

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 795**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2010 PCT/IB2010/001123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128393**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2010 E 10740698 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2427484**

54 Título: **Método y composición de medición de la cantidad de derivados de vitamina D**

30 Prioridad:

06.05.2009 US 175919 P

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

26.10.2016

73 Titular/es:

**OPKO IRELAND GLOBAL HOLDINGS, LIMITED
(100.0%)
Citywest Business Campus
3013 Lake Drive Dublin 24, IE**

72 Inventor/es:

**PETKOVICH, P., MARTIN y
HELVIG, CHRISTIAN, F.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 587 795 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

Método y composición de medición de la cantidad de derivados de vitamina D

5 Antecedentes

Campo de la divulgación

10 La presente invención se refiere, en general, a métodos y a composiciones para la medición de la cantidad de derivados de vitamina D. Más particularmente, la invención se refiere al uso de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y de un dominio de unión al ligando modificado del receptor de la vitamina D (LBD de VDR) para medir los derivados de vitamina D.

15 Breve descripción de la tecnología relacionada

El colecálciferol y el ergocalciferol (denominados colectivamente "Vitamina D") son precursores seco-esteroides liposolubles de las prohormonas de la vitamina D. Los metabolitos de la vitamina D conocidos como 25-hidroxi-vitamina D₂ y 25-hidroxi-vitamina D₃ (denominados colectivamente en el presente documento "25-hidroxi-vitamina D") son prohormonas esteroides liposolubles de las hormonas de la vitamina D que contribuyen al mantenimiento de los niveles normales de calcio y de fósforo en el torrente sanguíneo. El colecálciferol y el ergocalciferol están normalmente presentes a bajas concentraciones estables en la sangre humana. Tanto el colecálciferol como el ergocalciferol son metabolizados en prohormonas por enzimas localizadas principalmente en el hígado del cuerpo humano. El colecálciferol se metaboliza en la prohormona 25-hidroxi-vitamina D₃, y el ergocalciferol se metaboliza en dos prohormonas, la 25-hidroxi-vitamina D₂ y la 24(S)-hidroxi-vitamina D₂.

25 Los prohormonas de la vitamina D se metabolizan además en los riñones en potentes hormonas. La prohormona 25-hidroxi-vitamina D₃ se metaboliza en la hormona 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₃ (o calcitriol); asimismo, la 25-hidroxi-vitamina D₂ y la 24(S)-hidroxi-vitamina D₂ se metabolizan en las hormonas conocidas como 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₂ y 1 α ,24(S)-dihidroxi-vitamina D₂, respectivamente. La producción de estas hormonas a partir de las prohormonas también puede ocurrir fuera del riñón en células que contienen la/s enzima/s necesaria/s.

30 Los aumentos repentinos de las concentraciones de las prohormonas en sangre o intracelulares pueden potenciar la producción excesiva de hormonas extrarrenales, dando lugar a efectos adversos locales sobre el metabolismo del calcio y del fósforo. Dichos aumentos repentinos también pueden inhibir la producción hepática de prohormonas a partir de la posterior vitamina D complementaria y potenciar el catabolismo tanto de la vitamina D como de la 25-hidroxi-vitamina D en el riñón y en otros tejidos.

35 Las hormonas de la vitamina D tienen papeles esenciales en la salud humana que están mediados por los receptores intracelulares de la vitamina D (VDR). En particular, las hormonas de la vitamina D regulan los niveles de calcio en sangre mediante el control de la absorción del calcio de la dieta en el intestino delgado y la reabsorción del calcio por los riñones. Los niveles excesivos de hormonas pueden conducir a niveles anormalmente elevados de calcio en orina (hipercalcúria), de calcio en sangre (hipercalcemia) y de fósforo en sangre (hiperfosfatemia). Las hormonas de la vitamina D también participan en la regulación de la diferenciación y del crecimiento celulares, la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) por las glándulas paratiroideas, y la formación y el metabolismo normales de los huesos. Además, las hormonas de la vitamina D son necesarias para el funcionamiento normal del músculo esquelético, el sistema inmunológico, y el sistema de la angiotensina y la renina. Otras numerosas funciones de las hormonas de la vitamina D se postularán y se aclararán basándose en la presencia documentada del VDR intracelular en casi todos los tejidos humanos.

40 Las acciones de las hormonas de la vitamina D en tejidos específicos dependen del grado al que se unen con (u ocupan) el VDR intracelular en esos tejidos. El colecálciferol y el ergocalciferol tienen afinidades por el VDR que se estiman en al menos 100 veces inferiores a las de las hormonas de la vitamina D. Por consiguiente, las concentraciones fisiológicas del colecálciferol y del ergocalciferol ejercen pocas, si es que ejercen alguna, acciones biológicas sin el metabolismo previo en las hormonas de la vitamina D. Sin embargo, los niveles suprafisiológicos del colecálciferol y del ergocalciferol, en el intervalo de 10 a 1.000 veces superiores a los normales, pueden ocupar suficientemente el VDR y ejercer acciones como las hormonas de la vitamina D. Del mismo modo, las prohormonas 25-hidroxi-vitamina D₂ y 25-hidroxi-vitamina D₃ tienen afinidades esencialmente idénticas por el VDR, que también se estiman en al menos 100 veces inferiores a las de las hormonas de la vitamina D. Por consiguiente, las concentraciones fisiológicas de 25-hidroxi-vitamina D₂ y 25-hidroxi-vitamina D₃ tienen pocas, o ninguna, acciones biológicas sin el metabolismo previo en las hormonas de la vitamina D. No obstante, los niveles suprafisiológicos de la 25-hidroxi-vitamina D₂ y 25-hidroxi-vitamina D₃, en el intervalo de 10 a 1.000 veces superiores a los normales, pueden ocupar suficientemente el VDR para ejercer acciones como las hormonas de la vitamina D.

65 Como con la mayoría de los receptores nucleares, el VDR experimenta un cambio conformacional tras la unión del ligando ("helix 12 folds underneath H4"; Rochel, N., *et al.*; *Mol. Cell.* 5, 173-179(2000); Nayeri, S y Carlberg, C. *Biochem J.* 327, 561-568 (1997)). El dominio de unión al ligando del VDR humano se compone de los aminoácidos

~118-427. Los restos de aminoácidos que participan en el puente de hidrógeno con el ligando incluyen Ser-237, Arg-274, Tyr-143, Ser-278, His-305 e His-397. Los aminoácidos que interactúan con el ligando a través de interacciones distintas a los puentes de hidrógeno incluyen Tyr-147, Phe-150, Leu-227, Leu-230, Leu-233, Val-234, Ile-271, Ser-275, Trp-286, Cys-288, Val-300, Leu-309, Leu-313 y Val-418. Val-418 se encuentra en la hélice de activación (hélice 12) y es probable que experimente un cambio en la proximidad como resultado de los cambios conformacionales inducidos por el ligando (Rochel, N., *et al.*, *Mol. Cell.* 5, 173-179 (2000)).

El documento WO2008092917 desvela un método de determinación cuantitativa de la vitamina D en el suero o en el plasma mediante un análisis de unión competitiva. El método incluye las siguientes etapas: (a) la adición de una proteasa serina con actividad endo- y exo-proteolítica y llevar a cabo una digestión de las proteínas de unión a la vitamina D en el plasma sanguíneo o el suero hasta que ya no se puedan unir más a ningún metabolito de la vitamina D; (b) la dilución de la muestra que contiene la proteasa serina, los metabolitos de la vitamina D y las proteínas plasmáticas o séricas digeridas usando un tampón de dilución en el que la proteasa serina se inactiva esencialmente; (c) el suministro de una composición de trazador de la vitamina D que está acoplada a una fase sólida; (d) el suministro de un anticuerpo, preferentemente, un anticuerpo monoclonal contra los metabolitos de la vitamina D; (e) la combinación de la muestra con los metabolitos de la vitamina D, la fase sólida con el compuesto trazador de la vitamina D y el anticuerpo; y realización de una reacción de unión competitiva del metabolito de la vitamina D y el trazador de la vitamina D en el anticuerpo en un tampón de unión en el que la proteasa serina es esencialmente inactiva; y (f) la separación de la fase sólida con el compuesto trazador de la vitamina D y el anticuerpo unido del tampón de unión y, opcionalmente, el lavado de la fase sólida; y (g) la determinación de la cantidad de anticuerpo monoclonal en la fase sólida. Un método que se puede usar para monitorizar las interacciones proteína-proteína es la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Berrera *et al.*, *Handb. Exp. Pharmacol.* 186, 285-298 (2008)). La microscopía de FRET detecta la transferencia de energía desde un fluorocromo donante de energía superior a un fluorocromo aceptor de energía inferior cuando están muy juntos. La transferencia de energía de resonancia es un mecanismo mediante el cual la energía se transfiere directamente de una molécula a otra. Esto solo se produce en una distancia muy pequeña, por lo general, inferior a 10 nm, que es del orden del tamaño de una proteína típica. Cuando cada miembro de un par proteína-proteína se marca con los fluoróforos apropiados (donante y aceptor), la FRET se puede usar para detectar cuándo las proteínas están próximas. También se puede usar la FRET para detectar los cambios conformacionales en una sola proteína marcada con dos fluoróforos.

Sumario

La invención reivindicada se dirige a medir la 25-hidroxi-vitamina D para evaluar la deficiencia de vitamina D. La 25-hidroxi-vitamina D caerá antes de que se observe cualquier efecto en el nivel de calcitriol. Por lo tanto, en los pacientes en los que se sospecha que los niveles de vitamina D no son normales (por ejemplo, enfermedad renal crónica (ERC), enfermedad de los huesos y ancianos), la medición y el seguimiento de los niveles de 25-hidroxi-vitamina D son fundamentales.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de medición de la cantidad de concentración de un derivado de vitamina D en una muestra, de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento.

El VDR modificado puede tener una afinidad al menos 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces o 300 veces superior por la 25-hidroxi-vitamina D que por otros derivados de vitamina D. En una realización relacionada, el VDR modificado tiene una afinidad al menos 10 veces superior por la 25-hidroxi-vitamina D que por otros derivados de vitamina D.

En otra realización más de la invención, se proporciona el método anteriormente mencionado en el que la muestra es de un sujeto mamífero o humano. En otra realización, el ser humano padece la enfermedad renal crónica (ERC).

En una realización, la mutación comprende una sustitución en la posición del aminoácido 274. En una realización relacionada, la mutación de la posición 274 comprende una sustitución de un resto de aminoácido básico con un resto de aminoácido alifático. En otra realización más, la mutación comprende Arg274Leu.

En otra realización de la invención, se proporciona el método anteriormente mencionado en el que la fluorescencia se mide usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). En otra realización, el par de donante-aceptor de los fluoróforos se selecciona del grupo que consiste en proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína azul verdoso fluorescente (CFP), proteína amarilla fluorescente (YFP) y fragmentos activos de las mismas.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 8 del presente documento. En otra realización, la mutación comprende una sustitución en la posición del aminoácido 274. En una realización relacionada, la mutación en la posición 274 comprende una sustitución de un resto de aminoácido básico con un resto de aminoácido alifático. En otra realización más, la mutación comprende Arg274Leu.

Otros aspectos y ventajas serán evidentes para los expertos habituales en la materia tras revisar la siguiente descripción detallada, tomada en combinación con las figuras. Si bien las composiciones y los métodos son susceptibles de realizaciones en diversas formas, la descripción que se presenta de aquí en adelante incluye realizaciones específicas con el entendimiento de que la divulgación es ilustrativa, y no se pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A y B muestra un alineamiento del VDR humano y homólogos de otras especies, así como la ubicación aproximada de los dominios de unión al ADN, dominios de unión al ligando y hélices para cada secuencia. El alineamiento de secuencias (A) del dominio de unión al ADN y (B) del dominio de unión al ligando de tres PXR, cinco VDR, VDR/PXR de *Ciona intestinalis* y CAR humana. El dominio de unión al ligando se anota con las hélices α [1]. Los números de acceso son: PXR humana [Genbank: AF061056], PXR de pollo [Genbank: AF276753], PXR de takifugu [Ensembl, <http://www.ensembl.org:NEWSINFRUT00000171584>], VDR humano [Genbank: NM_00376], VDR de ratón [Genbank: NM_008504], VDR de *Xenopus laevis* [Genbank: U91849], VDR de pez cebra [Genbank: AF164512], lamprea marina VDR [Genbank: AY249863], VDR/PXR de *Ciona intestinalis* [Genbank: BR000137] y CAR humana [Genbank: NM_005122]. Moore *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 16:977-986 (2002).

