gtg act gca cac caa aaa tgg aaa ttt 216
Thr Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe
    
```

ES 2 539 272 T3

	20		25		30	
tca aga cct ggc atc agg ctc ctt tct gtc aag gca cag aca gca cac						264
Ser Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His						
	35		40		45	
att gtc ctg gaa gat gga act aag atg aaa ggt tac tcc ttt ggc cat						312
Ile Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His						
	50		55		60	
cca tcc tct gtt gct ggt gaa gtg gtt ttt aat act ggc ctg gga ggg						360
Pro Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly						
	65		70		75	
tac cca gaa gct att act gac cct gcc tac aaa gga cag att ctc aca						408
Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr						
	80		85		90	95
atg gcc aac cct att att ggg aat ggt gga gct cct gat act act gct						456
Met Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala						
	100		105		110	
ctg gat gaa ctg gga ctt agc aaa tat ttg gag tct aat gga atc aag						504
Leu Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys						
	115		120		125	
gtt tca ggt ttg ctg gtg ctg gat tat agt aaa gac tac aac cac tgg						552
Val Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp						
	130		135		140	
ctg gct acc aag agt tta ggg caa tgg cta cag gaa gaa aag gtt cct						600
Leu Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro						
	145		150		155	
gca att tat gga gtg gac aca aga atg ctg act aaa ata att cgg gat						648
Ala Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp						
	160		165		170	175
aag ggt acc atg ctt ggg aag att gaa ttt gaa ggt cag cct gtg gat						696
Lys Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp						
	180		185		190	
ttt gtg gat cca aat aaa cag aat ttg att gct gag gtt tca acc aag						744
Phe Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys						
	195		200		205	
gat gtc aaa gtg tac ggc aaa gga aac ccc aca aaa gtg gta gct gta						792
Asp Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val						
	210		215		220	
gac tgt ggg att aaa aac aat gta atc cgc ctg cta gta aag cga gga						840
Asp Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly						

ES 2 539 272 T3

225	230	235	
gct gaa gtg cac tta gtt ccc tgg aac cat gat ttc acc aag atg gag			888
Ala Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu			
240	245	250	255
tat gat ggg att ttg atc gcg gga gga ccg ggg aac cca gct ctt gca			936
Tyr Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala			
	260	265	270
gaa cca cta att cag aat gtc aga aag att ttg gag agt gat cgc aag			984
Glu Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys			
	275	280	285
gag cca ttg ttt gga atc agt aca gga aac tta ata aca gga ttg gct			1032
Glu Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala			
	290	295	300
gct ggt gcc aaa acc tac aag atg tcc atg gcc aac aga ggg cag aat			1080
Ala Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn			
	305	310	315
cag cct gtt ttg aat atc aca aac aaa cag gct ttc att act gct cag			1128
Gln Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln			
	320	325	330
aat cat ggc tat gcc ttg gac aac acc ctc cct gct ggc tgg aaa cca			1176
Asn His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro			
	340	345	350
ctt ttt gtg aat gtc aac gat caa aca aat gag ggg att atg cat gag			1224
Leu Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu			
	355	360	365
agc aaa ccc ttc ttc gct gtg cag ttc cac cca gag gtc acc ccg ggg			1272
Ser Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly			
	370	375	380
cca ata gac act gag tac ctg ttt gat tcc ttt ttc tca ctg ata aag			1320
Pro Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys			
	385	390	395
aaa gga aaa gct acc acc att aca tca gtc tta ccg aag cca gca cta			1368
Lys Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu			
	400	405	410
ggt gca tct cgg gtt gag gtt tcc aaa gtc ctt att cta gga tca gga			1416
Val Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly			
	420	425	430
ggt ctg tcc att ggt cag gct gga gaa ttt gat tac tca gga tct caa			1464
Gly Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln			

435	440	445	
gct gta aaa gcc atg aag gaa gaa aat gtc aaa act gtt ctg atg aac			1512
Ala Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn			
450	455	460	
cca aac att gca tca gtc cag acc aat gag gtg ggc tta aag caa gcg			1560
Pro Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala			
465	470	475	
gat act gtc tac ttt ctt ccc atc acc cct cag ttt gtc aca gag gtc			1608
Asp Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val			
480	485	490	495
atc aag gca gaa cag cca gat ggg tta att ctg ggc atg ggt ggc cag			1656
Ile Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln			
500	505	510	
aca gct ctg aac tgt gga gtg gaa cta ttc aag aga ggt gtg ctc aag			1704
Thr Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys			
515	520	525	
gaa tat ggt gtg aaa gtc ctg gga act tca gtt gag tcc att atg gct			1752
Glu Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala			
530	535	540	
acg gaa gac agg cag ctg ttt tca gat aaa cta aat gag atc aat gaa			1800
Thr Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu			
545	550	555	
aag att gct cca agt ttt gca gtg gaa tcg att gag gat gca ctg aag			1848
Lys Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys			
560	565	570	575
gca gca gac acc att ggc tac cca gtg atg atc cgt tcc gcc tat gca			1896
Ala Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala			
580	585	590	
ctg ggt ggg tta ggc tca ggc atc tgt ccc aac aga gag act ttg atg			1944
Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met			
595	600	605	
gac ctc agc aca aag gcc ttt gct atg acc aac caa att ctg gtg gag			1992
Asp Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu			
610	615	620	
aag tca gtg aca ggt tgg aaa gaa ata gaa tat gaa gtg gtt cga gat			2040
Lys Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp			
625	630	635	
gct gat gac aat tgt gtc act gtc tgt aac atg gaa aat gtt gat gcc			2088
Ala Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala			

640	645	650	655	
atg ggt gtt cac aca ggt gac tca gtt gtt gtg gct cct gcc cag aca				2136
Met Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr				
	660	665	670	
ctc tcc aat gcc gag ttt cag atg ttg aga cgt act tca atc aat gtt				2184
Leu Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val				
	675	680	685	
gtt cgc cac ttg ggc att gtg ggt gaa tgc aac att cag ttt gcc ctt				2232
Val Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu				
	690	695	700	
cat cct acc tca atg gaa tac tgc atc att gaa gtg aat gcc aga ctg				2280
His Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu				
	705	710	715	
tcc cga agc tct gct ctg gcc tca aaa gcc act ggc tac cca ttg gca				2328
Ser Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala				
	720	725	730	735
ttc att gct gca aag att gcc cta gga atc cca ctt cca gaa att aag				2376
Phe Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys				
	740	745	750	
aac gtc gta tcc ggg aag aca tca gcc tgt ttt gaa cct agc ctg gat				2424
Asn Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp				
	755	760	765	
tac atg gtc acc aag att ccc cgc tgg gat ctt gac cgt ttt cat gga				2472
Tyr Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly				
	770	775	780	
aca tct agc cga att ggt agc tct atg aaa agt gta gga gag gtc atg				2520
Thr Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met				
	785	790	795	
gct att ggt cgt acc ttt gag gag agt ttc cag aaa gct tta cgg atg				2568
Ala Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met				
	800	805	810	815
tgc cac cca tct ata gaa ggt ttc act ccc cgt ctc cca atg aac aaa				2616
Cys His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys				
	820	825	830	
gaa tgg cca tct aat tta gat ctt aga aaa gag ttg tct gaa cca agc				2664
Glu Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser				
	835	840	845	
agc acg cgt atc tat gcc att gcc aag gcc att gat gac aac atg tcc				2712
Ser Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser				

850	855	860	
ctt gat gag att gag aag ctc	aca tac att gac aag tgg ttt ttg tat		2760
Leu Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr			
865	870	875	
aag atg cgt gat att tta aac atg gaa aag aca ctg aaa ggg ctc aac			2808
Lys Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn			
880	885	890	895
agt gag tcc atg aca gaa gaa acc ctg aaa agg gca aag gag att ggg			2856
Ser Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly			
900	905	910	
ttc tca gat aag cag att tca aaa tgc ctt ggg ctc act gag gcc cag			2904
Phe Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln			
915	920	925	
aca agg gag ctg agg tta aag aaa aac atc cac cct tgg gtt aaa cag			2952
Thr Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln			
930	935	940	
att gat aca ctg gct gca gaa tac cca tca gta aca aac tat ctc tat			3000
Ile Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr			
945	950	955	
ggt acc tac aat ggt cag gag cat gat gtc aat ttt gat gac cat gga			3048
Val Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly			
960	965	970	975
atg atg gtg cta ggc tgt ggt cca tat cac att ggc agc agt gtg gaa			3096
Met Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu			
980	985	990	
ttt gat tgg tgt gct gtc tct agt atc cgc aca ctg cgt caa ctt ggc			3144
Phe Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly			
995	1000	1005	
aag aag acg gtg gtg gtg aat tgc aat cct gag act gtg agc aca gac			3192
Lys Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp			
1010	1015	1020	
ttt gat gag tgt gac aaa ctg tac ttt gaa gag ttg tcc ttg gag aga			3240
Phe Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg			
1025	1030	1035	
atc cta gac atc tac cat cag gag gca tgt ggt ggc tgc atc ata tca			3288
Ile Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser			
1040	1045	1050	1055
ggt gga ggc cag att cca aac aac ctg gca gtt cct cta tac aag aat			3336
Val Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn			

1060	1065	1070	
ggg gtc aag atc atg ggc aca agc ccc ctg cag atc gac agg gct gag			3384
Gly Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu			
1075	1080	1085	
gat cgc tcc atc ttc tca gct gtc ttg gat gag ctg aag gtg gct cag			3432
Asp Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln			
1090	1095	1100	
gca cct tgg aaa gct gtt aat act ttg aat gaa gca ctg gaa ttt gca			3480
Ala Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala			
1105	1110	1115	
aag tct gtg gac tac ccc tgc ttg ttg agg cct tcc tat gtt ttg agt			3528
Lys Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser			
1120	1125	1130	1135
ggg tct gct atg aat gtg gta ttc tct gag gat gag atg aaa aaa ttc			3576
Gly Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe			
1140	1145	1150	
cta gaa gag gcg act aga gtt tct cag gag cac cca gtg gtc ctg aca			3624
Leu Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr			
1155	1160	1165	
aaa ttt gtt gaa ggg gcc cga gaa gta gaa atg gac gct gtt ggc aaa			3672
Lys Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys			
1170	1175	1180	
gat gga agg gtt atc tct cat gcc atc tct gaa cat gtt gaa gat gca			3720
Asp Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala			
1185	1190	1195	
ggg gtc cac tcg gga gat gcc act ctg atg ctg ccc aca caa acc atc			3768
Gly Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile			
1200	1205	1210	1215
agc caa ggg gcc att gaa aag gtg aag gat gct acc cgg aag att gca			3816
Ser Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala			
1220	1225	1230	
aag gct ttt gcc atc tct ggt cca ttc aac gtc caa ttt ctt gtc aaa			3864
Lys Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys			
1235	1240	1245	
gga aat gat gtc ttg gtg att gag tgt aac ttg aga gct tct cga tcc			3912
Gly Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser			
1250	1255	1260	
ttc ccc ttt gtt tcc aag act ctt ggg gtt gac ttc att gat gtg gcc			3960
Phe Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala			

1265	1270	1275	
acc aag gtg atg att gga gag aat gtt gat gag aaa cat ctt cca aca			4008
Thr Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr			
1280	1285	1290	1295
ttg gac cat ccc ata att cct gct gac tat gtt gca att aag gct ccc			4056
Leu Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro			
1300	1305	1310	
atg ttt tcc tgg ccc cgg ttg agg gat gct gac ccc att ctg aga tgt			4104
Met Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys			
1315	1320	1325	
gag atg gct tcc act gga gag gtg gct tgc ttt ggt gaa ggt att cat			4152
Glu Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His			
1330	1335	1340	
aca gcc ttc cta aag gca atg ctt tcc aca gga ttt aag ata ccc cag			4200
Thr Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln			
1345	1350	1355	
aaa ggc atc ctg ata ggc atc cag caa tca ttc cgg cca aga ttc ctt			4248
Lys Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu			
1360	1365	1370	1375
ggt gtg gct gaa caa tta cac aat gaa ggt ttc aag ctg ttt gcc acg			4296
Gly Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr			
1380	1385	1390	
gaa gcc aca tca gac tgg ctc aac gcc aac aat gtc cct gcc aac cca			4344
Glu Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Asn Pro			
1395	1400	1405	
gtg gca tgg ccg tct caa gaa gga cag aat ccc agc ctc tct tcc atc			4392
Val Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile			
1410	1415	1420	
aga aaa ttg att aga gat ggc agc att gac cta gtg att aac ctt ccc			4440
Arg Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro			
1425	1430	1435	
aac aac aac act aaa ttt gtc cat gat aat tat gtg att cgg agg aca			4488
Asn Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr			
1440	1445	1450	1455
gct gtt gat agt gga atc cct ctc ctc act aat ttt cag gtg acc aaa			4536
Ala Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys			
1460	1465	1470	
ctt ttt gct gaa gct gtg cag aaa tct cgc aag gtg gac tcc aag agt			4584
Leu Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser			

ES 2 539 272 T3