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos de VDR humano (SEQ ID NO: 1) y la ubicación de Ser-237 y Arg-274, como se indica en negrita. Los aminoácidos del dominio de unión al ligando (LBD) se indican con letras mayúsculas. Los aminoácidos que, en algunas realizaciones, no se pueden expresar se indican en cursiva. La eliminación de esta secuencia relativamente no conservada y flexible permite la cristalización y no tiene ningún efecto sobre la unión del ligando, la dimerización con RXR ni la transactivación *in vitro* (Rochel, 2000).

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína amarilla fluorescente (YFP) (SEQ ID NO: 2).

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína azul verdosa fluorescente (CFP) (SEQ ID NO: 3).

La Figura 5 muestra un ejemplo de una secuencia de aminoácidos LBD de VDRm (SEQ ID NO: 4) (sYFP2-VDR_{LBD}delta-enlazador-sCFP3A).

La Figura 6 muestra dos posibles construcciones de LBD de VDR modificado (LBD de VDRm).

Descripción detallada

La presente invención desvela un ensayo rápido y clínicamente accesible para la medición de las moléculas de vitamina D. Con este fin, se construyen biosensores de alta sensibilidad basándose en el dominio de unión al ligando del VDR (LBD de VDR). Tras la unión del ligando (por ejemplo, la vitamina D o un análogo de vitamina D activo), o tras la liberación de un ligando unido, el LBD experimenta un cambio conformacional. Estos fenómenos se pueden monitorizar mediante la adaptación de fluoróforos de donante-aceptor emparejados al LBD de VDR cuya proximidad entre sí se altera como consecuencia del cambio inducido por el ligando en la conformación. Este cambio en la proximidad puede generar una señal medible a través de Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET), que es la transferencia de energía de un fluoróforo donante a un aceptor. En una realización, la FRET se producirá entre las proteínas indicadoras SCFP3A y SYFP2, que están adaptadas al LBD de VDR. A modo de ejemplo, en una realización, las proteínas indicadoras son SCFP3A (SCFP3A, número de acceso: AAZ65848). Kremers, G-J., *et al* (2006) *Biochemistry* 45, 6570-6580) y SYFP2 (SYFP2, número de acceso: AAZ65845) Kremers, G-J., *et al* (2006) *Biochemistry* 45, 6570-6580).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto una definición general de muchos de los términos usados en la presente invención: Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2^a ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5^a ED., R. Rieger, *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

Cabe señalar que, como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye, en general, seres humanos, mamíferos (por ejemplo, perros, gatos, roedores, ovejas, caballos, vacas, cabras), animales veterinarios y animales de zoológico.

También se entiende específicamente que cualquier valor numérico citado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior, es decir, todas las combinaciones posibles de los valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados han de considerarse indicados expresamente en

la presente solicitud. Por ejemplo, si se establece un intervalo de concentraciones o un intervalo de efectos beneficiosos como del 1 % al 50 %, se pretende enumerar expresamente valores tales como del 2 % al 40 %, del 10 % al 30 % o del 1 % al 3 %, etc., en la presente memoria descriptiva. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende en concreto.

5 La expresión "que comprende", con respecto a un compuesto peptídico, significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales y/u otros restos químicos en cualquiera o ambos extremos amino- y carboxi-terminales de la secuencia dada. Por supuesto, estos aminoácidos adicionales u otros restos químicos no deben interferir significativamente en la actividad del compuesto. Con respecto a una composición de la presente invención, la expresión "que comprende" significa que una composición puede incluir componentes adicionales. Estos componentes adicionales no deben interferir significativamente en la actividad de la composición.

10 Como se usan en el presente documento, los términos "expresar" y "expresión", y la expresión "que expresa" significan permitir o hacer que se manifieste la información de un gen o secuencia de ADN, por ejemplo, produciendo una proteína mediante la activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción de un gen o de una secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o es expresada por una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. El propio producto de expresión, por ejemplo, la proteína resultante, también puede decirse que está "expresado". Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado.

15 Como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de restos de aminoácidos, variantes estructurales, variantes estructurales de origen natural relacionadas y sus análogos no naturales sintéticos enlazados a través de enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos se pueden preparar, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. El término "proteína" normalmente se refiere a polipéptidos largos. El término "péptido" normalmente se refiere a polipéptidos cortos.

20 Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un polipéptido pretende significar cualquier parte de un polipéptido o de una proteína inferior al producto de expresión del polipéptido o de la proteína de longitud completa.

25 Como se usa en el presente documento, un "análogo" se refiere a un polipéptido modificado esencialmente similar en estructura al polipéptido precursor. El polipéptido modificado puede tener una actividad biológica similar o alterada, o diversos grados de actividad, en comparación con la molécula precursora entera, o con un fragmento de la misma. Por ejemplo, el polipéptido modificado puede tener afinidad de unión similar o alterada (mayor o menor) por un ligando o un receptor del polipéptido precursor. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos basándose en una o más mutaciones. Los análogos de secuencia de aminoácidos de un polipéptido pueden ser análogos de sustitución, inserción, adición o delección. Los análogos de delección, incluyendo los fragmentos de un polipéptido, carecen de uno o más restos de la proteína nativa que no son esenciales para la función ni para la actividad inmunogénica. Los análogos de inserción implican la adición de, por ejemplo, uno o más aminoácidos en un punto no terminal del polipéptido. Este análogo puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente un solo resto. Los análogos de adición, incluyendo los fragmentos de un polipéptido, incluyen la adición de uno o más aminoácidos a cualquiera de ambos extremos terminales de una proteína e incluyen, por ejemplo, las proteínas de fusión. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras basándose en la relación fisicoquímica o funcional del aminoácido que está siendo reemplazado y el aminoácido que lo reemplaza.

30 Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservadora" de un aminoácido es una sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades físicas y químicas similares, por ejemplo, en términos de tamaño, volumen, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad y similares. Los aminoácidos se pueden agrupar por similitudes, por ejemplo, propiedades como hidrófobos, hidrófilos, ácidos, básicos, polares, apolares, aromáticos, alifáticos cortos, alifáticos largos, etc. Los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservadoras incluyen los que tienen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral de amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral hidrófoba, alifática (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral de hidroxilo alifática (serina, treonina). La naturaleza conservadora de una sustitución puede depender de la ubicación del aminoácido dentro de una secuencia de polipéptido.

35 Como se usa en el presente documento, una "variante" se refiere a un polipéptido, una proteína o un análogo de los mismos que se modifica para que comprenda restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Dichos restos pueden modular la solubilidad, la absorción, la semivida biológica de la molécula, etc. Los restos pueden reducir, como alternativa, la toxicidad de la molécula y eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar dichos efectos se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (1980). El procedimiento para acoplar dichos restos a una molécula es bien conocido en la técnica.

40

45

50

55

60

65

Como se usa en el presente documento, un "polinucleótido recombinante" o un "ácido nucleico recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas entre sí de manera natural. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido puede unirse con una secuencia de control reguladora heteróloga u otra secuencia no codificante (por ejemplo, promotor, operador, origen de replicación, sitio de unión a ribosomas, etc.).

5 Dos o más polinucleótidos unidos de dicha manera pueden incluirse juntos en un vector, y el vector se pueden usar para transformar una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". Como alternativa, una célula hospedadora en la que un polinucleótido está presente de manera natural se puede modificar mediante la adición de una secuencia de control reguladora heteróloga que controle la expresión del polinucleótido que se da de forma natural en la célula hospedadora. Dicha célula hospedadora también se conoce como una "célula hospedadora recombinante". El producto de expresión producido por una célula hospedadora recombinante se conoce como "polipéptido recombinante".

Como se usa en el presente documento, "derivado biológicamente activo" o "variante biológicamente activa" incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene esencialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha molécula, tales como propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como una cadena principal peptídica o una unidad polimérica básica.

RECEPTOR DE VITAMINA D RECOMBINANTE

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivados de la vitamina D" se refiere a metabolitos o derivados de colecalciferol y ergocalciferol (denominados colectivamente "Vitamina D"), e incluye, pero sin limitación, los metabolitos de la vitamina D 25-hidroxi-vitamina D₂ y 25-hidroxi-vitamina D₃ (denominados colectivamente "25-hidroxi-vitamina D"); 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₃ (o calcitriol); 24(S)-hidroxi-vitamina D₂; 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₂; y 1 α ,24(S)-dihidroxi-vitamina D₂. Los compuestos 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₃ (o calcitriol) y 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₂ se denominan colectivamente en el presente documento "1,25-hidroxi-vitamina D". La expresión derivados de vitamina D también abarca análogos de vitamina D tales como Paricalcitol, o cualquier molécula de vitamina D modificada tal como variantes, etc., como se describe en el presente documento.

La expresión "receptor de la vitamina D" (VDR) incluye el receptor de la vitamina D de origen natural, recombinante o sintético, así como variantes polimórficas, alelos, mutantes de origen natural y las especies homólogas de los mismos. El VDR es miembro de una superfamilia de receptores de hormonas esteroideas nucleares que regulan la transcripción génica mediante la interacción con los elementos de respuesta en los promotores génicos. El análisis de la estructura y la función de la proteína VDR ha definido distintos dominios implicados en la unión del ADN, la unión al ligando, la dimerización del receptor y la transactivación génica, incluyendo un dominio de función de activación C-terminal (AF-2) que es importante para la interacción con cofactores (Issa, L. L., *et al.*, *Inflamm. Res.*, 47(12): 451-475 (1998)). Como con la mayoría de los receptores nucleares, el VDR experimenta un cambio conformacional tras la unión al ligando; la hélice 12 se pliega por debajo de la hélice 4 (Rochel, N., *et al.*, *Mol. Cell.* 5,173-179) (2000)). La forma activa de la vitamina D (1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₃; 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₂ y 1 α ,24(S)-dihidroxi-vitamina D₂) se une a receptores intracelulares tales como el receptor de la vitamina D, funcionando entonces como factores de transcripción para modular la expresión génica. Al igual que los receptores de otras hormonas esteroideas y hormonas tiroideas, el receptor de la vitamina D tiene dominios de unión a hormonas y dominios de unión al ADN. El receptor de la vitamina D forma un complejo con otro receptor intracelular, el receptor del retinoide X, y ese heterodímero es el que se une al ADN.

En la Figura 2, se muestra una secuencia del VDR humano (SEQ ID NO: 1), de 427 aminoácidos de longitud. Los aminoácidos 118-427 corresponden al dominio de unión a la vitamina D (el dominio de unión al ligando o "LBD de VDR"). Los aminoácidos ~20-112 corresponden al dominio de unión al ADN. La Figura 1A y B muestran un alineamiento del VDR humano y homólogos de otras especies, así como la ubicación aproximada de los dominios de unión al ADN, dominios de unión al ligando y hélices para cada secuencia (Reschly *et al.*, *BMC Evolutionary Biology*, 7:222 (2007)). La hélice 12 corresponde a los aminoácidos ~417-422. La hélice 4 corresponde a los aminoácidos ~256-267.

Un experto habitual en la materia puede determinar, por ejemplo, a partir de la Figura 1A y B, los aminoácidos y las regiones que están altamente conservadas entre las especies (es decir, los aminoácidos son idénticos o una sustitución conservadora con un aminoácido de propiedades similares). La identificación de estas regiones orienta sobre la modificación del VDR para preparar análogos o variantes. Por ejemplo, en general, se espera que las sustituciones conservadoras o las modificaciones fuera de las regiones altamente conservadas no conduzcan a ningún cambio o solo a un pequeño cambio en las propiedades del VDR, por ejemplo, la actividad de unión al derivado de vitamina D, la actividad del factor de transcripción y/o la actividad de unión al receptor retinoide X. Por lo tanto, en la preparación de análogos y variantes que conservan esencialmente las mismas propiedades que el VDR, los expertos habituales en la materia comenzarían por realizar sustituciones conservadoras o no conservadoras en regiones que no están muy conservadas, conservando los mismos aminoácidos o realizando sustituciones conservadoras dentro de regiones altamente conservadas. Del mismo modo, en la preparación de análogos y variantes con propiedades alteradas en comparación con el VDR, los expertos habituales en la materia comenzarían por realizar sustituciones no conservadoras en el/los dominio/s asociado/s con la propiedad que se fuera a modificar.

A modo de ejemplo, Tyr-147, Phe-150, Leu-227, Leu-230, Leu-233, Val-234, Ile-271, Ser-275, Trp-286, Cys-288, Val-300, Leu-309, Leu-313 y Val-418. Val-418, Ser-237, Arg-274, Tyr-143, Ser-278, His-305 e His-397 se podrían modificar para generar nuevas propiedades al VDR.

5 La invención proporciona fragmentos de VDR que comprenden el dominio de unión al ligando (LBD de VDR), o análogos o variantes del mismo, y usos de los mismos en los métodos de detección de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "LBD de VDR modificado" se refiere a fragmentos del LBD de VDR, o análogos o variantes de los mismos que presentan afinidad de unión alterada (superior o inferior) por un derivado de vitamina D con respecto a un derivado de la vitamina D diferente, y a los usos de los mismos en los métodos de
10 detección de la invención. Por ejemplo, normalmente el VDR presenta una mayor afinidad de unión por 1,25-hidroxi-vitamina D que por 25-hidroxi-vitamina D. De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un LBD de VDR modificada que favorece la unión de 25-hidroxi-vitamina D frente al calcitriol. Dicho LBD de VDR modificada (por ejemplo, LBD de VDRm), se puede usar de acuerdo con los métodos de la invención para detectar la presencia de 25-hidroxi-vitamina D. En algunas realizaciones, el LBD de VDR modificada tiene al menos una de entre
15 aproximadamente 10 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o más afinidad de unión por 25-hidroxi-vitamina D que por 1,25-hidroxi-vitamina D. En algunas realizaciones, el LBD de VDR modificada tiene una mayor afinidad de unión por 25-hidroxi-vitamina D₂ que por 1,25-hidroxi-vitamina D₂, mientras que, en otras realizaciones, el LBD de VDR modificada tiene una mayor afinidad de unión por 25-hidroxi-vitamina D₃ que por 1,25-hidroxi-vitamina D₃.

20 El grupo hidroxilo de C1 del calcitriol se coordina en el bolsillo de unión del LBD de VDR mediante la formación de enlaces de hidrógeno con Ser-237 y Arg-274. Presumiblemente, esto estabiliza la unión del calcitriol frente a la de la 25-hidroxi-vitamina D. Se sabe que una mutación natural en Arg-274 (Arg274Leu) da lugar a raquitismo resistente a la vitamina D. La afinidad de unión de un VDR con esta mutación en particular es aproximadamente 1.000 veces inferior a la del VDR de tipo silvestre (Kristjansson, K., Rut, A. R., Hewison, M., O'Riordan J. L. y Hughes, M. R. "Two mutations in the hormone binding domain of the vitamin D receptor cause tissue resistance to 1,25 dihydroxy vitamin D3" (1993) *J. Clin. Invest.*, 92, 12-16. Dado que la cadena lateral hidrófoba voluminosa de leucina situada en la Arg274Leu interferiría con el posicionamiento del grupo hidroxilo de C1, dicha mutación favorecerá la unión de la 25-hidroxi-vitamina D. Se han introducido mutaciones en Ser-237, incluyendo un Ser237Ala mutante que muestra una
25 unión aproximadamente 27 veces más débil hacia la 1,25-hidroxi-vitamina D₃, debido a la pérdida de un enlace de hidrógeno estabilizador (Yamada, S, Yamamoto, K., Masuno, H. y Choi, M. "Three-dimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model". (2001) *Steroids* 66, 177-187). Se puede prever que la mutación de Ser-237 a una cadena lateral hidrófoba más voluminosa producirá tanto una pérdida de un enlace de hidrógeno estabilizador como el aumento de conflictos estéricos con el grupo 1-hidroxilo, favoreciendo de este modo la unión de 25-hidroxi-vitamina D frente a la de la 1-25-dihidroxi-vitamina D. Además, se pueden construir LBD de VDR sintéticos que modifiquen uno o ambos de Ser-237 y Arg-274 con varios grupos de cadena lateral de aminoácidos que interferirán con la unión del calcitriol, pero que favorecerán la de la 25-hidroxi-vitamina D. Los ejemplos de dichas mutaciones incluyen, pero sin limitación, Ser237Val, Ser237Ile, Ser237Leu, Ser237Ala, Arg274Leu, Arg274Val y Arg274Ile. Se puede contemplar una serie de construcciones de LBD de VDR que pueden
35 favorecer la unión de la 25-dihidroxi-vitamina D frente a la del calcitriol y, por lo tanto, que se podrían usar en la construcción basada en FRET para el análisis de la presencia de 25-dihidroxi-vitamina D.

40 Los LBD de VDR modificados proporcionados por la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, polipéptidos que comprenden los dominios de unión al ligando descritos anteriormente en el presente documento, o análogos o variantes de los mismos, polipéptidos codificados por un ácido nucleico descrito en el presente documento y/o polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos superior al aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % o superior en una región de al menos 300, aproximadamente 400 o más aminoácidos del dominio de unión al ligando de la proteína nativa, incluyendo sus sustituciones conservadoras o no conservadoras. En algunas realizaciones, un LBD de VDR modificado comprende una secuencia de aminoácidos que está unida específicamente por un anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, generado contra cualquiera de los dominios de unión al ligando descritos en el presente documento. Dicho LBD de VDR modificado conservará la afinidad de unión por el derivado de vitamina D mostrado por SEQ ID NO: 1, o un homólogo de especie del mismo. Como alternativa, dicho LBD de VDR modificado presentará una afinidad de unión alterada por los derivados de vitamina D descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, una afinidad de unión relativamente más alta por 25-hidroxi-vitamina D que por 1,25-hidroxi-vitamina D. En algunas realizaciones, dicho LBD de VDR modificado con afinidad de unión relativamente más alta por 25-hidroxi-vitamina D puede comprender una mutación de aminoácido (inserción, deleción o sustitución) en una cualquiera o más de la posición 237, 274, etc. de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la mutación de la posición 274 comprende una sustitución de un resto de aminoácido básico con un resto de aminoácido alifático. En algunas realizaciones, la mutación es una sustitución de Arg274Leu. En algunas realizaciones, el LBD de VDR modificado eliminará ciertas secuencias de aminoácidos que incluyen secuencias que se consideran estructuralmente variables, por ejemplo, los aminoácidos 165-215 se pueden eliminar para producir un dominio de unión al ligando que consista en los aminoácidos 118 a 164 seguidos directamente por los aminoácidos 216 a 427.

Los polinucleótidos que codifican un LBD de VDR modificado de la invención incluyen, sin limitación, los que (1) se hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en el presente documento y sus variantes modificadas de manera conservadora; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene identidad de secuencia de nucleótidos superior al aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o superior en una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000 o más nucleótidos (hasta la secuencia de longitud completa de 1.281 nucleótidos de la proteína madura) con una secuencia de ácido nucleico de referencia como la descrita en el presente documento.

Los polinucleótidos que codifican fragmentos, variantes y análogos pueden ser generados fácilmente por un experto para codificar fragmentos, variantes o análogos biológicamente activos de la molécula de origen natural que posean la misma o similar actividad biológica de la molécula de origen natural. Estos polinucleótidos se pueden preparar usando técnicas de PCR, digestión/ligación de molécula codificante de ADN y similares. Por lo tanto, un experto en la materia será capaz de generar cambios de una sola base en la cadena de ADN para dar lugar a un codón alterado y una mutación de sentido erróneo, usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis específica del sitio. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" significa, por ejemplo, hibridación a 42 °C en formamida al 50 % y lavado a 60 °C en 0,1 x SSC, SDS al 0,1 %. Los expertos en la materia entienden que la variación en estas condiciones se produce basándose en la longitud y el contenido de bases de nucleótidos GC de las secuencias que se van a hibridar. Las fórmulas convencionales en la técnica son apropiadas para determinar las condiciones de hibridación exactas. Véase Sambrook *et al.*, 9.47-9.51 en "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

Los análogos pueden ser esencialmente homólogos o esencialmente idénticos al VDR recombinante o al LBD de VDR de los que se obtienen.

Los análogos por sustitución normalmente intercambian un aminoácido del tipo silvestre por otro de uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido sin la pérdida de otras funciones o propiedades. En un aspecto, las sustituciones son sustituciones conservadoras. Se contempla además que un polipéptido de la invención puede ser una proteína de fusión con un segundo agente que sea un polipéptido. En una realización, el segundo agente que es un polipéptido, sin limitación, es un fluoróforo útil en la FRET, una enzima, un factor de crecimiento, un anticuerpo, una citoquina, una quimiocina, un receptor de superficie celular, el dominio extracelular de un receptor de la superficie celular, una molécula de adhesión celular, un marcador de purificación, una proteína de unión al ligando, o un fragmento o dominio activo de una proteína descrita anteriormente. Los dos polipéptidos que comprenden la proteína de fusión pueden estar separados por un tercer segmento de polipéptido conocido como enlazador, que puede consistir en cualquier número de aminoácidos superior o igual a uno. La proteína de fusión contemplada se crea mediante técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la técnica.

CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE VITAMINA D

El receptor de la vitamina D recombinante de la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica. Por lo tanto, en la técnica, se conocen métodos para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, a través de la transcripción inversa del ARN y/o amplificación del ADN; (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariontas o eucariotas por transfección, por ejemplo, a través de electroporación, transformación o microinyección; (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo, de manera continua o de manera discontinua; (iv) la expresión del receptor de vitamina D recombinante, por ejemplo, constitutivamente o tras la inducción; y (v) el aislamiento de dicho receptor de vitamina D recombinante, por ejemplo, del medio de cultivo o mediante la recogida de las células transformadas para (vi) obtener receptor de vitamina D recombinante purificado, por ejemplo, a través de cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. Se puede fabricar un receptor de vitamina D recombinante en células hospedadoras transformadas usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de codificación del polipéptido se podrían escindir del ADN usando enzimas de restricción adecuadas.

Como alternativa, la molécula de ADN se podría sintetizar usando técnicas de síntesis química tales como el método de fosforamidato. Además, se podría usar una combinación de estas técnicas. Los polipéptidos de la invención se pueden fabricar mediante métodos sintéticos. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de síntesis en fase sólida. Las técnicas adecuadas son bien conocidas en la materia, e incluyen las descritas en Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, pág. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis *et al.* (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart y Young (1969), "Solid Phase Peptide Synthesis"; patente de EE.UU. n.º 3.941.763; Finn *et al.* (1976), "The Proteins" (3ª ed.) 2: 105-253; y Erickson *et al.* (1976), "The Proteins" (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida de la fabricación de péptidos individuales, ya que es el método más rentable de fabricación de péptidos pequeños.

Los métodos de preparación de fragmentos de polipéptidos, variantes o análogos son bien conocidos en la técnica.

Los fragmentos de un polipéptido se preparan usando, sin limitación, escisión enzimática (por ejemplo, tripsina, quimotripsina) y también usando medios recombinantes para generar fragmentos de polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos específica. Se pueden generar fragmentos de polipéptido que comprendan una región de la proteína que tenga una determinada actividad, tal como un dominio de unión al ligando o cualquier otro dominio VDR identificable conocido en la materia.

También se conocen métodos de fabricación de análogos de polipéptidos. La invención también proporciona vectores que codifican los polipéptidos de la invención en un hospedador apropiado. El vector comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido unido operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas. Se conocen bien los métodos para efectuar dicha unión operativa, bien antes o después de la inserción del polinucleótido en el vector. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión a ribosomas, señales de inicio, señales de parada, señales de protección con capuchón, señales de poliadenilación y otras señales que intervienen en el control de la transcripción o de la traducción. El vector resultante que tiene el polinucleótido en el mismo se usa para transformar un hospedador apropiado. Esta transformación se puede realizar usando métodos bien conocidos en la técnica.

En otros aspectos más, se usa una amplia variedad de vectores para la preparación del VDR o del LBD del VDR, y se seleccionan entre vectores de expresión eucariotas y procariotas. Los ejemplos de vectores para la expresión procariota incluyen plásmidos tales como, y sin limitación, pRSET, pET y pBAD, en los que los promotores usados en vectores de expresión procariotas incluyen uno o más de, y sin limitación, lac, trc, trp, recA o araBAD. Los ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para la expresión en levadura, vectores tales como, y sin limitación, pAO, pPIC, pYES o pMET, usando promotores tales como, y sin limitación, AOX1, GAP, GAL1 o AUG1; (ii) para la expresión en células de insectos, vectores tales como, y sin limitación, pMT, pAc5, pIB, pMIB o pBAC, usando promotores tales como, y sin limitación, PH, p10, MT, Ac5, OplE2, gp64 o polh, e (iii) para la expresión en células de mamíferos, vectores tales como, y sin limitación pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 o pBPV, y vectores derivados de, en un aspecto, sistemas virales tales como, y sin limitación, virus vaccinia, virus adeno-asociados, virus del herpes o retrovirus, usando promotores tales como, y sin limitación, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

Se puede usar cualquiera de un gran número de células hospedadoras disponibles y bien conocidas en la práctica de la presente invención. La selección de un determinado hospedador depende de una serie de factores reconocidos por la técnica, incluyendo, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la tasa de transformación, la facilidad de recuperación de los péptidos, características de expresión, la bioseguridad y los costes. Se ha de alcanzar un equilibrio entre estos factores, entendiendo que no todas las células hospedadoras son igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN en particular. Dentro de estas directrices generales, las células hospedadoras microbianas útiles incluyen células de bacterias, de levaduras y de otros hongos, de insectos, de plantas y de mamíferos (incluyendo seres humanos) en cultivo, u otros hospedadores conocidos en la técnica. Los ejemplos de células eucariotas son células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2.