```

                1475                1480                1485
ctt ttc cac tac agg cag tac agt gct gga aaa gca gca tag      4626
Leu Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
                1490                1495                1500
agatgcagac accccagccc cattattaaa tcaacctgag ccacatgta tctaaaggaa 4686
ctgattcaca actttctcag agatgaatat tgataactaa acttcatttc agtttacttt 4746
gttatgctt aatattctgt gtcttttgcg attaaattgt cagtcacttc ttcaaacct 4806
tacagtcctt cctaagttac tcttcatgag atttcatcca ttactaata ctgtattttt 4866
ggaggactag gcttgcctat gtgcttatgt gtagcttttt actttttatg gtgctgatta 4926
atggtgatca aggtaggaaa agttgctggt ctattttctg aactctttct atactttaag 4986
atactctatt tttaaaacac tatctgcaa ctcaggacac ttaacaggg cagaatactc 5046
taaaaacttg ataaaatgaa atatagattt aatttatgaa ccttccatca tgatgtttgt 5106
gtattgcttc tttttggtc ctcattctca cccatttggc taatccagga atattgttat 5166
cccttccat tatattgaag ttgagaaatg tgacagaggc atttagagta tggacttttc 5226
ttttctttt cttttctttt ttttctttt gagatggagt cacactctcc aggctggagt 5286
gcagtggcac aatctcggct cactgcaatt tgcgtctccc aagttcaagc gattctctctg 5346
cttagacta tggatttctt taaggaatac tggtttgcag ttttgtttc tggactatat 5406
cagcagatgg tagacagtgt ttatgtagat gtggttgtgt ttttatcatt ggattttaac 5466
ttggcccgag tgaataatc agatttttgt cattcacact ctccccagc tttggaataa 5526
cttggaahta aggttcattc ccttaagacy atggattctg ttgaactatg gggcccaca 5586
ctgcactatt aattccacc actgtaaggg caaggacacc attccttcta catataagaa 5646
aaaagtctct cccaagggc agcctttgtt acttttaaat attttctgtt attacaagtg 5706
ctctaattgt gaacttttaa ataaaatact attaagaggt aaaaaaaaaa aaaaa      5761

```

<210> 2
 <211> 1500
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Thr Arg Ile Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys Thr
1 5 10 15

Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe Ser
20 25 30

Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His Ile
35 40 45

Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His Pro
50 55 60

Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly Tyr
65 70 75 80

Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr Met
85 90 95

Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala Leu
100 105 110

Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys Val
115 120 125

Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp Leu
130 135 140

Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro Ala
145 150 155 160

Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp Lys
165 170 175

Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe
180 185 190

Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys Asp
195 200 205

Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val Asp
210 215 220

Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly Ala
225 230 235 240

Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu Tyr
245 250 255

Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala Glu
260 265 270

Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys Glu

275	280	285
Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala Ala		
290	295	300
Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn Gln		
305	310	315
Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln Asn		
325	330	335
His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro Leu		
340	345	350
Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu Ser		
355	360	365
Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly Pro		
370	375	380
Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys Lys		
385	390	395
Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu Val		
405	410	415
Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly Gly		
420	425	430
Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln Ala		
435	440	445
Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn Pro		
450	455	460
Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala Asp		
465	470	475
Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val Ile		
485	490	495
Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln Thr		
500	505	510
Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys Glu		
515	520	525
Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala Thr		
530	535	540
Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys		
545	550	555
		560

Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys Ala
565 570 575

Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala Leu
580 585 590

Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met Asp
595 600 605

Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu Lys
610 615 620

Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp Ala
625 630 635 640

Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala Met
645 650 655

Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr Leu
660 665 670

Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val Val
675 680 685

Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu His
690 695 700

Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu Ser
705 710 715 720

Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Phe
725 730 735

Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys Asn
740 745 750

Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp Tyr
755 760 765

Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly Thr
770 775 780

Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met Ala
785 790 795 800

Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met Cys
805 810 815

His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys Glu
820 825 830

Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser Ser

Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser Gly
 1125 1130 1135

Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe Leu
 1140 1145 1150

Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr Lys
 1155 1160 1165

Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys Asp
 1170 1175 1180

Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala Gly
 1185 1190 1195 1200

Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile Ser
 1205 1210 1215

Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala Lys
 1220 1225 1230

Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys Gly
 1235 1240 1245

Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser Phe
 1250 1255 1260

Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala Thr
 1265 1270 1275 1280

Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr Leu
 1285 1290 1295

Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro Met
 1300 1305 1310

Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys Glu
 1315 1320 1325

Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His Thr
 1330 1335 1340

Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln Lys
 1345 1350 1355 1360

Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu Gly
 1365 1370 1375

Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr Glu
 1380 1385 1390

Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Asn Pro Val

ES 2 539 272 T3

```

1395          1400          1405
Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile Arg
1410          1415          1420
Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro Asn
1425          1430          1435          1440
Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr Ala
1445          1450          1455
Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys Leu
1460          1465          1470
Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser Leu
1475          1480          1485
Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
1490          1495          1500

```

- <210> 3
- <211> 5761
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (124)..(4626)
- <400> 3