A continuación, el hospedador transformado se cultiva y se purifica. Las células hospedadoras pueden cultivarse en condiciones de fermentación convencionales de forma que se expresen los compuestos deseados. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Por último, los polipéptidos se aíslan y, opcionalmente, se purifican a partir del cultivo, o bien de medios de cultivo o de las células hospedadoras, mediante métodos bien conocidos en la técnica.

MÉTODOS DE DETECCIÓN

Los métodos de la invención monitorizan los cambios conformacionales inducidos por la unión del derivado de vitamina D al VDR, polipéptido que comprende un LBD de VDR modificado. La unión del derivado de vitamina D produce cambios conformacionales detectables que corresponden cuantitativamente a la cantidad de derivado de vitamina D presente en una muestra. Se puede analizar una variedad de muestras de acuerdo con los métodos de la presente invención, incluyendo muestras analíticas, producto de fármaco a granel, producto farmacéutico terminado o relleno, o muestras de pacientes y animales, tales como sangre, plasma, suero, orina, saliva y tejido.

Hay numerosos métodos disponibles para monitorizar los cambios conformacionales inducidos por las interacciones proteína-proteína (por ejemplo, unión de ligando-receptor) ("Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications". (2005) *Methods in Molecular Biology*, Vol 305. G. Ulrich Nienhaus, Editor); véase también ("Protein-Protein Interactions: Methods and Applications". (2004) *Methods in Molecular Biology*, Vol 261. Haiyan Fu, Editor)). Estas técnicas se pueden adaptar a los métodos de la presente invención. Un ejemplo de una técnica adecuada es la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia o FRET, que detecta la transferencia no radiante de la energía fotónica de un fluoróforo excitado (el donante) a otro fluoróforo (el aceptor) cuando ambos se encuentran muy cerca (por ejemplo, 1-10 nm). Así pues, la FRET es capaz de resolver la proximidad relativa de un par de moléculas más allá del límite óptico de un microscopio óptico. La aplicación convencional de la tecnología FRET ha sido la de monitorizar las interacciones moleculares entre dos proteínas, por ejemplo, cuando cada miembro de un par proteína-proteína se marca con los fluoróforos donante y aceptor correspondientes. En algunas circunstancias,

es posible monitorizar los cambios estructurales producidos dentro de una sola molécula marcada con dos fluoróforos. (De, S., Macara, I. G. y Lannigan, D. A. "Novel biosensors for the detection of estrogen receptor ligands". (2005) *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 96, 235-244).

5 En la generación de imágenes de FRET, normalmente, el espectro de emisión del donante se solapa con el espectro de absorción del aceptor, de manera que la transferencia de energía se produce cuando las moléculas de donante y aceptor están en estrecha proximidad (normalmente a 10-100 Å, que es 1-10 nm). A modo comparativo, el diámetro de un ADN de doble hélice es de 2,3 nm, un filamento de F-actina de ~6 nm, un filamento intermedio de ~10 nm y un microtúbulo de 25 nm). La transferencia de energía óptima se produce cuando las orientaciones de los dipolos de transición del donante y del aceptor son aproximadamente paralelas. La generación de imágenes de FRET se puede realizar con una serie de técnicas de microscopía conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, microscopía de fluorescencia de campo ancho o microscopía confocal.

15 Por lo tanto, el VDR o el polipéptido que comprende un LBD de VDR modificado, comprende opcionalmente al menos dos, tres o más fluoróforos, preferentemente, un par donante-aceptor de fluoróforos, seleccionados de manera que el polipéptido presente un aumento o una reducción de la fluorescencia en presencia del derivado de vitamina D en comparación con la cantidad de fluorescencia en ausencia del derivado de vitamina D.

20 Como se usa en el presente documento, "fluoróforo" significa un compuesto que comprende un grupo funcional que absorberá la energía de una longitud de onda específica y volverá a emitir la energía en una longitud de onda diferente (pero igualmente específica). Las propiedades de los fluoróforos dependen de los espectros de absorción y de emisión del compuesto, de la eficacia cuántica (la proporción entre la energía absorbida y la energía emitida) y del ambiente químico del fluoróforo.

25 Como se usa en el presente documento, un "par donante-aceptor de fluoróforos" es un conjunto de al menos dos fluoróforos (donante y aceptor) seleccionados para que sean capaces de producir la transferencia de energía detectable cuando se aproximan entre sí, por ejemplo, 1-10 nm.

30 Los fluoróforos incluyen proteínas fluorescentes (FP) como la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequoria victoria*, la proteína roja fluorescente (RFP), análogos, variantes y homólogos de las mismas. Se pueden fusionar genéticamente a las proteínas de interés y expresarse en células, lo que les convierte en un excelente sistema indicador de la expresión génica y la localización de proteínas en las células vivas. Hay disponibles varias variantes de FP mejoradas con diferentes propiedades espectrales y bioquímicas. Las FP que emiten en la región azul verdoso se pueden emparejar de manera óptima para la FRET con FP que emitan en la región amarilla, ya que el espectro de emisión de las CFP se solapa parcialmente con el espectro de excitación de las YFP. Cuando la CFP se excita a aproximadamente 430 nm, la YFP emite a 545 nm si las dos proteínas se encuentran cerca. Cuando se separan estos fluoróforos, se produce una caída medible y correspondiente de la FRET. Las proteínas fluorescentes incluyen, pero sin limitación Y66H, Y66F, EBFP, EBFP2, SYFP2, SCFP3A, Azurite, GFPuv, T-Sapphire, Cerulean, mCFP, ECFP, CyPet, Y66W, Rojo mKeima, TagCFP, AmCyan1, mTFP1, S65A, azul verdoso Midoriishi, GFP de tipo silvestre, S65C, TurboGFP, TagGFP, S65L, Emerald, S65T, EGFP, Verde Azami, ZsGreen1, TagYFP, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TurboYFP, ZsYellow1, naranja Kusabira, mOrange, mKO, TurboRFP, tdTomato, TagRFP, monómero de DsRed, DsRed2 ("RFP"), mStrawberry, TurboFP602, AsRed2, mRFP1, J-Red, mCherry, HcRed1, Katusha, mKate (TagFP635), TurboFP635, mPlum y/o mRaspberry (Shaner, N. C., Patterson, G. H. y Davidson, M. W. "Advances in fluorescent protein technology" (2007) *J. Cell. Sci.* 120, 4247-4260)).

45 Otros fluoróforos incluyen, pero sin limitación, hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, Azul Cascade, Azul Pacific, Naranja Pacific, Amarillo Lucifer, NBD, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, Rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, Rojo Texas, alofocianina (APC), conjugados APC-Cy7, colorantes Alexa Fluor, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, Alexa Fluor 790, Colorantes Cy (GE Healthcare), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, sondas de ácido nucleico, Hoechst 33342, DAPI, Hoechst 33258, Azul SYTOX, Cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, bromuro de etidio, naranja de acridina, Verde SYTOX, TOTO-1, TO-PRO-1, Naranja de tiazol, yoduro de propidio (PI), LDS 751, 7-AAD, Naranja SYTOX, TOTO-3, A-PRO-3, DRAQ5, Indo-1, Fluo-3, DCFH, DHR, SNARF, monoclorobimano, calceína, reactivos de fluorescencia resueltos en el tiempo incluyendo quelatos de lantánido (Sm, Eu, Tb, Dy) y criptatos tales como criptato de europio, Lumi4-Tb, XL665, d2.

60 En algunas realizaciones, el par donante-aceptor de los fluoróforos es SCFP3A y SYFP2

En algunas realizaciones de la invención, los métodos son capaces de detectar concentraciones de derivado de vitamina D que varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ng/ml, de 0,1 a aproximadamente 1.000 ng/ml, de 0,5 a aproximadamente 100 ng/ml, de 1 a aproximadamente 50 ng/ml, de 25 a aproximadamente 75 ng/ml, o intervalos más amplios. La concentración fisiológica de 25-hidroxi-vitamina D es de aproximadamente 25,0 a 80,0 nanogramos por mililitro (ng/ml), y la de 1,25-dihidroxi-vitamina D es de aproximadamente 22,0 a 67,0 picogramos por mililitro (pg/ml).

Se entiende que cualquier valor numérico indicado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior, es decir, todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados se consideran indicadas expresamente en la presente solicitud. Por ejemplo, si se indica un intervalo de concentraciones o un intervalo de efectos beneficiosos tal como de 1 a 50, se pretende que los valores tales como de 2 a 40, de 10 a 30 o de 1 a 3, etc., estén expresamente enumerados en la presente memoria descriptiva. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende en concreto.

Las composiciones, los métodos y los kits de la invención son útiles para la evaluación de muestras de fluidos corporales o de tejidos corporales, por ejemplo, muestras de sangre, plasma, suero, CSF, orina o tejido, de cualquier sujeto. Los sujetos adecuados incluyen sujetos sanos, sujetos que necesitan la administración de suplementos de vitamina D, sujetos en riesgo de insuficiencia o deficiencia de vitamina D o de derivados de vitamina D, sujetos que padecen insuficiencia o deficiencia de vitamina D o de derivados de vitamina D, sujetos que están siendo tratados con vitamina D o derivados de vitamina D, y sujetos con enfermedades sensibles a la vitamina D.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención se aplican para detectar derivado de vitamina D en muestras de pacientes que necesitan la administración de suplementos de vitamina D, incluyendo, pero sin limitación, sujetos sanos y sujetos con riesgo de insuficiencia o deficiencia de vitamina D, por ejemplo, sujetos con enfermedad renal crónica (ERC) en fase 1, 2, 3, 4 o 5; sujetos con osteodistrofia renal (incluyendo osteomalacia y osteítis fibrosa quística); bebés, niños y adultos que no beben leche enriquecida con vitamina D (por ejemplo, los sujetos intolerantes a la lactosa, los sujetos con alergia a la leche, los vegetarianos que no consumen leche y los bebés alimentados con leche materna); sujetos con raquitismo; sujetos de piel oscura (por ejemplo, en EE.UU., el 42 % de las mujeres afroamericanas de entre 15 y 49 años de edad resultaron tener deficiencia de vitamina D frente al 4 % de las mujeres blancas); ancianos (que tienen una capacidad reducida para sintetizar la vitamina D en la piel durante la exposición a la luz solar y también son más propensos a no salir al exterior); adultos ingresados en centros (que son propensos a no salir al exterior, incluyendo los sujetos con enfermedad de Alzheimer o enfermedades mentales); sujetos que cubren toda la piel expuesta (por ejemplo, miembros de ciertas religiones o culturas); sujetos que siempre usan protector solar (por ejemplo, la aplicación de protector solar con un factor de protección solar (SPF) de 8 reduce la producción de vitamina D en un 95 %, y los FPS más altos pueden reducir aún más la producción cutánea de vitamina D); sujetos con síndromes de mala absorción de grasas (incluyendo, pero sin limitación, fibrosis quística, enfermedad hepática colestásica, otras enfermedades hepáticas, enfermedad de la vesícula, deficiencia de enzima pancreática, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad esprue o celíaca, o en la extirpación quirúrgica de parte o la totalidad de la estómago y/o de los intestinos); sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal; sujetos con enfermedad de Crohn; sujetos que han tenido resecciones del intestino delgado; sujetos con enfermedad de las encías; sujetos que toman medicamentos que aumentan el catabolismo de la vitamina D, incluyendo fenitoína, fosfenitoína, fenobarbital, carbamazepina y rifampicina; sujetos que toman medicamentos que reducen la absorción de la vitamina D, incluyendo colestiramina, colestipol, orlistat, aceite mineral y sustitutos de la grasa; sujetos que toman medicamentos que inhiben la activación de la vitamina D, incluyendo ketoconazol; sujetos que toman medicamentos que disminuyen la absorción del calcio, incluyendo los corticosteroides; sujetos con obesidad (la vitamina D depositada en depósitos de grasa corporal es menos biodisponible); sujetos con osteoporosis y/o mujeres posmenopáusicas.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención se aplican para detectar derivado de vitamina D en muestras de pacientes con enfermedades sensibles a la vitamina D, es decir, enfermedades en las que la vitamina D, 25(OH)D o la vitamina D activa (por ejemplo, 1,25(OH)₂D) impide la aparición o la progresión de la enfermedad, o reduce los signos o síntomas de la enfermedad. Dichas enfermedades sensibles a la vitamina D incluyen el cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, de pulmón, de piel, melanoma, de colon, colorrectal, rectal, de próstata y de hueso). Se ha observado que 1,25(OH)₂D induce la diferenciación celular y/o inhibe la proliferación celular *in vitro* para una serie de células. Las enfermedades sensibles a la vitamina D también incluyen enfermedades autoinmunes, por ejemplo, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, polimiositis, dermatomiositis, esclerodermia, fibrosis, enfermedad de Grave, enfermedad de Hashimoto, rechazo agudo o crónico de trasplante, enfermedad aguda o crónica del injerto contra el hospedador, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, eczema y psoriasis, dermatitis, incluyendo la dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis alérgica y/o dermatitis crónica. Las enfermedades sensibles a la vitamina D también incluyen otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad renal poliquística (PKD), síndrome del ovario poliquístico, pancreatitis, nefritis, hepatitis y/o infección. También se ha informado que las enfermedades sensibles a la vitamina D incluyen hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, los métodos de la invención incluyen muestras de ensayo de sujetos en riesgo de padecer o que padecen enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, sujetos con aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia cerebral, apoplejía, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, obesidad o otros trastornos del peso, trastornos lipídicos (por ejemplo, hiperlipidemia, dislipidemia incluyendo dislipidemia diabética asociada e hipoalfalipoproteinemia de dislipidemia mixta, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, y bajo HDL (lipoproteína de alta densidad)), trastornos metabólicos (por ejemplo, síndrome metabólico, diabetes mellitus de tipo II, diabetes mellitus de tipo I, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, complicaciones diabéticas incluyendo neuropatía, nefropatía, retinopatía, úlcera del pie diabético y cataratas) y/o trombosis.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 EJEMPLO 1