```

gtcagcctta aacctgact gcaccctcc cagatttctt ttacattaac taaaaagtct 60
tatcacacaa tctcataaaa tttatgtaat ttcatttaat tttagccaca aatcatcttc 120
aaa atg acg agg att ttg aca gct ttc aaa gtg gtg agg aca ctg aag 168
Met Thr Arg Ile Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys
1 5 10 15
act ggt ttt ggc ttt acc aat gtg act gca cac caa aaa tgg aaa ttt 216
Thr Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe
20 25 30
tca aga cct ggc atc agg ctc ctt tct gtc aag gca cag aca gca cac 264
Ser Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His
35 40 45
att gtc ctg gaa gat gga act aag atg aaa ggt tac tcc ttt ggc cat 312

```

Ile	Val	Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Lys	Met	Lys	Gly	Tyr	Ser	Phe	Gly	His	
		50					55					60				
cca	tcc	tct	ggt	gct	ggc	gaa	gtg	ggt	ttt	aat	act	ggc	ctg	gga	ggg	360
Pro	Ser	Ser	Val	Ala	Gly	Glu	Val	Val	Phe	Asn	Thr	Gly	Leu	Gly	Gly	
		65				70					75					
tac	cca	gaa	gct	att	act	gac	cct	gcc	tac	aaa	gga	cag	att	ctc	aca	408
Tyr	Pro	Glu	Ala	Ile	Thr	Asp	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly	Gln	Ile	Leu	Thr	
		80				85				90					95	
atg	gcc	aac	cct	att	att	ggg	aat	ggc	gga	gct	cct	gat	act	act	gct	456
Met	Ala	Asn	Pro	Ile	Ile	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Pro	Asp	Thr	Thr	Ala	
				100					105						110	
ctg	gat	gaa	ctg	gga	ctt	agc	aaa	tat	ttg	gag	tct	aat	gga	atc	aag	504
Leu	Asp	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Lys	Tyr	Leu	Glu	Ser	Asn	Gly	Ile	Lys	
			115					120							125	
ggt	tca	ggc	ttg	ctg	gtg	ctg	gat	tat	agt	aaa	gac	tac	aac	cac	tgg	552
Val	Ser	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Asp	Tyr	Ser	Lys	Asp	Tyr	Asn	His	Trp	
			130					135							140	
ctg	gct	acc	aag	agt	tta	ggg	caa	tgg	cta	cag	gaa	gaa	aag	ggt	cct	600
Leu	Ala	Thr	Lys	Ser	Leu	Gly	Gln	Trp	Leu	Gln	Glu	Glu	Lys	Val	Pro	
		145				150							155			
gca	att	tat	gga	gtg	gac	aca	aga	atg	ctg	act	aaa	ata	att	egg	gat	648
Ala	Ile	Tyr	Gly	Val	Asp	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Arg	Asp	
		160				165				170					175	
aag	ggc	acc	atg	ctt	ggg	aag	att	gaa	ttt	gaa	ggc	cag	cct	gtg	gat	696
Lys	Gly	Thr	Met	Leu	Gly	Lys	Ile	Glu	Phe	Glu	Gly	Gln	Pro	Val	Asp	
				180					185						190	
ttt	gtg	gat	cca	aat	aaa	cag	aat	ttg	att	gct	gag	ggt	tca	acc	aag	744
Phe	Val	Asp	Pro	Asn	Lys	Gln	Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Val	Ser	Thr	Lys	
			195					200							205	
gat	gtc	aaa	gtg	tac	ggc	aaa	gga	aac	ccc	aca	aaa	gtg	gta	gct	gta	792
Asp	Val	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys	Gly	Asn	Pro	Thr	Lys	Val	Val	Ala	Val	
			210					215							220	
gac	tgt	ggg	att	aaa	aac	aat	gta	atc	cgc	ctg	cta	gta	aag	cga	gga	840
Asp	Cys	Gly	Ile	Lys	Asn	Asn	Val	Ile	Arg	Leu	Leu	Val	Lys	Arg	Gly	
		225					230								235	
gct	gaa	gtg	cac	tta	ggt	ccc	tgg	aac	cat	gat	ttc	acc	aag	atg	gag	888
Ala	Glu	Val	His	Leu	Val	Pro	Trp	Asn	His	Asp	Phe	Thr	Lys	Met	Glu	
		240				245					250				255	
tat	gat	ggg	att	ttg	atc	gcg	gga	gga	ccg	ggg	aac	cca	gct	ctt	gca	936

Tyr Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala
 260 265 270
 gaa cca cta att cag aat gtc aga aag att ttg gag agt gat cgc aag 984
 Glu Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys
 275 280 285
 gag cca ttg ttt gga atc agt aca gga aac tta ata aca gga ttg gct 1032
 Glu Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala
 290 295 300
 gct ggt gcc aaa acc tac aag atg tcc atg gcc aac aga ggg cag aat 1080
 Ala Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn
 305 310 315
 cag cct gtt ttg aat atc aca aac aaa cag gct ttc att act gct cag 1128
 Gln Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln
 320 325 330 335
 aat cat ggc tat gcc ttg gac aac acc ctc cct gct ggc tgg aaa cca 1176
 Asn His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro
 340 345 350
 ctt ttt gtg aat gtc aac gat caa aca aat gag ggg att atg cat gag 1224
 Leu Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu
 355 360 365
 agc aaa ccc ttc ttc gct gtg cag ttc cac cca gag gtc acc ccg ggg 1272
 Ser Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly
 370 375 380
 cca ata gac act gag tac ctg ttt gat tcc ttt ttc tca ctg ata aag 1320
 Pro Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys
 385 390 395
 aaa gga aaa gct acc acc att aca tca gtc tta ccg aag cca gca cta 1368
 Lys Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu
 400 405 410 415
 gtt gca tct cgg gtt gag gtt tcc aaa gtc ctt att cta gga tca gga 1416
 Val Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly
 420 425 430
 ggt ctg tcc att ggt cag gct gga gaa ttt gat tac tca gga tct caa 1464
 Gly Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln
 435 440 445
 gct gta aaa gcc atg aag gaa gaa aat gtc aaa act gtt ctg atg aac 1512
 Ala Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn
 450 455 460
 cca aac att gca tca gtc cag acc aat gag gtg ggc tta aag caa gcg 1560

Pro Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala
 465 470 475

gat act gtc tac ttt ctt ccc atc acc cct cag ttt gtc aca gag gtc 1608
 Asp Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val
 480 485 490 495

atc aag gca gaa cag cca gat ggg tta att ctg ggc atg ggt ggc cag 1656
 Ile Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln
 500 505 510

aca gct ctg aac tgt gga gtg gaa cta ttc aag aga ggt gtg ctc aag 1704
 Thr Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys
 515 520 525

gaa tat ggt gtg aaa gtc ctg gga act tca gtt gag tcc att atg gct 1752
 Glu Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala
 530 535 540

acg gaa gac agg cag ctg ttt tca gat aaa cta aat gag atc aat gaa 1800
 Thr Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu
 545 550 555

aag att gct cca agt ttt gca gtg gaa tcg att gag gat gca ctg aag 1848
 Lys Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys
 560 565 570 575

gca gca gac acc att ggc tac cca gtg atg atc cgt tcc gcc tat gca 1896
 Ala Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala
 580 585 590

ctg ggt ggg tta ggc tca ggc atc tgt ccc aac aga gag act ttg atg 1944
 Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met
 595 600 605

gac ctc agc aca aag gcc ttt gct atg acc aac caa att ctg gtg gag 1992
 Asp Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu
 610 615 620

aag tca gtg aca ggt tgg aaa gaa ata gaa tat gaa gtg gtt cga gat 2040
 Lys Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp
 625 630 635

gct gat gac aat tgt gtc act gtc tgt aac atg gaa aat gtt gat gcc 2088
 Ala Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala
 640 645 650 655

atg ggt gtt cac aca ggt gac tca gtt gtt gtg gct cct gcc cag aca 2136
 Met Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr
 660 665 670

ctc tcc aat gcc gag ttt cag atg ttg aga cgt act tca atc aat gtt 2184

Leu Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val	
675	680
685	
ggt cgc cac ttg ggc att gtg ggt gaa tgc aac att cag ttt gcc ctt	2232
Val Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu	
690	695
700	
cat cct acc tca atg gaa tac tgc atc att gaa gtg aat gcc aga ctg	2280
His Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu	
705	710
715	
tcc cga agc tct gct ctg gcc tca aaa gcc act ggc tac cca ttg gca	2328
Ser Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala	
720	725
730	735
ttc att gct gca aag att gcc cta gga atc cca ctt cca gaa att aag	2376
Phe Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys	
740	745
750	
aac gtc gta tcc ggg aag aca tca gcc tgt ttt gaa cct agc ctg gat	2424
Asn Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp	
755	760
765	
tac atg gtc acc aag att ccc cgc tgg gat ctt gac cgt ttt cat gga	2472
Tyr Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly	
770	775
780	
aca tct agc cga att ggt agc tct atg aaa agt gta gga gag gtc atg	2520
Thr Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met	
785	790
795	
gct att ggt cgt acc ttt gag gag agt ttc cag aaa gct tta cgg atg	2568
Ala Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met	
800	805
810	815
tgc cac cca tct ata gaa ggt ttc act ccc cgt ctc cca atg aac aaa	2616
Cys His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys	
820	825
830	
gaa tgg cca tct aat tta gat ctt aga aaa gag ttg tct gaa cca agc	2664
Glu Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser	
835	840
845	
agc acg cgt atc tat gcc att gcc aag gcc att gat gac aac atg tcc	2712
Ser Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser	
850	855
860	
ctt gat gag att gag aag ctc aca tac att gac aag tgg ttt ttg tat	2760
Leu Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr	
865	870
875	
aag atg cgt gat att tta aac atg gaa aag aca ctg aaa ggg ctc aac	2808

Lys Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn	
880	885 890 895
agt gag tcc atg aca gaa gaa acc ctg aaa agg gca aag gag att ggg	2856
Ser Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly	
	900 905 910
ttc tca gat aag cag att tca aaa tgc ctt ggg ctc act gag gcc cag	2904
Phe Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln	
	915 920 925
aca agg gag ctg agg tta aag aaa aac atc cac cct tgg gtt aaa cag	2952
Thr Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln	
	930 935 940
att gat aca ctg gct gca gaa tac cca tca gta aca aac tat ctc tat	3000
Ile Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr	
	945 950 955
gtt acc tac aat ggt cag gag cat gat gtc aat ttt gat gac cat gga	3048
Val Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly	
	960 965 970 975
atg atg gtg cta ggc tgt ggt cca tat cac att ggc agc agt gtg gaa	3096
Met Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu	
	980 985 990
ttt gat tgg tgt gct gtc tct agt atc cgc aca ctg cgt caa ctt ggc	3144
Phe Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly	
	995 1000 1005
aag aag acg gtg gtg gtg aat tgc aat cct gag act gtg agc aca gac	3192
Lys Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp	
	1010 1015 1020
ttt gat gag tgt gac aaa ctg tac ttt gaa gag ttg tcc ttg gag aga	3240
Phe Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg	
	1025 1030 1035
atc cta gac atc tac cat cag gag gca tgt ggt ggc tgc atc ata tca	3288
Ile Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser	
	1040 1045 1050 1055
gtt gga ggc cag att cca aac aac ctg gca gtt cct cta tac aag aat	3336
Val Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn	
	1060 1065 1070
ggt gtc aag atc atg ggc aca agc ccc ctg cag atc gac agg gct gag	3384
Gly Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu	
	1075 1080 1085
gat cgc tcc atc ttc tca gct gtc ttg gat gag ctg aag gtg gct cag	3432

Asp Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln
 1090 1095 1100
 gca cct tgg aaa gct gtt aat act ttg aat gaa gca ctg gaa ttt gca 3480
 Ala Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala
 1105 1110 1115
 aag tct gtg gac tac ccc tgc ttg ttg agg cct tcc tat gtt ttg agt 3528
 Lys Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser
 1120 1125 1130 1135
 ggg tct gct atg aat gtg gta ttc tct gag gat gag atg aaa aaa ttc 3576
 Gly Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe
 1140 1145 1150
 cta gaa gag gcg act aga gtt tct cag gag cac cca gtg gtc ctg aca 3624
 Leu Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr
 1155 1160 1165
 aaa ttt gtt gaa ggg gcc cga gaa gta gaa atg gac gct gtt ggc aaa 3672
 Lys Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys
 1170 1175 1180
 gat gga agg gtt atc tct cat gcc atc tct gaa cat gtt gaa gat gca 3720
 Asp Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala
 1185 1190 1195
 ggt gtc cac tcg gga gat gcc act ctg atg ctg ccc aca caa acc atc 3768
 Gly Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile
 1200 1205 1210 1215
 agc caa ggg gcc att gaa aag gtg aag gat gct acc cgg aag att gca 3816
 Ser Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala
 1220 1225 1230
 aag gct ttt gcc atc tct ggt cca ttc aac gtc caa ttt ctt gtc aaa 3864
 Lys Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys
 1235 1240 1245
 gga aat gat gtc ttg gtg att gag tgt aac ttg aga gct tct cga tcc 3912
 Gly Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser
 1250 1255 1260
 ttc ccc ttt gtt tcc aag act ctt ggg gtt gac ttc att gat gtg gcc 3960
 Phe Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala
 1265 1270 1275
 acc aag gtg atg att gga gag aat gtt gat gag aaa cat ctt cca aca 4008
 Thr Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr
 1280 1285 1290 1295
 ttg gac cat ccc ata att cct gct gac tat gtt gca att aag gct ccc 4056

Leu Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro
 1300 1305 1310
 atg ttt tcc tgg ccc cgg ttg agg gat gct gac ccc att ctg aga tgt 4104
 Met Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys
 1315 1320 1325
 gag atg gct tcc act gga gag gtg gct tgc ttt ggt gaa ggt att cat 4152
 Glu Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His
 1330 1335 1340
 aca gcc ttc cta aag gca atg ctt tcc aca gga ttt aag ata ccc cag 4200
 Thr Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln
 1345 1350 1355
 aaa ggc atc ctg ata ggc atc cag caa tca ttc cgg cca aga ttc ctt 4248
 Lys Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu
 1360 1365 1370 1375
 ggt gtg gct gaa caa tta cac aat gaa ggt ttc aag ctg ttt gcc acg 4296
 Gly Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr
 1380 1385 1390
 gaa gcc aca tca gac tgg ctc aac gcc aac aat gtc cct gcc acc cca 4344
 Glu Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Thr Pro
 1395 1400 1405
 gtg gca tgg ccg tct caa gaa gga cag aat ccc agc ctc tct tcc atc 4392
 Val Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile
 1410 1415 1420
 aga aaa ttg att aga gat ggc agc att gac cta gtg att aac ctt ccc 4440
 Arg Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro
 1425 1430 1435
 aac aac aac act aaa ttt gtc cat gat aat tat gtg att cgg agg aca 4488
 Asn Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr
 1440 1445 1450 1455
 gct gtt gat agt gga atc cct ctc ctc act aat ttt cag gtg acc aaa 4536
 Ala Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys
 1460 1465 1470
 ctt ttt gct gaa gct gtg cag aaa tct cgc aag gtg gac tcc aag agt 4584
 Leu Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser
 1475 1480 1485
 ctt ttc cac tac agg cag tac agt gct gga aaa gca gca tag 4626
 Leu Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
 1490 1495 1500
 agatgcagac accccagccc cattattaa tcaacctgag ccacatgta tctaaaggaa 4686

ctgattcaca accttctcag agatgaatat tgataactaa acttcatttc agtttacttt 4746
 gttatgcctt aatattctgt gtcttttgca attaaattgt cagtcacttc ttcaaaacct 4806
 tacagtcttt cctaagttac tcttcatgag atttcatcca ttactaata ctgtattttt 4866
 ggtggactag gcttgctat gtgcttatgt gtagcttttt actttttatg gtgctgatta 4926
 atggtgatca aggtaggaaa agttgctggt ctattttctg aactctttct atactttaag 4986
 atactctatt tttaaaacac tatctgcaaa ctcaggacac tttaacaggg cagaatactc 5046
 taaaaacttg ataaaatgaa ataatagatt aatttatgaa ccttccatca tgatgtttgt 5106
 gtattgcttc tttttggatc ctcattctca cccatttgge taatccagga atattgttat 5166
 cccttcccat tatattgaag ttgagaaatg tgacagagge atttagagta tggacttttc 5226
 ttttcttttt cttttctttt ttttcttttt gagatggagt cacactctcc aggctggagt 5286
 gcagtggcac aatctcggct cactgcaatt tgcgtctccc aagtccaagc gattctctctg 5346
 ctttagacta tggatttctt taaggaatac tggtttgag ttttgtttc tggactatat 5406
 cagcagatgg tagacagtgt ttatgtagat gtgttggtgt tttatcatt ggattttaac 5466
 ttggcccgag tgaataatc agatttttgt cttcacact ctccccagc tttggaataa 5526
 cttggaagta aggttcattc ccttaagacg atggattctg ttgaactatg ggttcccaca 5586
 ctgcactatt aattccacc actgtaaggg caaggacacc attccttcta catataagaa 5646
 aaaagtctct cccaagggc agcctttggt acttttaa attttctgt attacaagtg 5706
 ctctaattgt gaacttttaa ataaaatact attaagaggt aaaaaaaaaa aaaaa 5761

<210> 4
 <211> 1500
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Met Thr Arg Ile Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys Thr
 1 5 10 15
 Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe Ser
 20 25 30
 Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His Ile

10

Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln Asn
 325 330 335
 His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro Leu
 340 345 350
 Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu Ser
 355 360 365
 Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly Pro
 370 375 380
 Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys Lys
 385 390 395 400
 Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu Val
 405 410 415
 Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly Gly
 420 425 430
 Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln Ala
 435 440 445
 Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn Pro
 450 455 460
 Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala Asp
 465 470 475 480
 Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val Ile
 485 490 495
 Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln Thr
 500 505 510
 Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys Glu
 515 520 525
 Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala Thr
 530 535 540
 Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys
 545 550 555 560
 Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys Ala
 565 570 575
 Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala Leu
 580 585 590
 Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met Asp

Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn Ser
 885 890 895

Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly Phe
 900 905 910

Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln Thr
 915 920 925

Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln Ile
 930 935 940

Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr Val
 945 950 955 960

Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly Met
 965 970 975

Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu Phe
 980 985 990

Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly Lys
 995 1000 1005

Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp Phe
 1010 1015 1020

Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg Ile
 1025 1030 1035 1040

Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser Val
 1045 1050 1055

Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn Gly
 1060 1065 1070

Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu Asp
 1075 1080 1085

Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln Ala
 1090 1095 1100

Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala Lys
 1105 1110 1115 1120

Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser Gly
 1125 1130 1135

Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe Leu
 1140 1145 1150

Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr Lys

1155	1160	1165
Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys Asp		
1170	1175	1180
Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala Gly		
1185	1190	1195
1200		
Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile Ser		
1205	1210	1215
Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala Lys		
1220	1225	1230
Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys Gly		
1235	1240	1245
Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser Phe		
1250	1255	1260
Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala Thr		
1265	1270	1275
1280		
Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr Leu		
1285	1290	1295
Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro Met		
1300	1305	1310
Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys Glu		
1315	1320	1325
Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His Thr		
1330	1335	1340
Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln Lys		
1345	1350	1355
1360		
Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu Gly		
1365	1370	1375
Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr Glu		
1380	1385	1390
Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Thr Pro Val		
1395	1400	1405
Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile Arg		
1410	1415	1420
Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro Asn		
1425	1430	1435
1440		

```

Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr Ala
      1445                1450                1455

Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys Leu
      1460                1465                1470

Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser Leu
      1475                1480                1485

Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
      1490                1495                1500
    
```

- <210> 5
- <211> 495
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> exón
- 10 <222> (111)..(224)

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (70)..(70)
- 15 <223> n = G, A, T/U, C

- <400> 5

```

ctacttctca tgttcagcaa tttcttcttc tttatgtttt aaattacatg ttccataaaa 60
ataagaaatn cactgtgata cggttaattga ttttttcatt ttaaattgcag ctg ttt 116
gcc acg gaa gcc aca tca gac tgg ctc aac gcc aac aat gtc cct gcc 164
acc cca gtg gca tgg ccg tct caa gaa gga cag aat ccc agc ctc tct 212
tcc atc aga aag taagaactag gcatactggt ttctgaaata atttagagga 264
ttaactttga gaaccagtat atgaatattc accttgcttg attgcaagtc ttttaaaaca 324
aatttaaaaa tgaatacatt tgtggatgat tgtcaagttt cactctccat cactatggaa 384
tacataacgt catgtgtaca tggatgatg aaacgtgttt caaaatactt cttagtaagg 444
atactttcct tgacggaaac aagtgagagt atgaagaatg taatgcagca c 495
    
```

- 20 <210> 6
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 25 <400> 6

- agctgttgc cacggaagcc 20

<210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 7

 cccagcctct ctccatcag aaagtaag 28
 10
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 8

 cacggaagcc acatcagact 20
 20 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 9

 ttctgatgga agagaggctt g 21
 30 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 35 agagtgaaac ttgacaatca tcca 24

 <210> 11
 <211> 5761
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (124).. (4626)

 <400> 11

gtcagcctta aacctgact gcaccctcc cagatttctt ttacattaac taaaaagtct 60
 tatcacacaa tctcataaaa tttatgtaat ttcatttaat tttagccaca aatcatcttc 120
 aaa atg acg agg tta ttg aca gct ttc aaa gtg gtg agg aca ctg aag 168
 Met Thr Arg Leu Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys
 1 5 10 15
 act ggt ttt ggc ttt acc aat gtg act gca cac caa aaa tgg aaa ttt 216
 Thr Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe
 20 25 30
 tca aga cct ggc atc agg ctc ctt tct gtc aag gca cag aca gca cac 264
 Ser Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His
 35 40 45
 att gtc ctg gaa gat gga act aag atg aaa ggt tac tcc ttt ggc cat 312
 Ile Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His
 50 55 60
 cca tcc tct gtt gct ggt gaa gtg gtt ttt aat act ggc ctg gga ggg 360
 Pro Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly
 65 70 75
 tac cca gaa gct att act gac cct gcc tac aaa gga cag att ctc aca 408
 Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr
 80 85 90 95
 atg gcc aac cct att att ggg aat ggt gga gct cct gat act act gct 456
 Met Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala
 100 105 110
 ctg gat gaa ctg gga ctt agc aaa tat ttg gag tct aat gga atc aag 504
 Leu Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys

ES 2 539 272 T3

	115		120		125	
ggt tca ggt ttg ctg gtg ctg gat tat agt aaa gac tac aac cac tgg						552
Val Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp						
	130		135		140	
ctg gct acc aag agt tta ggg caa tgg cta cag gaa gaa aag gtt cct						600
Leu Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro						
	145		150		155	
gca att tat gga gtg gac aca aga atg ctg act aaa ata att egg gat						648
Ala Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp						
	160		165		170	175
aag ggt acc atg ctt ggg aag att gaa ttt gaa ggt cag cct gtg gat						696
Lys Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp						
		180		185		190
ttt gtg gat cca aat aaa cag aat ttg att gct gag gtt tca acc aag						744
Phe Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys						
		195		200		205
gat gtc aaa gtg tac ggc aaa gga aac ccc aca aaa gtg gta gct gta						792
Asp Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val						
	210		215		220	
gac tgt ggg att aaa aac aat gta atc cgc ctg cta gta aag cga gga						840
Asp Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly						
	225		230		235	
gct gaa gtg cac tta gtt ccc tgg aac cat gat ttc acc aag atg gag						888
Ala Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu						
	240		245		250	255
tat gat ggg att ttg atc gcg gga gga ccg ggg aac cca gct ctt gca						936
Tyr Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala						
		260		265		270
gaa cca cta att cag aat gtc aga aag att ttg gag agt gat cgc aag						984
Glu Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys						
		275		280		285
gag cca ttg ttt gga atc agt aca gga aac tta ata aca gga ttg gct						1032
Glu Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala						
	290		295		300	
gct ggt gcc aaa acc tac aag atg tcc atg gcc aac aga ggg cag aat						1080
Ala Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn						
	305		310		315	
cag cct gtt ttg aat atc aca aac aaa cag gct ttc att act gct cag						1128
Gln Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln						

320	325	330	335	
aat cat ggc tat gcc ttg gac aac acc ctc cct gct ggc tgg aaa cca				1176
Asn His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro				
	340	345	350	
ctt ttt gtg aat gtc aac gat caa aca aat gag ggg att atg cat gag				1224
Leu Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu				
	355	360	365	
agc aaa ccc ttc ttc gct gtg cag ttc cac cca gag gtc acc ccg ggg				1272
Ser Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly				
	370	375	380	
cca ata gac act gag tac ctg ttt gat tcc ttt ttc tca ctg ata aag				1320
Pro Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys				
	385	390	395	
aaa gga aaa gct acc acc att aca tca gtc tta ccg aag cca gca cta				1368
Lys Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu				
	400	405	410	415
gtt gca tct cgg gtt gag gtt tcc aaa gtc ctt att cta gga tca gga				1416
Val Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly				
	420	425	430	
ggt ctg tcc att ggt cag gct gga gaa ttt gat tac tca gga tct caa				1464
Gly Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln				
	435	440	445	
gct gta aaa gcc atg aag gaa gaa aat gtc aaa act gtt ctg atg aac				1512
Ala Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn				
	450	455	460	
cca aac att gca tca gtc cag acc aat gag gtg ggc tta aag caa gcg				1560
Pro Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala				
	465	470	475	
gat act gtc tac ttt ctt ccc atc acc cct cag ttt gtc aca gag gtc				1608
Asp Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val				
	480	485	490	495
atc aag gca gaa cag cca gat ggg tta att ctg ggc atg ggt ggc cag				1656
Ile Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln				
	500	505	510	
aca gct ctg aac tgt gga gtg gaa cta ttc aag aga ggt gtg ctc aag				1704
Thr Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys				
	515	520	525	
gaa tat ggt gtg aaa gtc ctg gga act tca gtt gag tcc att atg gct				1752
Glu Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala				

530	535	540	
acg gaa gac agg cag ctg ttt tca gat aaa cta aat gag atc aat gaa			1800
Thr Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu			
545	550	555	
aag att gct cca agt ttt gca gtg gaa tcg att gag gat gca ctg aag			1848
Lys Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys			
560	565	570	575
gca gca gac acc att ggc tac cca gtg atg atc cgt tcc gcc tat gca			1896
Ala Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala			
	580	585	590
ctg ggt ggg tta ggc tca ggc atc tgt ccc aac aga gag act ttg atg			1944
Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met			
	595	600	605
gac ctc agc aca aag gcc ttt gct atg acc aac caa att ctg gtg gag			1992
Asp Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu			
	610	615	620
aag tca gtg aca ggt tgg aaa gaa ata gaa tat gaa gtg gtt cga gat			2040
Lys Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp			
	625	630	635
gct gat gac aat tgt gtc act gtc tgt aac atg gaa aat gtt gat gcc			2088
Ala Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala			
	640	645	650
atg ggt gtt cac aca ggt gac tca gtt gtt gtg gct cct gcc cag aca			2136
Met Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr			
	660	665	670
ctc tcc aat gcc gag ttt cag atg ttg aga cgt act tca atc aat gtt			2184
Leu Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val			
	675	680	685
gtt cgc cac ttg ggc att gtg ggt gaa tgc aac att cag ttt gcc ett			2232
Val Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu			
	690	695	700
cat cct acc tca atg gaa tac tgc atc att gaa gtg aat gcc aga ctg			2280
His Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu			
	705	710	715
tcc cga agc tct gct ctg gcc tca aaa gcc act ggc tac cca ttg gca			2328
Ser Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala			
	720	725	730
ttc att gct gca aag att gcc cta gga atc cca ctt cca gaa att aag			2376
Phe Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys			

	740		745		750	
aac gtc gta tcc ggg aag aca tca gcc tgt ttt gaa cct agc ctg gat						2424
Asn Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp						
	755		760		765	
tac atg gtc acc aag att ccc cgc tgg gat ctt gac cgt ttt cat gga						2472
Tyr Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly						
	770		775		780	
aca tct agc cga att ggt agc tct atg aaa agt gta gga gag gtc atg						2520
Thr Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met						
	785		790		795	
gct att ggt cgt acc ttt gag gag agt ttc cag aaa gct tta cgg atg						2568
Ala Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met						
800		805		810		815
tgc cac cca tct ata gaa ggt ttc act ccc cgt ctc cca atg aac aaa						2616
Cys His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys						
	820		825		830	
gaa tgg cca tct aat tta gat ctt aga aaa gag ttg tct gaa cca agc						2664
Glu Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser						
	835		840		845	
agc acg cgt atc tat gcc att gcc aag gcc att gat gac aac atg tcc						2712
Ser Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser						
	850		855		860	
ctt gat gag att gag aag ctc aca tac att gac aag tgg ttt ttg tat						2760
Leu Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr						
	865		870		875	
aag atg cgt gat att tta aac atg gaa aag aca ctg aaa ggg ctc aac						2808
Lys Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn						
880		885		890		895
agt gag tcc atg aca gaa gaa acc ctg aaa agg gca aag gag att ggg						2856
Ser Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly						
	900		905		910	
ttc tca gat aag cag att tca aaa tgc ctt ggg ctc act gag gcc cag						2904
Phe Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln						
	915		920		925	
aca agg gag ctg agg tta aag aaa aac atc cac cct tgg gtt aaa cag						2952
Thr Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln						
	930		935		940	
att gat aca ctg gct gca gaa tac cca tca gta aca aac tat ctc tat						3000
Ile Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr						

945	950	955	
ggt acc tac aat ggt cag gag cat gat gtc aat ttt gat gac cat gga			3048
Val Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly			
960	965	970	975
atg atg gtg cta ggc tgt ggt cca tat cac att ggc agc agt gtg gaa			3096
Met Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu			
	980	985	990
ttt gat tgg tgt gct gtc tct agt atc cgc aca ctg cgt caa ctt ggc			3144
Phe Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly			
	995	1000	1005
aag aag acg gtg gtg gtg aat tgc aat cct gag act gtg agc aca gac			3192
Lys Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp			
	1010	1015	1020
ttt gat gag tgt gac aaa ctg tac ttt gaa gag ttg tcc ttg gag aga			3240
Phe Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg			
	1025	1030	1035
atc cta gac atc tac cat cag gag gca tgt ggt ggc tgc atc ata tca			3288
Ile Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser			
1040	1045	1050	1055
ggt gga ggc cag att cca aac aac ctg gca gtt cct cta tac aag aat			3336
Val Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn			
	1060	1065	1070
ggt gtc aag atc atg ggc aca agc ccc ctg cag atc gac agg gct gag			3384
Gly Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu			
	1075	1080	1085
gat cgc tcc atc ttc tca gct gtc ttg gat gag ctg aag gtg gct cag			3432
Asp Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln			
	1090	1095	1100
gca cct tgg aaa gct gtt aat act ttg aat gaa gca ctg gaa ttt gca			3480
Ala Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala			
	1105	1110	1115
aag tct gtg gac tac ccc tgc ttg ttg agg cct tcc tat gtt ttg agt			3528
Lys Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser			
1120	1125	1130	1135
ggg tct gct atg aat gtg gta ttc tct gag gat gag atg aaa aaa ttc			3576
Gly Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe			
	1140	1145	1150
cta gaa gag gcg act aga gtt tct cag gag cac cca gtg gtc ctg aca			3624
Leu Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr			

1155	1160	1165	
aaa ttt gtt gaa ggg gcc cga gaa gta gaa atg gac gct gtt ggc aaa			3672
Lys Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys			
1170	1175	1180	
gat gga agg gtt atc tct cat gcc atc tct gaa cat gtt gaa gat gca			3720
Asp Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala			
1185	1190	1195	
ggt gtc cac tcg gga gat gcc act ctg atg ctg ccc aca caa acc atc			3768
Gly Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile			
1200	1205	1210	1215
agc caa ggg gcc att gaa aag gtg aag gat gct acc cgg aag att gca			3816
Ser Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala			
1220	1225	1230	
aag gct ttt gcc atc tct ggt cca ttc aac gtc caa ttt ctt gtc aaa			3864
Lys Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys			
1235	1240	1245	
gga aat gat gtc ttg gtg att gag tgt aac ttg aga gct tct cga tcc			3912
Gly Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser			
1250	1255	1260	
ttc ccc ttt gtt tcc aag act ctt ggg gtt gac ttc att gat gtg gcc			3960
Phe Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala			
1265	1270	1275	
acc aag gtg atg att gga gag aat gtt gat gag aaa cat ctt cca aca			4008
Thr Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr			
1280	1285	1290	1295
ttg gac cat ccc ata att cct gct gac tat gtt gca att aag gct ccc			4056
Leu Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro			
1300	1305	1310	
atg ttt tcc tgg ccc cgg ttg agg gat gct gac ccc att ctg aga tgt			4104
Met Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys			
1315	1320	1325	
gag atg gct tcc act gga gag gtg gct tgc ttt ggt gaa ggt att cat			4152
Glu Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His			
1330	1335	1340	
aca gcc ttc cta aag gca atg ctt tcc aca gga ttt aag ata ccc cag			4200
Thr Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln			
1345	1350	1355	
aaa ggc atc ctg ata ggc atc cag caa tca ttc cgg cca aga ttc ctt			4248
Lys Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu			

1360	1365	1370	1375	
ggt gtg gct gaa caa tta cac aat gaa ggt ttc aag ctg ttt gcc acg				4296
Gly Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr				
	1380	1385	1390	
gaa gcc aca tca gac tgg ctc aac gcc aac aat gtc cct gcc aac cca				4344
Glu Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Asn Pro				
	1395	1400	1405	
gtg gca tgg ccg tct caa gaa gga cag aat ccc agc ctc tct tcc atc				4392
Val Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile				
	1410	1415	1420	
aga aaa ttg att aga gat ggc agc att gac cta gtg att aac ctt ccc				4440
Arg Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro				
	1425	1430	1435	
aac aac aac act aaa ttt gtc cat gat aat tat gtg att cgg agg aca				4488
Asn Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr				
	1440	1445	1450	1455
gct gtt gat agt gga atc cct ctc ctc act aat ttt cag gtg acc aaa				4536
Ala Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys				
	1460	1465	1470	
ctt ttt gct gaa gct gtg cag aaa tct cgc aag gtg gac tcc aag agt				4584
Leu Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser				
	1475	1480	1485	
ctt ttc cac tac agg cag tac agt gct gga aaa gca gca tag				4626
Leu Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala				
	1490	1495	1500	
sgatgcagac accccagccc cattattaaa tcaacctgag ccacatgta tctaaaggaa				4686
ctgattcaca actttctcag agatgaatat tgataactaa acttcatttc agtttacttt				4746
gttatgcctt aatattctgt gtcttttgca attaaattgt cagtcacttc ttcaaacct				4806
tacagtcctt cctaagttac tcttcatgag atttcatcca tttactaata ctgtattttt				4866
ggtaggactag gcttgccat gtgcttatgt gtagcttttt actttttatg gtgctgatta				4926
atggtgatca aggtaggaaa agttgctggt ctattttctg aactttttct atactttaag				4986
atactctatt tttaaaacac tatctgcaaa ctcaggacac tttaacaggg cagaatactc				5046
taaaaacttg ataaaatgaa atatagattt aatttatgaa ccttccatca tgatgtttgt				5106
gtattgcttc tttttgatc ctcattctca cccatttggc taatccagga atattgttat				5166

cccttccat tatattgaag ttgagaatg tgacagagge atttagagta tggacttttc 5226
 tttcttttt ctttttcttt ttttttttt gagatggagt cacactctcc aggetggagt 5286
 gcagtggcac aatctcggt cactgcaatt tgcgtctccc aagtccaagc gattctctctg 5346
 ctttagacta tggatttctt taaggaatac tggtttcag ttttgtttc tggactatat 5406
 cagcagatgg tagacagtgt ttatgtagat gtgttggtgt tttatcatt ggattttaac 5466
 ttggcccgag tgaataatc agattttgt cttcacact ctccccagc tttggaataa 5526
 cttggaagta aggttcattc ccttaagacg atggattctg ttgaactatg gggcccaca 5586
 ctgcactatt aattccacc actgtaaggg caaggacacc attccttcta catataagaa 5646
 aaaagtctct cccaagggc agcctttgtt acttttaaat atttctgtt attacaagtg 5706
 ctctaattgt gaacttttaa ataaaatact attaagaggt aaaaaaaaa aaaaa 5761

<210> 12
 <211> 1500
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

Met Thr Arg Leu Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys Thr
 1 5 10 15
 Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe Ser
 20 25 30
 Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His Ile
 35 40 45
 Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His Pro
 50 55 60
 Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly Tyr
 65 70 75 80
 Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr Met
 85 90 95
 Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala Leu
 100 105 110
 Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys Val
 115 120 125

Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp Leu
 130 135 140

Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro Ala
 145 150 155 160

Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp Lys
 165 170 175

Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe
 180 185 190

Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys Asp
 195 200 205

Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val Asp
 210 215 220

Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly Ala
 225 230 235 240

Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu Tyr
 245 250 255

Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala Glu
 260 265 270

Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys Glu
 275 280 285

Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala Ala
 290 295 300

Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn Gln
 305 310 315 320

Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln Asn
 325 330 335

His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro Leu
 340 345 350

Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu Ser
 355 360 365

Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly Pro
 370 375 380

Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys Lys
 385 390 395 400

Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu Val

	405		410		415
Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly Gly					
	420		425		430
Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln Ala					
	435		440		445
Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn Pro					
	450		455		460
Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala Asp					
465		470		475	480
Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val Ile					
	485		490		495
Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln Thr					
	500		505		510
Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys Glu					
	515		520		525
Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala Thr					
	530		535		540
Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys					
545		550		555	560
Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys Ala					
	565		570		575
Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala Leu					
	580		585		590
Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met Asp					
	595		600		605
Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu Lys					
	610		615		620
Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp Ala					
625		630		635	640
Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala Met					
	645		650		655
Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr Leu					
	660		665		670
Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val Val					
	675		680		685

Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu His
 690 695 700
 Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu Ser
 705 710 715 720
 Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Phe
 725 730 735
 Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys Asn
 740 745 750
 Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp Tyr
 755 760 765
 Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly Thr
 770 775 780
 Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met Ala
 785 790 795 800
 Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met Cys
 805 810 815
 His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys Glu
 820 825 830
 Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser Ser
 835 840 845
 Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser Leu
 850 855 860
 Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr Lys
 865 870 875 880
 Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn Ser
 885 890 895
 Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly Phe
 900 905 910
 Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln Thr
 915 920 925
 Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln Ile
 930 935 940
 Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr Val
 945 950 955 960
 Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly Met

	965		970		975
Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu Phe	980		985		990
Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly Lys	995		1000		1005
Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp Phe	1010		1015		1020
Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg Ile	1025		1030		1035
					1040
Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser Val	1045		1050		1055
Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn Gly	1060		1065		1070
Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu Asp	1075		1080		1085
Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln Ala	1090		1095		1100
Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala Lys	1105		1110		1115
					1120
Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser Gly	1125		1130		1135
Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe Leu	1140		1145		1150
Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr Lys	1155		1160		1165
Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys Asp	1170		1175		1180
Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala Gly	1185		1190		1195
					1200
Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile Ser	1205		1210		1215
Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala Lys	1220		1225		1230
Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys Gly	1235		1240		1245

Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser Phe
 1250 1255 1260
 Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala Thr
 1265 1270 1275 1280
 Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr Leu
 1285 1290 1295
 Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro Met
 1300 1305 1310
 Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys Glu
 1315 1320 1325
 Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His Thr
 1330 1335 1340
 Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln Lys
 1345 1350 1355 1360
 Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu Gly
 1365 1370 1375
 Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr Glu
 1380 1385 1390
 Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Asn Pro Val
 1395 1400 1405
 Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile Arg
 1410 1415 1420
 Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro Asn
 1425 1430 1435 1440
 Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr Ala
 1445 1450 1455
 Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys Leu
 1460 1465 1470
 Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser Leu
 1475 1480 1485
 Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
 1490 1495 1500

- <210> 13
- <211> 5761
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (124)..(4626)
 5
 <400> 13