BIOSENSOR DE VITAMINA D

10 Se usa una construcción de LBD de VDR (LBD de VDRm) (Figura 5 y Figura 6) para montar un ensayo basado en la FRET destinado a medir los niveles de 25-hidroxi-vitamina D. Las construcciones génicas correspondientes al LBD de VDRm se generarán de modo que se enlacen la CFP y la YFP en cada extremo. Las consiguientes construcciones de CFP-LBD de VDRm-YFP o YFP-LBD de VDR-CFP (Figura 6) se pueden clonar en vectores de expresión apropiados para su producción en células vegetales, de levadura, de bacterias, de insectos, de mamíferos u otras células útiles para expresar dicha construcción. Las proteínas CFP-LBD de VDRm-YFP o YFP-LBD de VDRm-CFP se pueden purificar o purificar parcialmente a partir de extractos de células que expresen las construcciones y usarse para el desarrollo del ensayo.

20 Como se ha descrito en el presente documento, se puede construir un LBD de VDRm que modifique una o ambas de Ser-237 y Arg-274 con varios grupos de cadena lateral de aminoácidos que interferirán en la unión al calcitriol, pero favorecerán la de la 25-hidroxi-vitamina D. Cabe contemplar una serie de construcciones de LBD de VDRm que pueden favorecer la unión de la 25-dihidroxi-vitamina D frente a la del calcitriol y, por lo tanto, que se podrían usar en la construcción basada en la FRET para el análisis de la presencia de 25-dihidroxi-vitamina D.

25 En otras realizaciones, se contemplan las mutaciones en los siguientes aminoácidos: Tyr-147, Phe-150, Leu-227, Leu-230, Leu-233, Val-234, Ile-271, Ser-275, Trp-286, Cys-288, Val-300, Leu-309, Leu-313, Val-418, Ser-237, Arg-274, Tyr-143, Ser-278, His-305 e His-397.

30 La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos del VDR humano y la ubicación de Ser-237 y Arg-274 (en negrita) indicada por la flecha. En mayúsculas están los aminoácidos del dominio de unión al ligando (LBD). La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína amarilla fluorescente (SYFP2) (nº de acceso AAZ65845) y la Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína azul verdosa fluorescente (SCFP3A) (nº de acceso AAZ65848). La Figura 5 muestra una posible construcción de acuerdo con la invención: en negrita; SYFP2, negrita + cursiva; SCFP3A, cursiva; enlazador opcional, y en el centro, LBD de VDR (normal) con posibles mutaciones (subrayadas).

35 La anterior descripción se da meramente para facilitar la comprensión, y no se han de entender limitaciones innecesarias de la misma, pues las modificaciones dentro del alcance de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la materia.

40 A lo largo de la memoria descriptiva, cuando se describen composiciones que incluyen componentes o materiales, se contempla que las composiciones también pueden consistir esencialmente o consistir en cualquier combinación de los componentes o materiales citados, a menos que se describa lo contrario.

45 La práctica de un método desvelado en el presente documento, y las etapas individuales del mismo, se pueden realizar manualmente y/o con ayuda de equipos electrónicos. Aunque los procesos se han descrito con referencia a realizaciones particulares, el experto habitual en la materia apreciará fácilmente que se pueden usar otros modos de realización de las acciones asociadas con los métodos. Por ejemplo, se puede cambiar el orden de las diversas etapas sin apartarse del alcance del método, a menos que se describa lo contrario. Además, algunas de las etapas individuales pueden combinarse, omitirse o subdividirse en etapas adicionales.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cytochroma Inc. Petkovich, et al.

55 <120> Métodos y composiciones de medición de la cantidad de derivados de vitamina

<130> 31138/44172A

<150> US-61/175.919

60 <151> 06-05-2009

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

ES 2 587 795 T3

<211> 427
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe
 1 5 10 15

Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr
 20 25 30

Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe
 35 40 45

Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly
 50 55 60

Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg
 65 70 75 80

Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr
 85 90 95

Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu
 100 105 110

Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln
 115 120 125

Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp
 130 135 140

Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn
 145 150 155 160

Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro

ES 2 587 795 T3

				165						170					175
Ser	Phe	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Asp	His	Cys	Ile	Thr
			180					185					190		
Ser	Ser	Asp	Met	Met	Asp	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser	Asn	Leu	Asp	Leu	Ser
		195					200					205			
Glu	Glu	Asp	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu
	210					215					220				
Ser	Met	Leu	Pro	His	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Ser	Tyr	Ser	Ile	Gln	Lys
225					230					235					240
Val	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Met	Ile	Pro	Gly	Phe	Arg	Asp	Leu	Thr	Ser
				245					250					255	
Glu	Asp	Gln	Ile	Val	Leu	Leu	Lys	Ser	Ser	Ala	Ile	Glu	Val	Ile	Met
			260					265					270		
Leu	Arg	Ser	Asn	Glu	Ser	Phe	Thr	Met	Asp	Asp	Met	Ser	Trp	Thr	Cys
		275					280					285			
Gly	Asn	Gln	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Arg	Val	Ser	Asp	Val	Thr	Lys	Ala	Gly
	290					295					300				
His	Ser	Leu	Glu	Leu	Ile	Glu	Pro	Leu	Ile	Lys	Phe	Gln	Val	Gly	Leu
305					310					315					320
Lys	Lys	Leu	Asn	Leu	His	Glu	Glu	Glu	His	Val	Leu	Leu	Met	Ala	Ile
				325					330					335	
Cys	Ile	Val	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Gly	Val	Gln	Asp	Ala	Ala	Leu	Ile
			340					345					350		
Glu	Ala	Ile	Gln	Asp	Arg	Leu	Ser	Asn	Thr	Leu	Gln	Thr	Tyr	Ile	Arg
		355					360					365			
Cys	Arg	His	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	His	Leu	Leu	Tyr	Ala	Lys	Met	Ile
	370					375					380				
Gln	Lys	Leu	Ala	Asp	Leu	Arg	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	His	Ser	Lys	Gln
385					390					395					400
Tyr	Arg	Cys	Leu	Ser	Phe	Gln	Pro	Glu	Cys	Ser	Met	Lys	Leu	Thr	Pro
				405					410					415	
Leu	Val	Leu	Glu	Val	Phe	Gly	Asn	Glu	Ile	Ser					
			420					425							

<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 2

ES 2 587 795 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 3
 <211> 239
 <212> PRT

ES 2 587 795 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Ile Ser Asp Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

10

ES 2 587 795 T3

<210> 4
 <211> 740
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

```

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1          5          10          15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20          25          30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys
35          40          45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
50          55          60

Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
65          70          75          80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
85          90          95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100         105         110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
115         120         125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130         135         140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145         150         155         160

Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val
165         170         175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180         185         190
    
```

ES 2 587 795 T3

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu Ser
 195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Asp Ser
 225 230 235 240

Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu
 245 250 255

Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys
 260 265 270

Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr
 275 280 285

Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val
 290 295 300

Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly
 305 310 315 320

Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser
 325 330 335

Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp
 340 345 350

Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser
 355 360 365

Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile
 370 375 380

Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His
 385 390 395 400

Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val
 405 410 415

Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr
 420 425 430

Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu
 435 440 445

ES 2 587 795 T3

Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn
 450 455 460

Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys
 465 470 475 480

Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile
 485 490 495

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
 500 505 510

Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 515 520 525

Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 530 535 540

Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr
 565 570 575

Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 580 585 590

Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 595 600 605

Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 610 615 620

Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 625 630 635 640

His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser Asp Asn Val Tyr Ile Thr Ala
 645 650 655

Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
 660 665 670

Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
 675 680 685

Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
 690 695 700

ES 2 587 795 T3

Thr Gln Ser Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
705 710 715 720

Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp
725 730 735

Glu Leu Tyr Lys
740

5
<210> 5
<211> 69
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Gln Ile Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala Thr Gly Tyr His Phe Asn
1 5 10 15

Val Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ala Met Lys
20 25 30

Arg Asn Ala Arg Leu Arg Cys Pro Phe Arg Lys Gly Ala Cys Glu Ile
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Arg Arg Gln Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys
50 55 60

10
Leu Glu Ser Gly Met
65

15
<210> 6
<211> 68
<212> PRT
<213> *Gallus gallus*

<400> 6

ES 2 587 795 T3

Lys Val Cys Ala Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr Gly Tyr His Phe His
 1 5 10 15

Val Met Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile Leu
 20 25 30

Lys Gly Val His Phe Thr Cys Pro Phe Thr Arg Ser Cys Pro Ile Thr
 35 40 45

Lys Ala Lys Arg Arg Gln Cys Gln Ala Cys Arg Leu Gln Lys Cys Leu
 50 55 60

Asp Val Gly Met
 65

5
 <210> 7
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Fugu rubripes*
 <400> 7

Arg Ala Cys Gly Val Cys Gly Asp Gln Ala Lys Gly Tyr His Phe Asn
 1 5 10 15

Ala Trp Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ala Ile Lys
 20 25 30

Arg Thr Pro Pro Leu Pro Cys Gln Phe Leu Asn Lys Cys Ser Ile Thr
 35 40 45

Lys Lys Asn Arg Arg Gln Cys Gln Asp Cys Arg Leu Arg Lys Cys Gln
 50 55 60

Ala Ile Gly Met
 65

10
 15
 <210> 8
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

ES 2 587 795 T3

Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr Gly Phe His Phe Asn
 1 5 10 15

Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Met Lys
 20 25 30

Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly Asp Cys Arg Ile Thr
 35 40 45

Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg Leu Lys Arg Cys Val
 50 55 60

Asp Ile Gly Met
 65

5
 <210> 9
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 9

Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr Gly Phe His Phe Asn
 1 5 10 15

Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Met Lys
 20 25 30

Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly Asp Cys Arg Ile Thr
 35 40 45

Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg Leu Lys Arg Cys Val
 50 55 60

Asp Ile Gly Met
 65

10
 15
 <210> 10
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*
 <400> 10

ES 2 587 795 T3

Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Lys Ala Thr Gly Phe His Phe Asn
1 5 10 15

Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Met Lys
20 25 30

Arg Lys Ala Met Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly Asp Cys Arg Ile Thr
35 40 45

Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ser Cys Arg Leu Lys Arg Cys Val
50 55 60

Asp Ile Gly Met
65

5
<210> 11
<211> 68
<212> PRT
<213> *Danio rerio*

<400> 11

Pro Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Lys Ala Thr Gly Phe His Phe Asn
1 5 10 15

Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Met Lys
20 25 30

Arg Lys Ala Ser Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly Asn Cys Thr Ile Thr
35 40 45

Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg Leu Lys Arg Cys Ile
50 55 60

Asp Ile Gly Met
65

10

15
<210> 12
<211> 68
<212> PRT
<213> *Petromyzon marinus*

<400> 12

ES 2 587 795 T3

Lys Val Cys Gly Val Cys Gly Asp Lys Ala Thr Gly Tyr His Phe Asn
 1 5 10 15

Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Met Lys
 20 25 30

Arg Ser Ala Ser Phe Thr Cys Pro Phe Glu Gly Lys Cys Asn Ile Thr
 35 40 45

Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg Leu Lys Arg Cys Arg
 50 55 60