```

gtcagcetta aacctgact gcaccctcc cagattctt ttacattaac taaaaagtct 60
tatcacacaa tctcataaaa tttatgtaat ttcatttaat tttagccaca aatcatcttc 120
aaa atg acg agg att att aca gct ttc aaa gtg gtg agg aca ctg aag 168
Met Thr Arg Ile Ile Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys
      1           5           10           15
act ggt ttt ggc ttt acc aat gtg act gca cac caa aaa tgg aaa ttt 216
Thr Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe
                20           25           30
tca aga cct ggc atc agg ctc ctt tct gtc aag gca cag aca gca cac 264
Ser Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His
                35           40           45
att gtc ctg gaa gat gga act aag atg aaa ggt tac tcc ttt ggc cat 312
Ile Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His
                50           55           60
cca tcc tct gtt gct ggt gaa gtg gtt ttt aat act ggc ctg gga ggg 360
Pro Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly
                65           70           75
tac cca gaa gct att act gac cct gcc tac aaa gga cag att ctc aca 408
Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr
                80           85           90           95
atg gcc aac cct att att ggg aat ggt gga gct cct gat act act gct 456
Met Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala
                100          105          110
ctg gat gaa ctg gga ctt agc aaa tat ttg gag tct aat gga atc aag 504
Leu Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys
                115          120          125
gtt tca ggt ttg ctg gtg ctg gat tat agt aaa gac tac aac cac tgg 552
Val Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp
                130          135          140
ctg gct acc aag agt tta ggg caa tgg cta cag gaa gaa aag gtt cct 600
Leu Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro
    
```

145	150	155	
gca att tat gga gtg gac aca aga atg ctg act aaa ata att cgg gat			648
Ala Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp			
160	165	170	175
aag ggt acc atg ctt ggg aag att gaa ttt gaa ggt cag cct gtg gat			696
Lys Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp			
	180	185	190
ttt gtg gat cca aat aaa cag aat ttg att gct gag gtt tca acc aag			744
Phe Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys			
	195	200	205
gat gtc aaa gtg tac ggc aaa gga aac ccc aca aaa gtg gta gct gta			792
Asp Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val			
	210	215	220
gac tgt ggg att aaa aac aat gta atc cgc ctg cta gta aag cga gga			840
Asp Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly			
	225	230	235
gct gaa gtg cac tta gtt ccc tgg aac cat gat ttc acc aag atg gag			888
Ala Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu			
240	245	250	255
tat gat ggg att ttg atc gcg gga gga cgg ggg aac cca gct ctt gca			936
Tyr Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala			
	260	265	270
gaa cca cta att cag aat gtc aga aag att ttg gag agt gat cgc aag			984
Glu Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys			
	275	280	285
gag cca ttg ttt gga atc agt aca gga aac tta ata aca gga ttg gct			1032
Glu Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala			
	290	295	300
gct ggt gcc aaa acc tac aag atg tcc atg gcc aac aga ggg cag aat			1080
Ala Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn			
	305	310	315
cag cct gtt ttg aat atc aca aac aaa cag gct ttc att act gct cag			1128
Gln Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln			
320	325	330	335
aat cat ggc tat gcc ttg gac aac acc ctc cct gct ggc tgg aaa cca			1176
Asn His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro			
	340	345	350
ctt ttt gtg aat gtc aac gat caa aca aat gag ggg att atg cat gag			1224
Leu Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu			

355	360	365	
agc aaa ccc ttc ttc gct gtg cag ttc cac cca gag gtc acc ccg ggg			1272
Ser Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly			
370	375	380	
cca ata gac act gag tac ctg ttt gat tcc ttt ttc tca ctg ata aag			1320
Pro Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys			
385	390	395	
aaa gga aaa gct acc acc att aca tca gtc tta ccg aag cca gca cta			1368
Lys Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu			
400	405	410	415
gtt gca tct cgg gtt gag gtt tcc aaa gtc ctt att cta gga tca gga			1416
Val Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly			
420	425	430	
ggt ctg tcc att ggt cag gct gga gaa ttt gat tac tca gga tct caa			1464
Gly Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln			
435	440	445	
gct gta aaa gcc atg aag gaa gaa aat gtc aaa act gtt ctg atg aac			1512
Ala Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn			
450	455	460	
cca aac att gca tca gtc cag acc aat gag gtg ggc tta aag caa gcg			1560
Pro Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala			
465	470	475	
gat act gtc tac ttt ctt ccc atc acc cct cag ttt gtc aca gag gtc			1608
Asp Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val			
480	485	490	495
atc aag gca gaa cag cca gat ggg tta att ctg ggc atg ggt ggc cag			1656
Ile Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln			
500	505	510	
aca gct ctg aac tgt gga gtg gaa cta ttc aag aga ggt gtg ctc aag			1704
Thr Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys			
515	520	525	
gaa tat ggt gtg aaa gtc ctg gga act tca gtt gag tcc att atg gct			1752
Glu Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala			
530	535	540	
acg gaa gac agg cag ctg ttt tca gat aaa cta aat gag atc aat gaa			1800
Thr Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu			
545	550	555	
aag att gct cca agt ttt gca gtg gaa tcg att gag gat gca ctg aag			1848
Lys Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys			

560	565	570	575	
gca gca gac acc att ggc tac cca gtg atg atc cgt tcc gcc tat gca				1896
Ala Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala				
	580	585	590	
ctg ggt ggg tta ggc tca ggc atc tgt ccc aac aga gag act ttg atg				1944
Leu Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met				
	595	600	605	
gac ctc agc aca aag gcc ttt gct atg acc aac caa att ctg gtg gag				1992
Asp Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu				
	610	615	620	
aag tca gtg aca ggt tgg aaa gaa ata gaa tat gaa gtg gtt cga gat				2040
Lys Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp				
	625	630	635	
gct gat gac aat tgt gtc act gtc tgt aac atg gaa aat gtt gat gcc				2088
Ala Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala				
	640	645	650	655
atg ggt gtt cac aca ggt gac tca gtt gtt gtg gct cct gcc cag aca				2136
Met Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr				
	660	665	670	
ctc tcc aat gcc gag ttt cag atg ttg aga cgt act tca atc aat gtt				2184
Leu Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val				
	675	680	685	
gtt cgc cac ttg ggc att gtg ggt gaa tgc aac att cag ttt gcc ctt				2232
Val Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu				
	690	695	700	
cat cct acc tca atg gaa tac tgc atc att gaa gtg aat gcc aga ctg				2280
His Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu				
	705	710	715	
tcc cga agc tct gct ctg gcc tca aaa gcc act ggc tac cca ttg gca				2328
Ser Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala				
	720	725	730	735
ttc att gct gca aag att gcc cta gga atc cca ctt cca gaa att aag				2376
Phe Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys				
	740	745	750	
aac gtc gta tcc ggg aag aca tca gcc tgt ttt gaa cct agc ctg gat				2424
Asn Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp				
	755	760	765	
tac atg gtc acc aag att ccc cgc tgg gat ctt gac cgt ttt cat gga				2472
Tyr Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly				

770	775	780	
aca tct agc cga att ggt agc tct atg aaa agt gta gga gag gtc atg			2520
Thr Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met			
785	790	795	
gct att ggt cgt acc ttt gag gag agt ttc cag aaa gct tta cgg atg			2568
Ala Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met			
800	805	810	815
tgc cac cca tct ata gaa ggt ttc act ccc cgt ctc cca atg aac aaa			2616
Cys His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys			
820	825	830	
gaa tgg cca tct aat tta gat ctt aga aaa gag ttg tct gaa cca agc			2664
Glu Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser			
835	840	845	
agc acg cgt atc tat gcc att gcc aag gcc att gat gac aac atg tcc			2712
Ser Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser			
850	855	860	
ctt gat gag att gag aag ctc aca tac att gac aag tgg ttt ttg tat			2760
Leu Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr			
865	870	875	
aag atg cgt gat att tta aac atg gaa aag aca ctg aaa ggg ctc aac			2808
Lys Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn			
880	885	890	895
agt gag tcc atg aca gaa gaa acc ctg aaa agg gca aag gag att ggg			2856
Ser Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly			
900	905	910	
ttc tca gat aag cag att tca aaa tgc ctt ggg ctc act gag gcc cag			2904
Phe Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln			
915	920	925	
aca agg gag ctg agg tta aag aaa aac atc cac cct tgg gtt aaa cag			2952
Thr Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln			
930	935	940	
att gat aca ctg gct gca gaa tac cca tca gta aca aac tat ctc tat			3000
Ile Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr			
945	950	955	
gtt acc tac aat ggt cag gag cat gat gtc aat ttt gat gac cat gga			3048
Val Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly			
960	965	970	975
atg atg gtg cta ggc tgt ggt cca tat cac att ggc agc agt gtg gaa			3096
Met Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu			

980	985	990	
ttt gat tgg tgt gct gtc tct agt atc cgc aca ctg cgt caa ctt ggc			3144
Phe Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly			
995	1000	1005	
aag aag acg gtg gtg gtg aat tgc aat cct gag act gtg agc aca gac			3192
Lys Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp			
1010	1015	1020	
ttt gat gag tgt gac aaa ctg tac ttt gaa gag ttg tcc ttg gag aga			3240
Phe Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg			
1025	1030	1035	
atc cta gac atc tac cat cag gag gca tgt ggt ggc tgc atc ata tca			3288
Ile Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser			
1040	1045	1050	1055
ggt gga ggc cag att cca aac aac ctg gca gtt cct cta tac aag aat			3336
Val Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn			
1060	1065	1070	
ggt gtc aag atc atg ggc aca agc ccc ctg cag atc gac agg gct gag			3384
Gly Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu			
1075	1080	1085	
gat cgc tcc atc ttc tca gct gtc ttg gat gag ctg aag gtg gct cag			3432
Asp Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln			
1090	1095	1100	
gca cct tgg aaa gct gtt aat act ttg aat gaa gca ctg gaa ttt gca			3480
Ala Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala			
1105	1110	1115	
aag tct gtg gac tac ccc tgc ttg ttg agg cct tcc tat gtt ttg agt			3528
Lys Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser			
1120	1125	1130	1135
ggg tct gct atg aat gtg gta ttc tct gag gat gag atg aaa aaa ttc			3576
Gly Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe			
1140	1145	1150	
cta gaa gag gcg act aga gtt tct cag gag cac cca gtg gtc ctg aca			3624
Leu Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr			
1155	1160	1165	
aaa ttt gtt gaa ggg gcc cga gaa gta gaa atg gac gct gtt ggc aaa			3672
Lys Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys			
1170	1175	1180	
gat gga agg gtt atc tct cat gcc atc tct gaa cat gtt gaa gat gca			3720
Asp Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala			

1185	1190	1195	
ggt gtc cac tcg gga gat gcc act ctg atg ctg ccc aca caa acc atc			3768
Gly Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile			