Asp Ile Gly Met
 65

- <210> 13
- <211> 56
- <212> PRT
- <213> *Ciona intestinalis*
- <400> 13

Met His Phe Gly Ala Ile Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg
 1 5 10 15

Arg Ser Val Lys Lys Asn Ala Ser Phe Ser Cys Ala Phe Glu Lys Lys
 20 25 30

Cys Glu Ile Asn Lys Asn Asn Arg Lys His Cys Gln Ala Cys Arg Phe
 35 40 45

Asn Ala Cys Leu Ala Ala Gly Met
 50 55

- <210> 14
- <211> 68
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 14

Arg Asn Cys Val Val Cys Gly Asp Gln Ala Thr Gly Tyr His Phe Asn
 1 5 10 15

ES 2 587 795 T3

Ala Leu Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Thr Val Ser
 20 25 30

Lys Ser Ile Gly Pro Thr Cys Pro Phe Ala Gly Ser Cys Glu Val Ser
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg His Cys Pro Ala Cys Arg Leu Gln Lys Cys Leu
 50 55 60

Asp Ala Gly Met
 65

<210> 15
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

Gln Gly Leu Thr Glu Glu Gln Arg Met Met Ile Arg Glu Leu Met Asp
 1 5 10 15

Ala Gln Met Lys Thr Phe Asp Thr Thr Phe Ser His Phe Lys Asn Phe
 20 25 30

Arg Leu Pro Gly Val Leu Ser Ser Gly Cys Glu Leu Pro Glu Ser Leu
 35 40 45

Gln Ala Pro Ser Arg Glu Glu Ala Ala Lys Trp Ser Gln Val Arg Lys
 50 55 60

Asp Leu Cys Ser Leu Lys Val Ser Leu Gln Leu Arg Gly Glu Asp Gly
 65 70 75 80

Ser Val Trp Asn Tyr Lys Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Lys Glu Ile
 85 90 95

Phe Ser Leu Leu Pro His Met Ala Asp Met Ser Thr Tyr Met Phe Lys
 100 105 110

Gly Ile Ile Ser Phe Ala Lys Val Ile Ser Tyr Phe Arg Asp Leu Pro
 115 120 125

Ile Glu Asp Gln Ile Ser Leu Leu Lys Gly Ala Ala Phe Glu Leu Cys
 130 135 140

Gln Leu Arg Phe Asn Thr Val Phe Asn Ala Glu Thr Gly Thr Trp Glu
 145 150 155 160

10

ES 2 587 795 T3

Cys Gly Arg Leu Ser Tyr Cys Leu Glu Asp Thr Ala Gly Gly Phe Gln
 165 170 175

Gln Leu Leu Leu Glu Pro Met Leu Lys Phe His Tyr Met Leu Lys Lys
 180 185 190

Leu Gln Leu His Glu Glu Glu Tyr Val Leu Met Gln Ala Ile Ser Leu
 195 200 205

Phe Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Leu Gln His Arg Val Ile Asp Gln
 210 215 220

Leu Gln Glu Gln Phe Ala Ile Thr Leu Lys Ser Tyr Ile Glu Cys Asn
 225 230 235 240

Arg Pro Gln Pro Ala His Arg Phe Leu Phe Leu Lys Ile Met Ala Met
 245 250 255

Leu Thr Glu Leu Arg Ser Ile Asn Ala Gln His Thr Gln Arg Leu Leu
 260 265 270

Arg Ile Gln Asp Ile His Pro Phe Ala Thr Pro Leu Met Gln Glu Leu
 275 280 285

Phe Gly Ile Thr Gly Ser
 290

- <210> 16
- <211> 267
- <212> PRT
- <213> *Gallus gallus*
- <400> 16

5

ES 2 587 795 T3

Gly Gly Leu Thr Ala Glu Gln Gln Glu Leu Ile Ser Ile Leu Ile Ala
1 5 10 15

Ala His Lys Arg Thr Phe Asp Ser Ser Phe Ser Gln Phe Gln His Tyr
20 25 30

Gln Pro Ala Val Arg Leu Cys Ile Pro Gly Pro Cys Ser Gln Ser Pro
35 40 45

Pro Gly Pro Gly Val Pro Ser Ala Ser Leu Ser Pro Gln Leu Asp Cys
50 55 60

Leu Asp Glu Asp Val Leu Pro Asp Val Phe Ser Ile Leu Pro His Phe
65 70 75 80

Ala Asp Leu Ser Thr Phe Met Ile Gln Gln Val Ile Lys Phe Ala Lys
85 90 95

ES 2 587 795 T3

Glu Ile Pro Ala Phe Arg Gly Leu Pro Ile Asp Asp Gln Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Lys Gly Ala Thr Leu Gly Ile Cys Gln Ile Gln Phe Asn Thr Val
 115 120 125

Phe Asn Glu Glu Thr Asn Ala Trp Glu Cys Gly Gln His Cys Phe Thr
 130 135 140

Ile Lys Asp Gly Ala Leu Ala Gly Phe Gln Gln Ile Tyr Leu Glu Pro
 145 150 155 160

Leu Leu Lys Phe His Ile Ser Leu Lys Lys Leu Arg Leu His Glu Ala
 165 170 175

Glu Tyr Val Leu Leu Val Ala Met Leu Leu Phe Ser Pro Asp His Ala
 180 185 190

Ser Val Thr Gln Arg Asp Phe Ile Asp Gln Leu Gln Glu Lys Val Ala
 195 200 205

Leu Thr Leu Lys Ser Tyr Ile Asp His Arg His Pro Met Pro Glu Gly
 210 215 220

Arg Phe Leu Tyr Ala Lys Leu Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gln Thr
 225 230 235 240

Leu Lys Met Glu Asn Thr Arg Gln Ile Leu His Ile Gln Asp Leu Ser
 245 250 255

Ser Met Thr Pro Leu Leu Ser Glu Ile Ile Ser
 260 265

<210> 17
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> *Fugu rubripes*
 <400> 17

5

Ile His Leu Ser Ser Gln Gln Glu Glu Thr Ile Arg Glu Leu Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly His Arg Lys Thr Phe Asp Leu Glu Phe Tyr Arg Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Arg Val Arg Thr Ser Thr Thr Leu Phe Asp Leu Ser Lys Ser Leu Ser
 35 40 45

10

ES 2 587 795 T3

Glu Arg Leu Asn Ile Phe Ala Val Arg Gly Ser Ser Pro Ser Gly Pro
 50 55 60
 Ala Ser Ser Asp Val Ser Ser Leu Ser Thr Ser Ala Arg Leu Arg Gly
 65 70 75 80
 Arg Pro Glu Thr Pro Gln Thr Gln Gly Gly Glu Asn Ala Arg Arg Gly
 85 90 95
 Cys Val Phe Thr Ala Leu Pro His Val Thr Asp Leu Ala Thr Cys Met
 100 105 110
 Ile His Asp Ile Ile Ala Phe Ser Lys Ser Leu Thr Asp Phe Lys Ser
 115 120 125
 Leu Leu Ile Gly Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys Gly Ala Thr Phe Glu
 130 135 140
 Val Met Glu Ile Arg Phe Asn Met Val Phe Asn Thr Lys Thr Gly Leu
 145 150 155 160
 Trp Glu Cys Gly His Ala Thr Tyr Cys Ile Glu Asp Ala Val Arg Ala
 165 170 175
 Gly Phe Gln Pro Leu Phe Leu Glu Pro Leu Leu Lys Phe His His Thr
 180 185 190
 Leu Arg Asn Leu Gly Leu Glu Glu Glu Tyr Val Leu Met Gln Ala
 195 200 205
 Leu Ser Leu Phe Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Gln His Ser Val
 210 215 220
 Ile Asp Lys Ile His Glu Asn Leu Ala Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile
 225 230 235 240
 Glu Leu Lys Arg Thr Gly Pro Glu Lys His Met Leu Tyr Pro Lys Val
 245 250 255
 Leu Ser Cys Leu Thr Glu Met Arg Thr Met Asn Glu Glu Tyr Ser Lys
 260 265 270
 Gln Val Leu Gln Ile Gln Asp Ile Gln Pro Asn Val Val Ile Pro Pro
 275 280 285
 Leu Leu Met Glu Met Val Ser
 290 295

<210> 18
 <211> 306

ES 2 587 795 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

5

Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe
 20 25 30

Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg
 35 40 45

Pro Asn Ser Arg His Thr Pro Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser
 50 55 60

Cys Ser Asp His Cys Ile Thr Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser
 65 70 75 80

Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val
 85 90 95

Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu
 100 105 110

Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro
 115 120 125

Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser
 130 135 140

Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met
 145 150 155 160

Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val
 165 170 175

Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu
 180 185 190

Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu
 195 200 205

His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly
 210 215 220

Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn
 225 230 235 240

ES 2 587 795 T3

Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His
245 250 255

Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu
260 265 270

Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu
275 280 285

Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu
290 295 300

Ile Ser
305

5

- <210> 19
- <211> 302
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*

- <400> 19

ES 2 587 795 T3

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

ES 2 587 795 T3

145		150		155		160									
Asp	Cys	Gly	Ser	Gln	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Ser	Arg
				165					170					175	
Ala	Gly	His	Thr	Leu	Glu	Leu	Ile	Glu	Pro	Leu	Ile	Lys	Phe	Gln	Val
			180					185					190		
Gly	Leu	Lys	Lys	Leu	Asn	Leu	His	Glu	Glu	Glu	His	Val	Leu	Leu	Met
		195					200					205			
Ala	Ile	Cys	Ile	Val	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Gly	Val	Gln	Asp	Ala	Lys
	210					215					220				
Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Gln	Asp	Arg	Leu	Ser	Asn	Thr	Leu	Gln	Thr	Tyr
225					230					235					240
Ile	Arg	Cys	Arg	His	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	His	Gln	Leu	Tyr	Ala	Lys
				245					250					255	
Met	Ile	Gln	Lys	Leu	Ala	Asp	Leu	Arg	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	His	Ser
			260					265					270		
Lys	Gln	Tyr	Arg	Ser	Leu	Ser	Phe	Gln	Pro	Glu	Asn	Ser	Ser	Met	Lys
		275					280					285			
Leu	Thr	Pro	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Phe	Gly	Asn	Glu	Ile	Ser		
	290					295					300				

<210> 20
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

5

<400> 20

ES 2 587 795 T3

Pro Lys Ile Ser Asp Glu Gln Gln Lys Met Ile Asp Ile Leu Leu Glu
1 5 10 15

Ala His Arg Lys Thr Phe Asp Thr Thr Tyr Ser Asp Phe Asn Lys Phe
20 25 30

Arg Pro Pro Val Arg Glu Asn Val Asp Pro Phe Arg Arg Ile Thr Arg
35 40 45

Ser Ser Ser Val His Thr Gln Gly Ser Pro Ser Glu Asp Ser Asp Val
50 55 60

Phe Thr Ser Ser Pro Asp Ser Ser Glu His Gly Phe Phe Ser Ala Ser
65 70 75 80

ES 2 587 795 T3

Leu Phe Gly Gln Phe Glu Tyr Ser Ser Met Gly Gly Lys Ser Gly Glu
85 90 95

Leu Ser Met Leu Pro His Ile Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln
100 105 110

Lys Ile Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ile
115 120 125

Ala Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys Ser Ser Val Ile Glu Val Ile
130 135 140

Met Leu Arg Ser Asn Gln Ser Phe Ser Leu Asp Asp Met Ser Trp Thr
145 150 155 160

Cys Gly Ser Glu Asp Phe Lys Tyr Lys Val Asp Asp Val Thr Gln Ala
165 170 175

Gly His Asn Met Glu Leu Leu Glu Pro Leu Val Lys Phe Gln Val Gly
180 185 190

Leu Lys Lys Leu Asp Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala
195 200 205

Ile Cys Ile Leu Ser Pro Asp Arg Pro Gly Leu Gln Asp Lys Ala Leu
210 215 220

Val Glu Ser Ile Gln Asp Arg Leu Ser Ser Thr Leu Gln Thr Tyr Ile
225 230 235 240

Leu Cys Lys His Pro Pro Pro Gly Ser Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Met
245 250 255

Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys
260 265 270

Gln Tyr Arg Ser Ile Ser Phe Leu Pro Glu His Ser Ser Met Lys Leu
275 280 285

Thr Pro Leu Met Leu Glu Val Phe Ser Asp Glu Ile Pro
290 295 300

<210>21
<211> 300
<212> PRT
<213> *Danio rerio*

<400>21

ES 2 587 795 T3

Gln Tyr Arg Ser Leu Ser Phe Gln Pro Glu His Ser Met Gln Leu Thr
 275 280 285

Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Ser Glu Val Ser
 290 295 300