1200	1205	1210	1215
agc caa ggg gcc att gaa aag gtg aag gat gct acc cgg aag att gca			3816
Ser Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala			
1220	1225	1230	
aag gct ttt gcc atc tct ggt cca ttc aac gtc caa ttt ctt gtc aaa			3864
Lys Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys			
1235	1240	1245	
gga aat gat gtc ttg gtg att gag tgt aac ttg aga gct tct cga tcc			3912
Gly Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser			
1250	1255	1260	
ttc ccc ttt gtt tcc aag act ctt ggg gtt gac ttc att gat gtg gcc			3960
Phe Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala			
1265	1270	1275	
acc aag gtg atg att gga gag aat gtt gat gag aaa cat ctt cca aca			4008
Thr Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr			
1280	1285	1290	1295
ttg gac cat ccc ata att cct gct gac tat gtt gca att aag gct ccc			4056
Leu Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro			
1300	1305	1310	
atg ttt tcc tgg ccc cgg ttg agg gat gct gac ccc att ctg aga tgt			4104
Met Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys			
1315	1320	1325	
gag atg gct tcc act gga gag gtg gct tgc ttt ggt gaa ggt att cat			4152
Glu Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His			
1330	1335	1340	
aca gcc ttc cta aag gca atg ctt tcc aca gga ttt aag ata ccc cag			4200
Thr Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln			
1345	1350	1355	
aaa ggc atc ctg ata ggc atc cag caa tca ttc cgg cca aga ttc ctt			4248
Lys Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu			
1360	1365	1370	1375
ggt gtg gct gaa caa tta cac aat gaa ggt ttc aag ctg ttt gcc acg			4296
Gly Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr			
1380	1385	1390	
gaa gcc aca tca gac tgg ctc aac gcc aac aat gtc cct gcc aac cca			4344
Glu Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Asn Pro			

1395	1400	1405	
gtg gca tgg ccg tct caa gaa gga cag aat ccc agc ctc tct tcc atc			4392
Val Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile			
1410	1415	1420	
aga aaa ttg att aga gat ggc agc att gac cta gtg att aac ctt ccc			4440
Arg Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro			
1425	1430	1435	
aac aac aac act aaa ttt gtc cat gat aat tat gtg att cgg agg aca			4488
Asn Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr			
1440	1445	1450	1455
gct gtt gat agt gga atc cct ctc ctc act aat ttt cag gtg acc aaa			4536
Ala Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys			
1460	1465	1470	
ctt ttt gct gaa gct gtg cag aaa tct cgc aag gtg gac tcc aag agt			4584
Leu Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser			
1475	1480	1485	
ctt ttc cac tac agg cag tac agt gct gga aaa gca gca tag			4626
Leu Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala			
1490	1495	1500	
agatgcagac accccagccc cattattaaa tcaacctgag ccacatgta tctaaaggaa			4686
ctgattcaca actttctcag agatgaatat tgataactaa acttcatttc agtttacttt			4746
gttatgcctt aatattctgt gtcttttgca attaaattgt cagtcacttc ttcaaacct			4806
tacagtccct cctaagttac tcttcatgag atttcatcca ttactaata ctgtattttt			4866
ggtaggactag gcttgccat gtgcttatgt gtagcttttt actttttatg gtgctgatta			4926
atggtgatca aggtaggaaa agttgctggt ctattttctg aactctttct atactttaag			4986
atactctatt tttaaaacac tatctgcaaa ctcaggacac tttaacaggg cagaatactc			5046
taaaaacttg ataaaatgaa atatagattt aatttatgaa ccttccatca tgatgtttgt			5106
gtattgcttc tttttggate ctcattctca cccatttggc taatccagga atattgttat			5166
cccttcccat tatattgaag ttgagaaatg tgacagaggc atttagagta tggacttttc			5226
ttttcttttt cttttctttt tttttctttt gagatggagt cacactctcc aggetggagt			5286
gcagtggcac aatctcggct cactgcaatt tgcgtctccc aagttcaagc gattctctg			5346
ctttagacta tggatttctt taaggaatac tggtttgag ttttgtttc tggactatat			5406

cagcagatgg tagacagtgt ttatgtagat gtgttggtgt ttttatcatt ggattttaac 5466
 ttggcccgag tgaataatc agatttttgt cattcacact ctccccagc tttggaataa 5526
 cttggaagta aggttcattc ccttaagacg atggattctg ttgaactatg gggccccaca 5586
 ctgcactatt aattccaccc actgtaaggg caaggacacc attccttcta catataagaa 5646
 aaaagtctct cccaagggc agcctttggt acttttaaat attttctggt attacaagtg 5706
 ctctaattgt gaacttttaa ataaaatact attaagaggt aaaaaaaaaa aaaaa 5761

<210> 14
 <211> 1500
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

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

10

Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn Pro
 450 455 460
 Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala Asp
 465 470 475 480
 Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val Ile
 485 490 495
 Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln Thr
 500 505 510
 Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys Glu
 515 520 525
 Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala Thr
 530 535 540
 Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys
 545 550 555 560
 Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys Ala
 565 570 575
 Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala Leu
 580 585 590
 Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met Asp
 595 600 605
 Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu Lys
 610 615 620
 Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp Ala
 625 630 635 640
 Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala Met
 645 650 655
 Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val Val
 675 680 685
 Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu His
 690 695 700
 Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu Ser
 705 710 715 720
 Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Phe

Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp Phe
 1010 1015 1020
 Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg Ile
 1025 1030 1035 1040
 Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser Val
 1045 1050 1055
 Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn Gly
 1060 1065 1070
 Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu Asp
 1075 1080 1085
 Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln Ala
 1090 1095 1100
 Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala Lys
 1105 1110 1115 1120
 Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser Gly
 1125 1130 1135
 Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe Leu
 1140 1145 1150
 Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr Lys
 1155 1160 1165
 Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys Asp
 1170 1175 1180
 Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala Gly
 1185 1190 1195 1200
 Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile Ser
 1205 1210 1215
 Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala Lys
 1220 1225 1230
 Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys Gly
 1235 1240 1245
 Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser Phe
 1250 1255 1260
 Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala Thr
 1265 1270 1275 1280
 Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr Leu

ES 2 539 272 T3

	1285	1290	1295
Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro Met			
	1300	1305	1310
Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys Glu			
	1315	1320	1325
Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His Thr			
	1330	1335	1340
Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln Lys			
	1345	1350	1355
Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu Gly			
	1365	1370	1375
Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr Glu			
	1380	1385	1390
Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Asn Pro Val			
	1395	1400	1405
Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile Arg			
	1410	1415	1420
Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro Asn			
	1425	1430	1435
Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr Ala			
	1445	1450	1455
Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys Leu			
	1460	1465	1470
Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser Leu			
	1475	1480	1485
Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala			
	1490	1495	1500

<210> 15
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15

10 cggaagccac atcagactgg 20

<210> 16
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Homo sapiens
 <400> 16
 5 ggagagtgaa acttgacaat catc 24
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 tactgctcag aatcatggc 19
 15 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 18
 tcatcaccaa ctgaacagg 19
 25 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 19
 ggttaagaga aggaggagct 21
 <210> 20
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 40 aaccagtctt cagtgctctc a 21

REIVINDICACIONES

1. Citrulina para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de una afección o trastorno en un sujeto que se somete a cirugía cardíaca, que está asociado con la función subóptima del ciclo de la urea.
- 5
2. La citrulina para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la citrulina se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg.
- 10
3. La citrulina para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la citrulina se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg.
- 15
4. La citrulina para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la citrulina se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg.
- 20
5. La citrulina para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto es un sujeto humano.

FIGURA 1

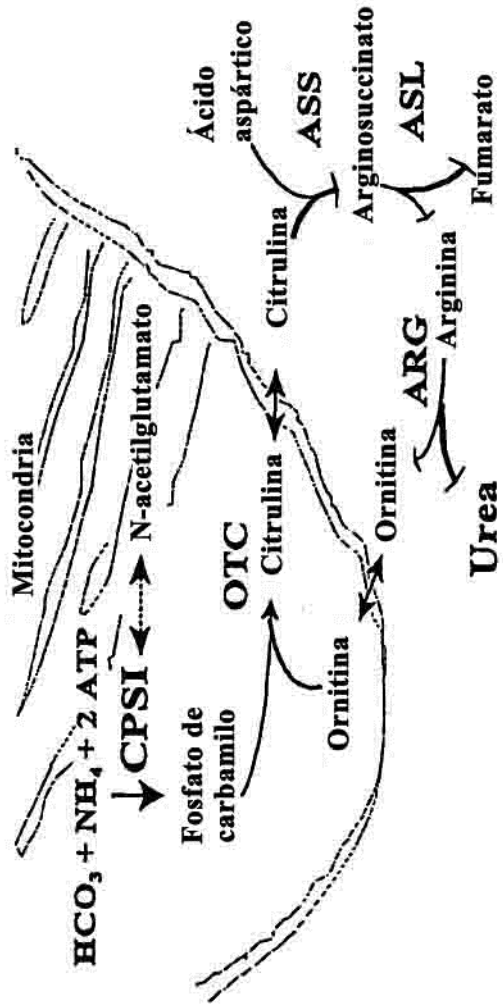


FIGURA 2

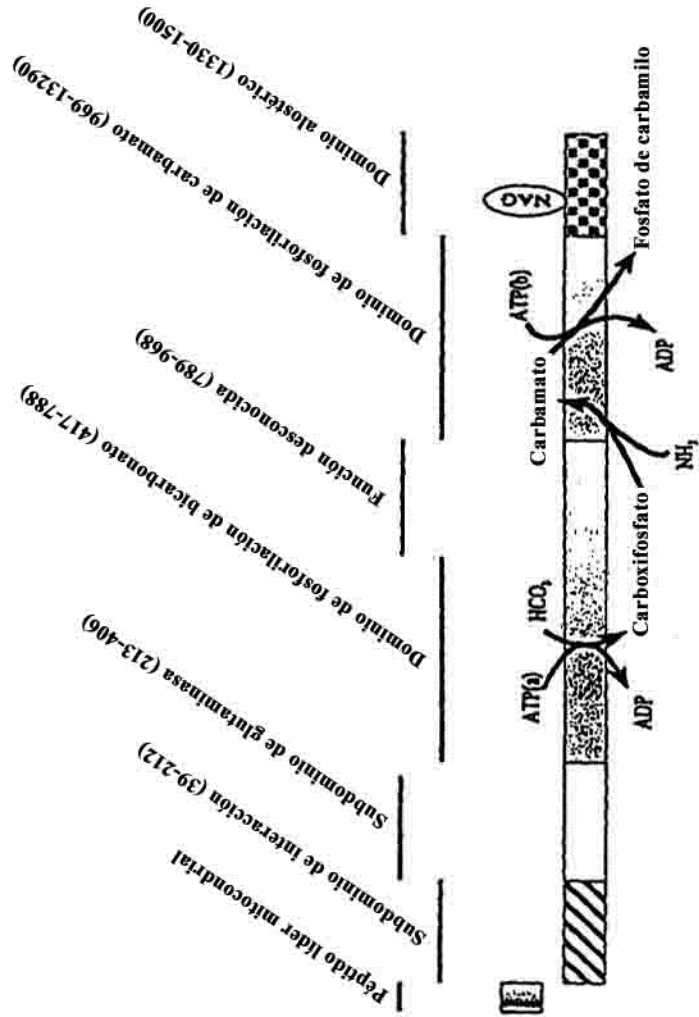


FIGURA 3

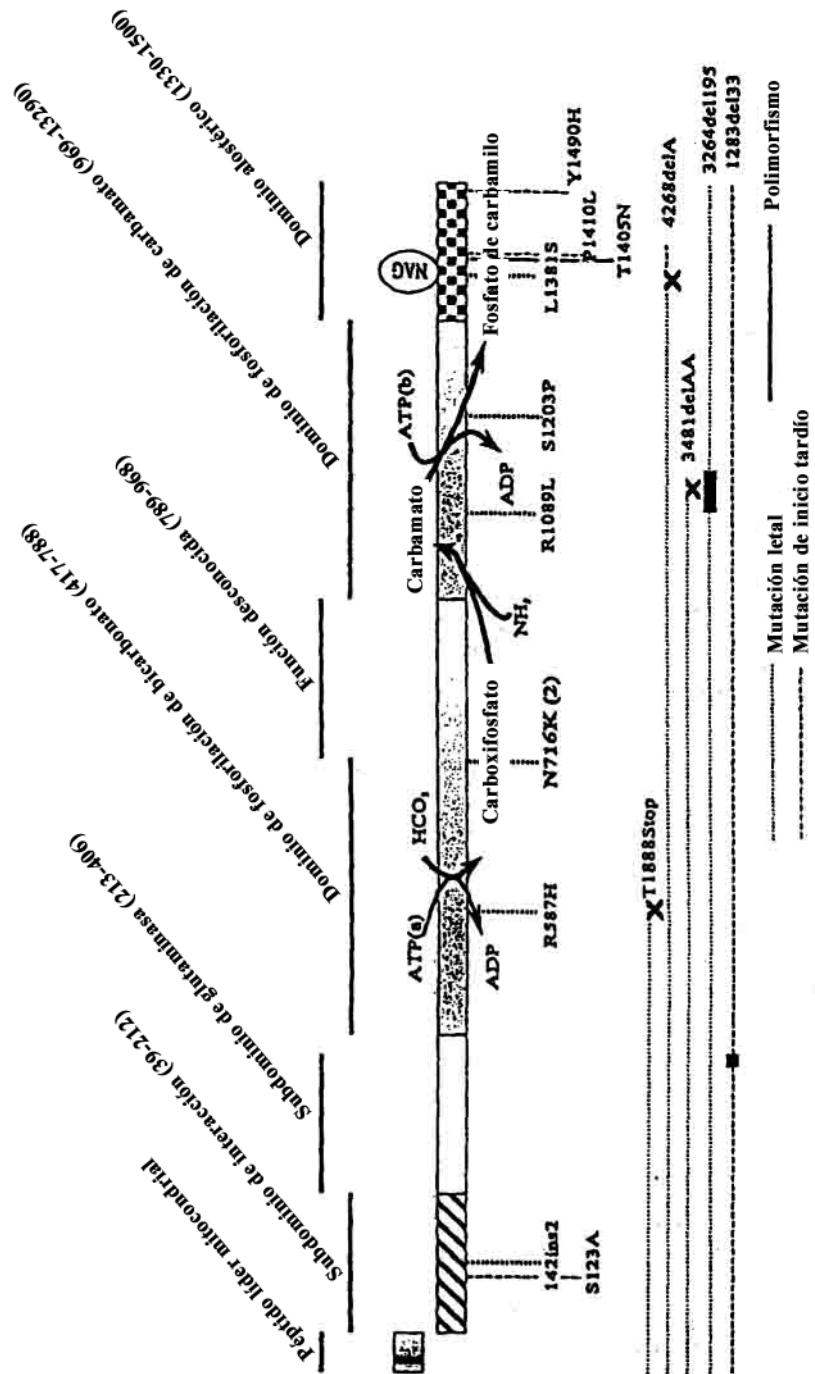


FIGURA 4

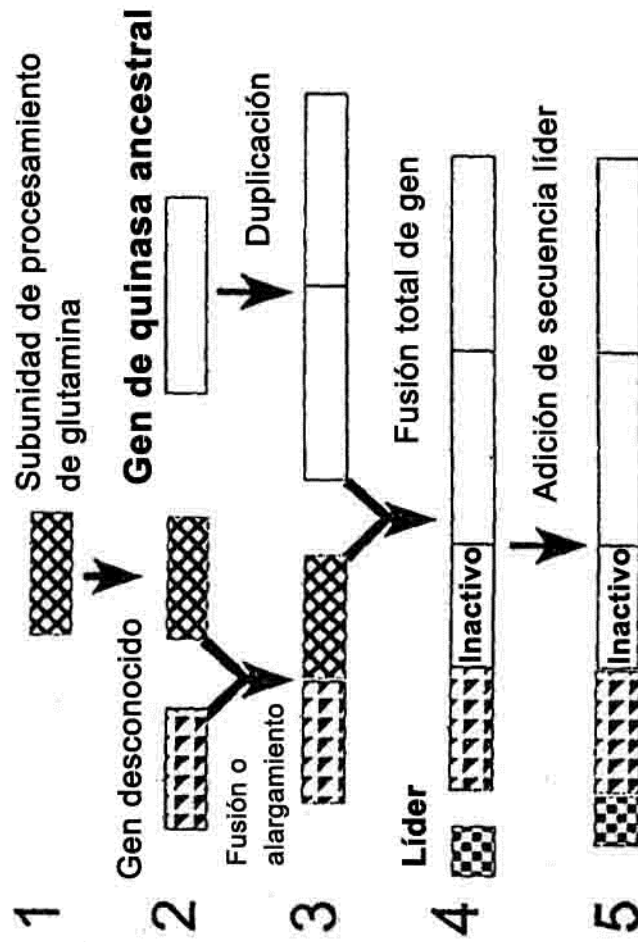


FIGURA 5

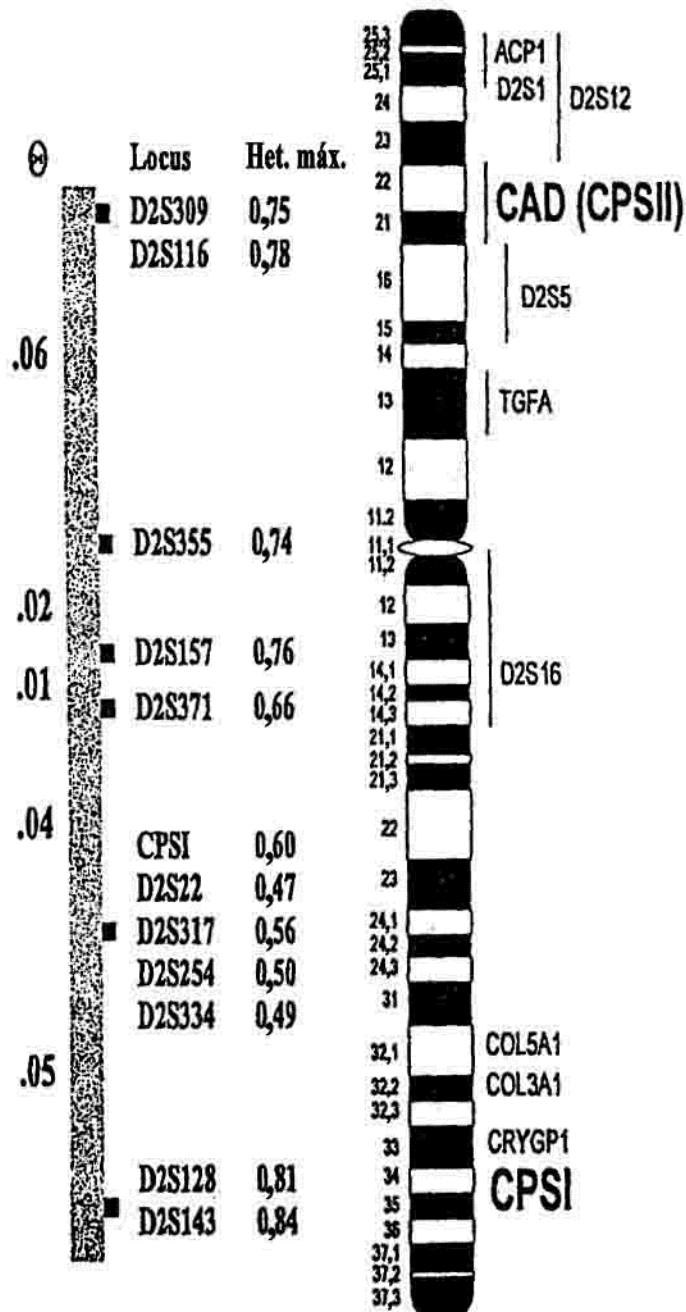


FIGURA 6

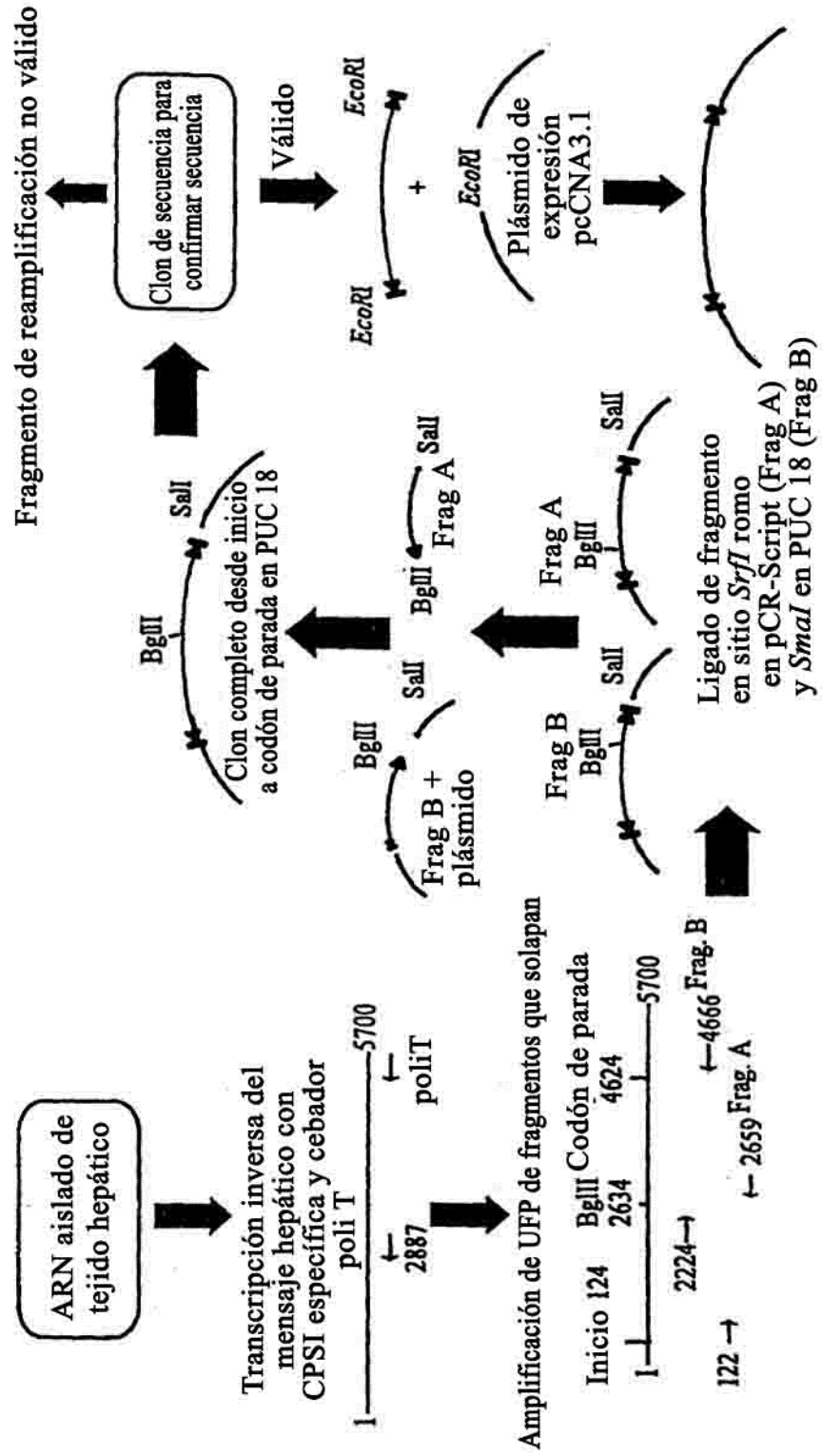


FIGURA 7

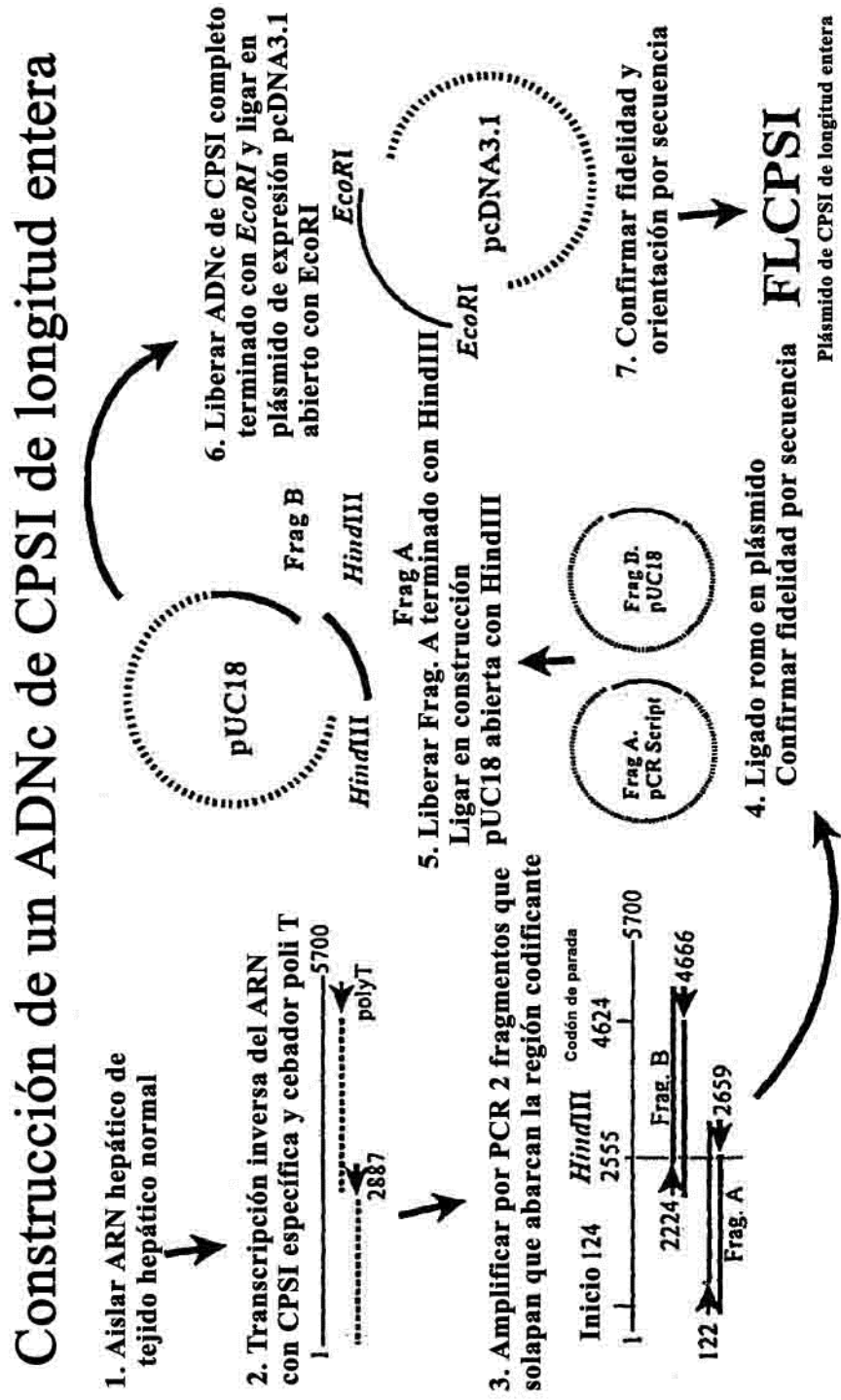


FIGURA 8

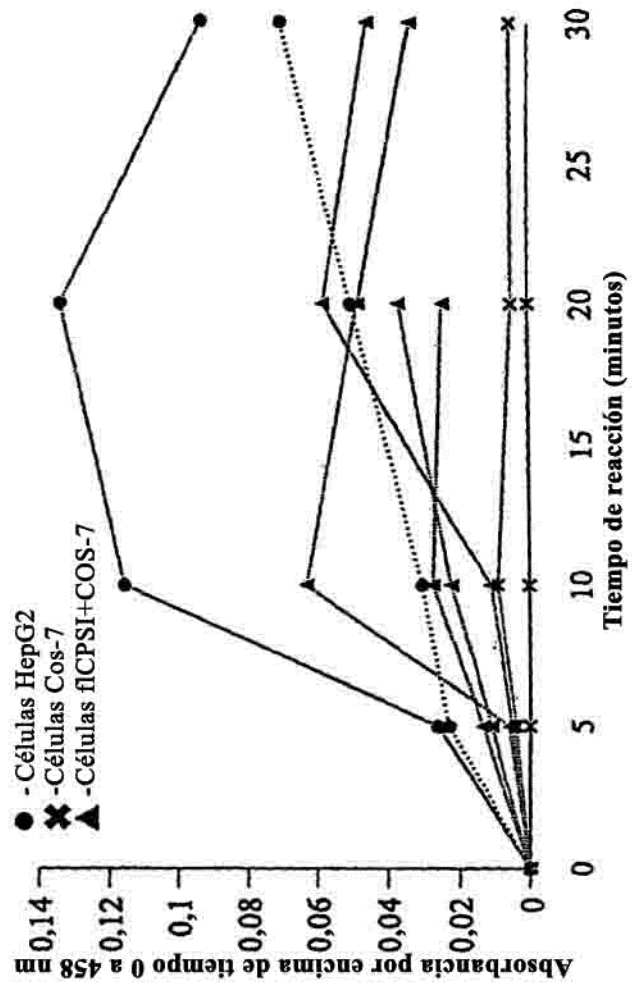


FIGURA 9

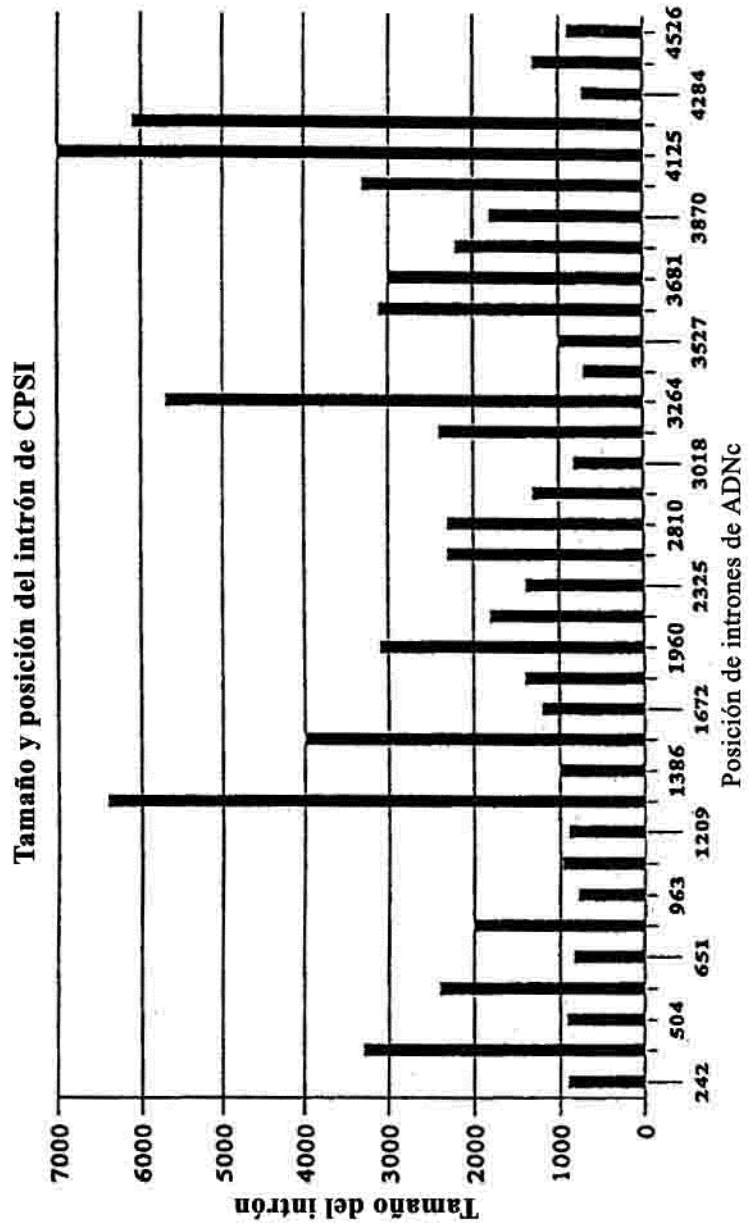


FIGURA 10