5

<210> 22
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> *Petromyzon marinus*

<400> 22

Pro Gln Leu Leu Glu Glu Gln Glu Arg Leu Ile Ala Thr Leu Ile Glu
 1 5 10 15

Ala His Arg Lys Thr Tyr Asp Ala Ser Tyr Ser Asp Phe Ser Gln Phe
 20 25 30

Arg Pro Pro Lys Arg Gly Asp Gly Ser Pro Glu Cys Arg Asn Ala Thr
 35 40 45

Asn Pro Phe Leu Met Ser Leu Leu Asn Ser Asp Met Asp Glu Leu Pro
 50 55 60

Lys Ala Ser Ala Ser Gly Ala Glu Ala Ala Ala Gly Asp Glu Leu Ser
 65 70 75 80

Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val
 85 90 95

Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Lys Glu Leu Cys Thr Glu
 100 105 110

Asp Gln Ile Ser Leu Leu Lys Ala Ser Ala Ile Glu Ile Ile Ile Leu
 115 120 125

Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Glu Asp Asn Ser Trp Thr Cys Gly
 130 135 140

Ser Asn Glu Phe Lys Tyr Gln Ile Gly Asp Val Met Gln Ala Gly His
 145 150 155 160

Lys Leu Glu Leu Leu Glu Pro Leu Val Lys Phe Gln Val Asn Met Lys
 165 170 175

Lys Leu Asp Leu His Glu Ala Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys
 180 185 190

10

ES 2 587 795 T3

Leu Phe Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Arg Cys Arg Val Glu
195 200 205

Glu Val Gln Glu His Leu Thr Glu Thr Leu Arg Ala Tyr Ile Ala Cys
210 215 220

Arg His Pro Leu Ser Cys Lys His Met Leu Tyr Thr Lys Met Val Glu
225 230 235 240

Lys Leu Thr Glu Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr
245 250 255

Leu Gln Ile Ser Gln Asp Ala Val Asn Lys Glu Asp Leu Pro Pro Leu
260 265 270

Leu Leu Glu Val Phe Gly Asn Pro Thr Ala
275 280

- <210> 23
- <211> 303
- <212> PRT
- <213> *Ciona intestinalis*

- <400> 23

5

ES 2 587 795 T3

Val Leu Arg Ser Tyr Phe Ala Phe Ser Cys Asn Glu Asn Lys Tyr Met
 145 150 155 160

Ser Asp Lys Phe Gln Tyr Lys Pro Ser Asp Phe Leu Gln Ala Gly Gly
 165 170 175

Asn Lys Glu Phe Val Glu Lys Tyr Asn Ser Leu His Ile Arg Met Arg
 180 185 190

Lys Met Lys Leu Gln Val Glu Glu Ile Cys Leu Leu Leu Ala Leu Val
 195 200 205

Leu Phe Ser Pro Asp Arg Pro Gly Leu Glu Asp Gln Ala Lys Val Glu
 210 215 220

Gln Met Gln Asp Cys Val Ala Asn Thr Leu Gln Ala Tyr Glu Tyr Thr
 225 230 235 240

His Lys Pro Pro Asn Glu Ser Ser Phe Leu Gln Ala Arg Thr Met Tyr
 245 250 255

Cys Glu Leu Leu Leu Ile Leu Pro Ile Leu Arg Thr Ile Asn Met Leu
 260 265 270

Phe Ala Gln Asn Ile Met Ser Leu Lys Gln Thr Asn Glu Lys Asp Met
 275 280 285

Asn Pro Leu Ile Leu Glu Val Asn Asn Ser Ala Asp Asp Glu Asp
 290 295 300

<210> 24
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

5

Val Gln Leu Ser Lys Glu Gln Glu Glu Leu Ile Arg Thr Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Ala His Thr Arg His Met Gly Thr Met Phe Glu Gln Phe Val Gln Phe
 20 25 30

Arg Pro Pro Ala His Leu Phe Ile His His Gln Pro Leu Pro Thr Leu
 35 40 45

Ala Pro Val Leu Pro Leu Val Thr His Phe Ala Asp Ile Asn Thr Phe
 50 55 60

10

ES 2 587 795 T3

Met Val Leu Gln Val Ile Lys Phe Thr Lys Asp Leu Pro Val Phe Arg
65 70 75 80

Ser Leu Pro Ile Glu Asp Gln Ile Ser Leu Leu Lys Gly Ala Ala Val
85 90 95

Glu Ile Cys His Ile Val Leu Asn Thr Thr Phe Cys Leu Gln Thr Gln
100 105 110

Asn Phe Leu Cys Gly Pro Leu Arg Tyr Thr Ile Glu Asp Gly Ala Arg
115 120 125

Val Gly Phe Gln Val Glu Phe Leu Glu Leu Leu Phe His Phe His Gly
130 135 140

Thr Leu Arg Lys Leu Gln Leu Gln Glu Pro Glu Tyr Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Ala Met Ala Leu Phe Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Thr Gln Arg Asp
165 170 175

Glu Ile Asp Gln Leu Gln Glu Glu Met Ala Leu Thr Leu Gln Ser Tyr
180 185 190

Ile Lys Gly Gln Gln Arg Arg Pro Arg Asp Arg Phe Leu Tyr Ala Lys
195 200 205

Leu Leu Gly Leu Leu Ala Glu Leu Arg Ser Ile Asn Glu Ala Tyr Gly
210 215 220

Tyr Gln Ile Gln His Ile Gln Gly Leu Ser Ala Met Met Pro Leu Leu
225 230 235 240

Gln Glu Ile Cys Ser
245

REIVINDICACIONES

1. Un método de medición de la cantidad o de la concentración de un derivado de vitamina D en una muestra, en el que el derivado de vitamina D es 25-hidroxi-vitamina D, método que comprende:

a) poner en contacto una muestra con un polipéptido que comprende un dominio de unión al ligando de VDR modificado (LBD de BDR) y un par donante-aceptor de fluoróforos; y

b) medir la cantidad de fluorescencia, en el que dicha cantidad de fluorescencia es detectablemente superior o inferior en presencia del derivado de vitamina D en comparación con la cantidad de fluorescencia en ausencia del derivado de vitamina D;

en el que el dominio de unión al ligando de VDR corresponde a los aminoácidos 118-427 de SEQ ID NO: 1, y en el que el VDR modificado es una versión mutada del dominio de unión al ligando de VDR, en el que la mutación puede implicar la inserción, delección y/o sustitución, y comprende al menos una mutación causante de que dicha VDR modificada tenga una afinidad de unión por 25-hidroxi-vitamina D superior en comparación con el calcitriol, comprendiendo dicha al menos una mutación una sustitución en una posición de aminoácido seleccionada entre 274, 147, 150, 227, 230, 233, 234, 271, 275, 286, 288, 300, 309, 313, 418, 237, 143, 278, 305 y 397, y en el que el VDR modificado es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos superior al 80 % con, en una región de más de 300 aminoácidos, el dominio de unión al ligando de VDR que corresponde a los aminoácidos 118-427 de SEQ ID NO: 1.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el VDR modificado tiene una afinidad por 25-hidroxi-vitamina D al menos 10 veces superior que por otros derivados de vitamina D.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es de un sujeto mamífero.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el sujeto mamífero es un ser humano.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el ser humano padece enfermedad renal crónica (ERC).

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fluorescencia se mide usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el par donante-aceptor de fluoróforos se selecciona del grupo que consiste en proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína azul verdoso fluorescente (CFP), proteína amarilla fluorescente (YFP) y fragmentos activos de las mismas.

8. Un polipéptido que comprende un dominio de unión al ligando de VDR modificado (LBD de VDR) y un par donante-aceptor de fluoróforos, en el que dicho polipéptido comprende al menos una mutación causante de que dicho VDR modificado tenga una afinidad de unión por 25-hidroxi-vitamina D superior en comparación con el calcitriol,

en el que el dominio de unión al ligando de VDR corresponde a los aminoácidos 118-427 de SEQ ID NO: 1, y en el que el VDR modificado es una versión mutada del dominio de unión al ligando de VDR, en la que la mutación puede implicar la inserción, delección y/o sustitución, y comprende al menos una mutación causante de que dicho VDR modificado tenga una afinidad de unión por 25-hidroxi-vitamina D superior en comparación con el calcitriol, comprendiendo esta al menos una mutación una sustitución en una posición de aminoácido seleccionada entre 274, 147, 150, 227, 230, 233, 234, 271, 275, 286, 288, 300, 309, 313, 418, 237, 143, 278, 305 y 397, y en el que el VDR modificado es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos superior al 80 % con, en una región de más de 300 aminoácidos, el dominio de unión al ligando de VDR que corresponde a los aminoácidos 118-427 de SEQ ID NO: 1.

9. El método de la reivindicación 1 o el polipéptido de la reivindicación 8, en el que dicha mutación de la posición 274 comprende una sustitución de un resto de aminoácido básico con un resto de aminoácido alifático.

10. El método de la reivindicación 1 o el polipéptido de la reivindicación 8, en el que dicha al menos una mutación comprende Arg274Leu.

11. El método de la reivindicación 1 o el polipéptido de la reivindicación 8, en el que la mutación comprende una inserción, delección o sustitución en la posición 237 o 274.

12. El método de la reivindicación 1 o el polipéptido de la reivindicación 8, en el que la mutación comprende:

(i) la mutación de Ser-237 a una cadena lateral hidrófoba más voluminosa; o

(ii) la mutación en la posición 274 mediante la sustitución de un resto de aminoácido alifático con un resto de aminoácido básico; o

(iii) la modificación de uno o ambos de Ser-237 y Arg-274 con grupo/s de cadena lateral de aminoácidos que interferirán con la unión del calcitriol, pero que favorecerán la de 25-hidroxi-vitamina D.

5 13. El método de la reivindicación 1 o el polipéptido de la reivindicación 8, en el que la mutación se selecciona entre Ser237Val, Ser237Ile, Ser237Leu, Ser237Ala, Arg274Leu, Arg274Val y Arg274Ile.

14. El método de la reivindicación 1 o el polipéptido de la reivindicación 8, en el que la secuencia de aminoácidos del VDR modificado tiene:

10 (a) más del aproximadamente 85%, del aproximadamente 90%, del aproximadamente 91%, del aproximadamente 92%, del aproximadamente 93%, del aproximadamente 94%, del aproximadamente 95%, del aproximadamente 96%, del aproximadamente 97%, del aproximadamente 98% o del aproximadamente 99%, o más, de identidad de secuencia de aminoácidos con, en una región de más de 300 aminoácidos, el dominio de unión al ligando de la proteína nativa; o

15 (b) una secuencia de ácido nucleico que tiene más del aproximadamente 95%, del aproximadamente 96%, del aproximadamente 97%, del aproximadamente 98%, del aproximadamente 99%, o más, de identidad de secuencia de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Figura 1A

A. Dominio de unión al ADN

PXR_humana	QICRVCGDKATGYHFNVMTCEGCKGFFRRAMKRNARLRCPFRRKGACEITRKTRRQCQACR
PXR_pollo	KVCAVCGDRATGYHFHVMSCEGCKGFFRRSILKGVHFTCPF-TRSCPITKAKRRQCQACR
PXR_fugu	RACGVCGDQAKGYHFNAWTCCEGCKGFFRRAIKRTPPLPCQF-LNKCSITKKNRRQCQDCR
VDR_humana	RICGVCGDRATGFHFNAMTCEGCKGFFRRSMKRKALFTCPFN-GDCRITKDNRRHCQACR
VDR_ratón	RICGVCGDRATGFHFNAMTCEGCKGFFRRSMKRKALFTCPFN-GDCRITKDNRRHCQACR
VDR_x_laervis	RICGVCGDKATGFHFNAMTCEGCKGFFRRSMKRKAMFTCPFN-GDCRITKDNRRHCQSCR
VDR_pez cebra	PICGVCGDKATGFHFNAMTCEGCKGFFRRSMKRKASFTCPFN-GNCTITKDNRRHCQACR
VDR_lamprea	KVCGVCGDKATGYHFNAMTCEGCKGFFRRSMKRSASFTCPFE-GKCNITKDNRRHCQACR
VDR_PXR_Ciona	-----MHFGAITCEGCKGFFRRSVKKNASFSCAF-EKKCEINKNNRKHQCQACR
CAR_humana	RNCVVCGDQATGYHFNALTCCEGCKGFFRRTVSKSIGPTCPF-AGSCEVSKTQRRHCPACR