```

1
ctacttctca tggtcagcaa tttcttcttc tttatgtttt aaattacatg ttccataaaa ataagaant
71
cactgtgata cggtaattga ttttttcatt ttaaatgcag/(límite intrón-exón)
111 (U4295)
CTGTTTGCCA CGGAAGCCAC ATCAGACTGG CTCAACGCCA ACAATGTCCC TGCCACCCCA GTGGCATGGC
181
CGTCTCAAGA AGGACAGAAT CCCAGCCTCT CTTCCATCAG AAA/ (límite intrón-exón)
224 GTCGGAGA GAAGGTAGTC TT L(135a)
gtaagaacta ggcatactgt tttctgaat aatttagagg attaactttg agaaccagta tatgaatatt
294
caccttgctt gattgcaagt cttttaaac aatttaaaa atgaatacat ttgtggatga ttgtcaagtt
364 (L135b)
tcacttcca tcactatgga atacatacag tcctgtgtac atgggtgatat gaacgtggtt tcaaatact
434
tcttagtaag gatactttcc ttgacggaaa caagtggag tatgaagaat gtaatgcagc ac
    
```

Cebador	Empieza	Tamaño	SEQ ID NO:
U4295	119	20	8
L135a	220	21	9
L135b	370	24	10
Extensor 1	agctgtttgccacggaagcc		6
Extensor 2	cccagcctctcttccatcagaaagtaag		7

Parejas

U4295 - L135a fragmento de 101 bases

U4295 - L135b fragmento de 251 bases

Extensor 1 - Extensor 2 fragmento de 119 bases

FIGURA 11

SECUENCIA DE CPSI T1405 (SEQ ID NO: 4)

MTRILTAFKV VRTLKTGFGF TNVTAHQKWK FSRPGIRLLS VKAQTAHIVL EDGTKMKGYS
FGHPSSVAGE VVFNTGLGGY PEAITDPAYK GQILTMANPI IGNGGAPDTT ALDELGLSKY
LENGIKVSG LLVLDYSKDY NHWLATKSLG QWLQEEKVPA IYGVDRMLT KIIRDKGTML
GKIEFEGQPV DFVDPNKQNL IAEVSTKDVK VYGKGNPTKV VAVDCGIKNN VIRLLVKRGA
EVHLVPWNHD FTKMEYDGIL IAGGPGNPAL AEPLIQNVRK ILES DRKEPL FGISTGNLIT
GLAAGAKTYK MSMANRGQNO PVLNITNKQA FITAQNHGYA LDNTLPAGWK PLFVNVNDQT
NEGIMHESKP FFAVQFHPEV TPGPIDTEYL FDSFFSLIKK GKATTITSVL PKPALVASRV
EVSKVLILGS GGLSIGQAGE FDYSGSQAVK AMKEENVKTV LMNPNIASVQ TNEVGLKQAD
TVYFLPITPQ FVTEVIKAEQ PDGLILGMGG QTALNCGVEL FKRGLVKEYG VKVLGTSVES
IMATEDRQLF SDKLNEINEK IAPSFIVESI EDALKAADTI GYPVMIRSAY ALGGLGSGIC
PNRETLMDLS TKAFAMTNQI LVEKSVTGWK EIEYEVV RDA DDNCVTV CNM ENVDAMGVHT
GDSVVAPAQ TLSNAEFQML RRTSINVVRH LGIVGECNIQ FALHPTSMEY CIEVNARLS
RSSALASKAT GYPLAFIAAK IALGIPLPEI KNVVS GK TSA CFEPSLDY MV TKIPRWDLDR
FHGTSSRIGS SMKSVGEVMA IGRTFEESFQ KALRMCHPSI EGFTPRLPMN KEWPSNLDLR
KELSEPSSTR IYAJAKAIDD NMSLDEIEKL TYIDKWFLYK MRDILNMEKT LKGLNSESMT
EETLKRAKEI GFSDKQISKC LGLTEAQTRE LRLKKNHPW VKQIDTLAAE YPSVTNYLYV
TYNGQEHDVN FDDHGMMVLG CGPYHIGSSV EFDWCAVSSI RTLRQLGKKT VVNCNPETV
STDFDECDKL YFEELSLERI LDIYHQEACG GCII SVGGQI PNNLAVPLYK NGVKIMGTSP
LQIDRAEDRS IFSAVLDELK VAQAPWKAVN TLNEALEFAK SVDYPCLLRP SYVLSGSAMN
VVFSEDEMKK FLEEATRVSQ EHPVVLTKFV EGAREVEMDA VGKDGRVISH AISEHVEDAG
VHSGDATLML PTQTISQGA I EKVKDATRKI AKAF AISGPF NVQFLVKGND VLIECNLRA
SRSFPFVSKT LGVDFIDVAT KVMIGENVDE KHLPTLDHPI IPADYVAIKA PMFSWPRLRD
ADPILRCEMA STGEVACFGE GIHTAFLKAM LSTGFKIPQK GILIGIQSF RPRFLGVAEQ
LHNEGFKLFA TEATSDWLN A NNVPATPVAW PSQEGQNPSL SSIRKLIRDG SIDLVINLPN
NNTKFDVHDNY VIRRTAVDSG IPLL TNFQVT KLFAEAVQKS RKVDSKSLFH YRQYSAGKAA
X

FIGURA 12

SECUENCIA DE CPSI N1405 (SEQ ID NO: 2)

MTRILTAFKV VRTLKTGFGF TNVTAHQKWK FSRPGIRLLS VKAQTAHIVL EDGTKMKGY
FGHPSSVAGE VVFNLTGLGGY PEAITDPAYK GQILTMANPI IGNGGAPDTT ALDELGLSKY
LESNGIKVSG LLVLDYSKDY NHWLATKSLG QWLQEEKVPA IYGVDTRMLT KIIRDKGTML
GKIEFEGQPV DFVDPNKQNL IAEVSTKDVK VYGKGNPTKV VAVDCGIKNN VIRLLVKRGA
EVHLVPWNHD FTKMEYDGIL IAGGPGNPAL AEPLIQNVRK ILES DRKEPL FGISTGNLIT
GLAAGAKTYK MSMANRGQNQ PVLNITNKQA FITAQNHGYA LDNTLPAGWK PLFVNVNDQT
NEGIMHESKP FFAVQFHPEV TPGPIDTEYL FDSFFSLIKK GKATTITSVL PKPALVASRV
EVSKVLILGS GGLSIGQAGE FDYSGSQAVK AMKEENVKTV LMNPNIASVQ TNEVGLKQAD
TVYFLPITPQ FVTEVIKAEQ PDGLILGMGG QTALNCGVEL FKRGVLKEYG VKVLGTSVES
IMATEDRQLF SDKLNEINEK IAPSFAVESI EDALKAADTI GYPVMIRSAY ALGGLGSGIC
PNRETLM DLS TKAFAMTNQI LVEKSVTGWK EIEYEVV RDA DDNCVTVCNM ENVDAMGVHT
GDSVVVAPAQ TLSNAEFQML RRTSINVVRH LGIVGECNIQ FALHPTSMEY CIIEVNARLS
RSSALASKAT GYPLAFIAAK IALGIPLPEI KNVVSGK TSA CFEPSLDYMV TKIPRWDLDR
FHGTSSRIGS SMKSVGEVMA IGRTFEESFQ KALRMCHPSI EGFTPRLPMN KEWPSNLDLR
KELSEPSSTR IYAIKAIDD NMSLDEIEKL TYIDKWFLYK MRDILNMEKT LKGLNSESMT
EETLKRAKEI GFSDKQISKC LGLTEAQTRE LRLKKNHPW VKQIDTLAE YPSVTNYLYY
TYNGQEHVDN FDDHGMMVLG CGPYHIGSSV EFDWCAVSSI RTLRQLGKKT VVNCNPETV
STDFDECDKL YFEELSLERI LDYHQEACG GCIISVGGQI PNNLAVPLYK NGVKIMGTSP
LQIDRAEDRS IFSAVLDELK VAQAPWKAVN TLNEALEFAK SVDYPCLLRP SYVLSGSAMN
VVFSEDEMCK FLEEATRVSQ EHPVWLTKFV EGAREVEMDA VGKDGRVISH AISEHVEDAG
VHSGDATLML PTQTISQGA I EKVKDATRKI AKAF AISGPF NVQFLVKGND VLVECNLRA
SRSFPFVSKT LGVDFIDVAT KVMIGENVDE KHLPTLDHPI IPADYVAIKA PMFSWPRLRD
ADPILRCEMA STGEVACFGE GIHTAFLKAM LSTGFKIPQK GILIGIQSF RPRFLGVAEQ
LHNEGFKLFA TEATSDWLNA NNVPANPVAW PSQEGQNPSL SSIRKLIRDG SIDLVINLPN
NNTK FVHDNY VIRRTAVDSG IPLL TNFQVT KLFAEAVQKS RKVDSKSLFH YRQYSAGKAA
X