PXR_humana	LRKCLES GM (SEQ ID NO: 5)
PXR_pollo	LQKCLDVGM (SEQ ID NO: 6)
PXR_fugu	LRKCQAIGM (SEQ ID NO: 7)
VDR_humana	LKRCVDIGM (SEQ ID NO: 8)
VDR_ratón	LKRCVDIGM (SEQ ID NO: 9)
VDR_x_laervis	LKRCVDIGM (SEQ ID NO: 10)
VDR_pez cebra	LKRCIDIGM (SEQ ID NO: 11)
VDR_lamprea	LKRCRDIGM (SEQ ID NO: 12)
VDR_PXR_Ciona	FNACLAAGM (SEQ ID NO: 13)
CAR_humana	LQKCLDAGM (SEQ ID NO: 14)

Figura 1B

B. Dominio de unión al ligando

		<u>Hélice 1</u>			
PXR_ humana	141	QGLTEEQRMMIRELMDAQRKTFD	TTFSHFKNFRLPGVLSSGCELPESLQAP--SREEA-AK		
PXR_ pollo		GGLTAEQQEELISILIAAHKRTFDSSSFQFQHYQPAVRLC----	IPGPCSQS--PPGPG--VP		
PXR_ fugu		IHLSSQQEETIRELLYGRKTFDLEFYRFSFRVSTTLFLDLSKLSERL--NIFAV--RG			
VDR_ ratón	118	PKLSEEQRRI IAILLDAHKTYPDYSDFCQFRPPVVRVNDGGGSHPSRPNRHTPSF--SG			
VDR_ x_laevís		PKLSEEQQHI IAILLDAHKTYPDYADFRDPRPIRADVSTGYSRPP----	TLSF--SG		
VDR_ pez cebra		PKISDEQKQKIMIDILLEAHRKTFDTTYSDFNKFRPPVRENVDPFRFRITR.SSSVHTQGGSPSE			
VDR_ lamprea		PRLSDEQMQI INSLVEAHHKTYDSSYSDFVFRPPVREGPVTRASARAASLHSLSDA--SS			
VDR_ PXR_Ciona		PQLLEEQRLEIATLIEAHRKTYDASYSDFSQFRPPKRGDGSPECRNATNPFLLSLLN--SD			
VDR_ humana	103	TRMTMDEKLLVKTLLKGRDSDYDFAYVEYDTPRGREDGQOEIGNNTENPNG----	LDA--AT		
CAR_ humana		VQLSKEQEELIRTLGARTHRMGTMFEQFVQFRPPAHLFIHQPL-----			
<u>Hélice 3</u>					
PXR_ humana	199	WSQVRKDLCSLKVSLQL--RGEDGSVWNYKPP-----	ADSGGKEIFSLPHMADMSTYMFK		
PXR_ pollo		SASLSPQLDCLDEDVL-----	PDVFSILPHFADLSTFMIQ		
PXR_ fugu		SSPSGPASSDV--SSL--TSARLRGRPETPQTQGGENARRGC--VFTALPHVTLATCMIH			
VDR_ ratón	181	DSSSSCSHCITSSDM--MSSSFNLDLSEEDSDDPSVTLELSQLSMLPHLADLVSYSIQ			
VDR_ x_laevís		DSSSNS--DLYTPSLDM--MEPASFTMDLNEEGSDDPSVTLDLSPLSMLPHLADLVSYSIQ			
VDR_ pez cebra		DSDVFTSSPDSSEHGFPASLFGQFEYSSMGGKSGELS-----	MLPHIADLVSYSIQ		
VDR_ lamprea		DSFNHSPESVDTKLNFNLLMMYQDSG--SPDSSEEDQQS----	RLSMLPHLADLVSYSIQ		
VDR_ PXR_Ciona		MD-----	ELPKASASGAEAAAGDELSMLPHLADLVSYSIQ		
VDR_ humana	149	AVEAQTSTEDSGKQLHL--MLLPQHFLPIYP-----	FSFDPKA--KQLFQHFCDIMTWGIR		
CAR_ humana		-----	PTLAPVLPVLFVTHFADINTFMVL		
		<u>Hélice 3</u>	<u>Hélice 4</u>	<u>Hélice 5</u>	
PXR_ humana	253	GIISFAKVISYFRDLP	IEDQISLLKGAAFELCQLRFNTVFNAET--GTWECGR--LSY---		
PXR_ pollo		QVIKFAKEIPAFRGLP	IDDQISLLKGAATLGICQIQFNTVFNEET--NAMECGQ--HCF---		
PXR_ fugu		DIIFAKSLTDFKSL	IGDQIALLKGAATFEVMEIRFNMVFNTKT--GLWECGH--ATY---		
VDR_ ratón	240	KVIGFAKMI PGFRDLT	SEDQIVLLKSSAIEVIMLRSNESFTMD--MSWTCGNQDYKY---		
VDR_ x_laevís		KVIGFAKMI PGFRDLT	SDDQIVLLKSSAIEVIMLRSNQSFMTDD--MSWDCGSDYKY---		
VDR_ pez cebra		KLIGFAKMI PGFRDL	IAEDQIALLKSSVIEVIMLRSNQSFSLDD--MSWTCGSEDFKYKVD		
VDR_ lamprea		KVIGFAKMI PGFRDL	TAEDQIALLKSSAIEIIMLRSNQSFSLDD--MSWDCGSDYKYKVD		
VDR_ PXR_Ciona		KVIGFAKMI PGFKELCT	EDQISLLKASAIEIIMLRSNESFTMED--NSWTCGSEDFKYKVD		
VDR_ humana	171	KVIDYCKGIPQFVQLS	IVDQIVLLRGGCLEMLVLRSYFASFSCNE--NKYMSDK--FQY---		
CAR_ humana		QVIKFTKDLPVFRSLP	IEDQISLLKGAAVEICHIVLNTTFCLOQT--QNFLCGP--LRY---		
		<u>Hélice 7</u>	<u>Hélice 8</u>	<u>Hélice 9</u>	
PXR_ humana	308	CLEDT--AGGF----	QQLLEPLMLKFRHYMLKLLQLHEEYVILMQAITSLSFSPDRPGVLQHRV		
PXR_ pollo		TIKDGALAGF----	QQIYLEPLLKFHISLKKLRLHEAEYVLLVAMLLFSPDHASVTQRDF		
PXR_ fugu		CIEDAVRAGF----	QPLFLEPLLKFHHTLRNLGLEEYVILMQALSLSFSPDRPGVQHSV		
VDR_ ratón	297	RVSVDVTKAGH----	SLELIEPLIKFQVGLKKNLHEEEHVLLMAICIVSPDRPGVQDAAL		
VDR_ x_laevís		DITDVSFRAGH----	TLELIEPLIKFQVGLKKNLHEEEHVLLMAICIVSPDRPGVQDAKL		
VDR_ pez cebra		D---VTQAGH----	NMELLEPLVKFQVGLKKNLHEEEHVLLMAICILSPDRPGQDKAL		
VDR_ lamprea		D---VMQAGH----	KLELLEPLVKFQVNMKKLDLHEAEHVLLMAICILSPDRPGVQDRCR		
VDR_ PXR_Ciona		KPSDFLQAGG----	NKEFVEKYNLSLIRMRKMKLQVEICLLLALVLPSPDRPGLEDQAK		
VDR_ humana	226	TIEDGARVGF----	QVEFLELHFFHGTLRKLLQLEPEYVLLAAMALFSPDRPGVTQRDE		
CAR_ humana					
		<u>Hélice 9</u>	<u>Hélice 10</u>		
PXR_ humana	363	IDQLQEQAFTLKS	YIEBCNR--PQAHRFLEFLKIMAMLETLSINAQHTQRLLRTQDIHPFA		
PXR_ pollo		VDQLQEKVALTLKSY	IDHRH--PMPEGRFLYAKLLLLLTELQTLKMENTRQILHIQDLSSM-		
PXR_ fugu		IDKIHENLALALKTR	IELKR--TGPEKHMLYPKVLSCLEMTMNEEYSKQVLQIQDIQPNV		
VDR_ ratón	353	IEAIQDRLSNTLQTY	IRCRH--PPPGSHLLYAKMIQKLDLRSINEEHSKQYRCLSFQPECS		
VDR_ x_laevís		VEAIQDRLSNTLQTY	IRCRH--PPPGSHQLYAKMIQKLDLRSINEEHSKQYRSLSFQPECS		
VDR_ pez cebra		VESIQDRLSSTLQTY	ILCKH--PPPGSRLLYAKMIQKLDLRSINEEHSKQYRSISFLPEHS		
VDR_ lamprea		IEALQDRLCDVLAQY	IRIQH--P--GGRLLYAKMIQKLDLRSINEEHSKQYRSLSFQPEHS		
VDR_ PXR_Ciona		IEEVQEHLTETL	RAYIACRH--PLSCKHMLYTKMVEKLETLSINEEHSKQYLQISQDAVNK		
VDR_ humana	282	VEQMDCQVANTLQAY	EYTHK--PPNESSFLQARTMYCLPILRTINMLFAQNIMSLQTNKDM		
CAR_ humana		VDQLQEEMALTLQSY	IKGQQ--RRPRDRFLYAKLLGLLAELRSINEAYGYQIQHIQGLSAMM		
PXR_ humana	422	ATPLMQELFGITGS		(SEQ ID NO: 15)	
PXR_ pollo		-TPLLSEIIS		(SEQ ID NO: 16)	
PXR_ fugu		VIPPLMEMVS		(SEQ ID NO: 17)	
VDR_ ratón	412	SMKLTPLVLEVP	GNEIS	(SEQ ID NO: 18)	
VDR_ x_laevís		SMKLTPLVLEVP	GNEIS	(SEQ ID NO: 19)	
VDR_ pez cebra		SMKLTPLMLEV	FSDIIP	(SEQ ID NO: 20)	
VDR_ lamprea		SMQLTPLVLEVP	GSSEVS	(SEQ ID NO: 21)	
VDR_ PXR_Ciona		KEDLPPLLLEVP	GNPTA	(SEQ ID NO: 22)	
VDR_ humana	341	N-PLILEVNN	SADDED	(SEQ ID NO: 23)	
CAR_ humana		MPLLQETCS		(SEQ ID NO: 24)	

Figura 2

(SEQ ID NO:1)

Meamaastslpdpqfdrnvpricgvcgdratgfhfnamtcegckgffrrsmkrkalf
tcpfngdcritkdnrhcqacrllkrcvdigmmkefiltdeevqrkremilkrkeeealkD
SLRPKLSEEQQRIIAILLDAHHKTYDPTYSDFCQFRPPVRVN
DGGGSHPSRPNSRH~~TP~~SFSGDSSSSCDHCITSSDMMDSSS
FSNLDLSEEDSDDPSVTLELSQLSMLPHLADLVSYSIQKVI
GFAKMIPGFRDLTSEDQIVLLKSSAIEVIMLRSNESFTMD
DMSWTCGNQDYKYRVSDVTKAGHSLELIEPLIKFQVGLK
KLNLEEEHVLLMAICIVSPDRPGVQDAALIEAIQDRLSN
TLQTYIRCRHPPPGSHLLYAKMIQKLADLRSLNEEHKQY
RCLSFQPECSMKLTPLVLEVFGNEIS



LBD

Figura 3

(SEQ ID NO:2)

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVP
WPTLVTTLGYGVCFAFYDPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE
VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQKNGIKANFKIR
HNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSKLSKDPNEKRDHMLLEFV
TAAGITLGMDELYK

Figura 4

(SEQ ID NO:3)

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTWGVQCFARYPDHMKQHDFKSAWPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE
VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISDNVYITADKQKNGIKANFKIRH
NIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYK

Figura 5

(SEQ ID NO:4)

- **VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTT
GKLPVPWPTLVTTLGYGVCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTI
FFKDDGNYKTRAEVKFE~~G~~DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSH
NVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN
HYLSYQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKDSLRLPKLSEE
QQRIAILLDAHHKTYDPTYSDFCQFRPPVRVNDGGGSVTLELSQLSMLPHLA
DLVSYSIQKVIGFAKMIPGFRDLTSEDQIVLLKSSAIEVIMLRSNESFTMDDMS
WTCGNQDYKYRVSDYTKAGHSLELIEPLIKFQVGLKKNLHEEEHVLLMAICI
VSPDRPGVQDAALIEAIQDRLSNTLQTYIRCRHPPPGSHLLYAKMIQKLADLR
SLNEEH~~S~~KQYRCLSFQPECSMKLTPLYLEVFGNEISGSGTGVSKGEELFTGVVP
ILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTT**GKLPVPWPTLVTTLT
WGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE
GDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISDNVYITADKQKNGIKANFKIRH
NIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLL
EFVTAAGITLGMDELYK****

Figura 6

