

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1995.11.02**

(30) Prioridade(s): **1994.11.02 US 334029**
1995.06.07 US 482401

(43) Data de publicação do pedido: **1997.08.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.09.03**
243/2008

(73) Titular(es):

NPS PHARMACEUTICALS, INC.
550 HILLS DRIVE, 3RD FLOOR BEDMINSTER,
NJ 07921 US
THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK US

(72) Inventor(es):

GAIL MANDEL US
SIMON HALEGOUA US
LAURENCE A. BORDEN US

(74) Mandatário:

LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO
PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598
CHARNECA DA CAPARICA PT

(54) Epígrafe: **CANAIS DE SÓDIO ESPECÍFICOS DO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO, ADN QUE OS CODIFICAM, RASTREIO DE MEDICAMENTOS E MÉTODOS PARA A SUA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

CANAIS DE SÓDIO ESPECÍFICOS DO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO, ADN QUE OS CODIFICAM, RASTREIO DE MEDICAMENTOS E MÉTODOS PARA A SUA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO

Referências Cruzadas a Pedidos Relacionados

O presente pedido de patente é em parte uma continuação do pedido de patente U.S. No. 08/482,401, depositado a 7 de Junho de 1995, o qual é em parte uma continuação do pedido de patente U.S. No. 08/334,029, depositado a 2 de Novembro de 1994, sendo as apresentações de ambos aqui inteiramente incorporadas por referência.

Declaração Relativamente a Direitos Sobre Invenções Realizadas Com Apoio e Desenvolvimento Federal

A presente invenção foi realizada com apoio do governo dos E.U.A. Deste modo, o governo dos E.U.A. tem determinados direitos sobre a invenção.

Campo de Invenção

A presente invenção situa-se no campo da biotecnologia, purificação e cristalização de proteínas, análise por difracção de raios-X, modelação molecular computacional a três dimensões, e desenho racional de fármacos (RDD). A invenção refere-se a proteínas de canais de sódio (PCSS) isoladas específicas do sistema nervoso periférico (SNP) e ao ácido nucleico que as codifica. Também se apresentam compostos, composições e métodos para seleccionar, produzir e

utilizar agentes diagnósticos ou terapêuticos com actividade de modulação dos canais de sódio. Também se apresenta a modulação computacional a três dimensões das PCS do SNP e para RDD, com base na utilização de dados de raios-X e/ou dados de sequência de aminoácidos em suporte que possa ser lido informaticamente.

Antecedentes da Invenção

Os canais iónicos sensíveis a voltagem são uma classe de proteínas transmembranares que proporcionam uma base para a excitabilidade celular, pela capacidade em transmitir informação através de potenciais de membrana gerados por iões. Em resposta a alterações nos potenciais de membrana, estas moléculas modulam um fluxo iónico rápido através de poros altamente selectivos numa membrana de uma célula nervosa. Se a densidade do canal for suficientemente elevada, resulta uma despolarização regenerativa adequada, denominada o potencial de acção.

O canal de sódio sensível à voltagem é o canal iónico mais frequentemente responsável pela geração do potencial de acção em células excitáveis. Apesar dos potenciais de acção baseados no sódio em diferentes tecidos excitáveis parecerem semelhantes (Hille, B., Em: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, B. Hille, ed. Sinauer, Sunderland, MA, (1984), pp. 70-71) estudos electrofisiológicos recentes indicam que os canais de sódio em células diferentes diferem tanto nas suas propriedades estruturais como funcionais, e foram agora identificados muitos canais de sódio com estruturas primárias distintas. Ver por exemplo, Mandel. J. *Membrans Biol.* 125: 193-205 (1992).

Foram descritos canais de sódio funcionalmente distintos em diversos tipos de células neuronais (Llinas et al., J. Physiol. 305: 197-213 (1980); Kostyuk et al., Neuroscience 6: 2423-2430 (1981). Bossu et al., Neurosci. Lett. 51: 241-246 (1984) 1981; Gilly et al., Nature 309: 488-450 (1984); French et al., Neurosci. Lett. 56: 289-294 (1985); Ikeda et al., J. Neurophysiol. 55: 527-539 (1986); Jones et al., J. Physiol. 389: 605-627 (1987); Alonso & Llinas, 1989; Gilly et al., J. Neurosci. 9: 1362-1374 (1989)) e em músculo esquelético (Gonoi et al., J. Neurosci. 5: 2559-2564 (1985); Weiss et al., Science 233: 361-364 (1986)). A cinética das correntes de sódio em células da glia e neurónios também pode ser distinguida (Barres et al., Neuron 2: 1375-1388 (1989)).

Os genes de tipo II e tipo III, largamente expressos no sistema nervoso central (SNC), são expressos em níveis muito baixos nalgumas células do SNP (Beckh. S., FEBS Lett. 262: 317-322 (1990)) Os mARNs de tipo II e III praticamente não eram detectáveis, por análise "Northern blot", em gânglios das raízes dorsais (DRG), nervos cranianos e nervos ciático. Por outro lado, o mARN de tipo I estava presente em quantidades moderadamente elevadas em DRG e nos nervos cranianos, mas em baixos níveis no nervo ciático. Uma comparação da quantidade dos três mARN do cérebro, em relação ao mARN total de canais de sódio detectado com uma sonda de cADN conservado, sugeriu a presença de tipos de canais de sódio adicionais, apesar de ainda não identificados, em neurónios DRG. Em concordância com os estudos de mARN, estudos imunquímicos mostraram que nenhuma das subunidades alfa dos canais de sódio do tipo I ou do tipo II constituía

um componente significativo dos canais de sódio totais no gânglio cervical superior ou no nervo ciático (Gordon et al., Proc. Natl. Acad. Sel. USA 84: 8682-8686 (1987)).

Foi identificada electrofisiologicamente uma população de neurónios em DRG de vertebrados que contém, além dos canais mais convencionais, um tipo de canal de sódio distinto; este canal DRG tem um k_D para TTX aproximadamente dez vezes mais elevado que o k_D de canais de sódio no músculo esquelético ou no coração (Jones et al., J. Physiol. 389: 605-627 (1987)).

A localização de diferentes canais de sódio em regiões específicas no sistema nervoso central suporta a possibilidade da regulação específica para o tipo de célula desta família de genes ser realizada a nível da transcrição. Por analogia com outros genes eucarióticos, podem estar presentes distintos elementos de ADN que medeiam a regulação temporal e específica para o tipo de célula de genes de canais de sódio individuais.

Os estudos da regulação dos genes dos canais de sódio foram facilitados pela utilização de linhas celulares bem caracterizadas, tais como células de feocromocitoma (PC12), um modelo celular popular para diferenciação neuronal (Green et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2424-2428 (1976); Halegous et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 165: 119-170 (1991)). Além da extensão das neurites e da iniciação da síntese de determinados neurotransmissores, as células PC12 tratadas com NGF adquirem a capacidade de gerar potenciais de acção baseados em sódio (Dichter et al., Nature 268: 501-504 (1977)). Esta capacidade é conferida por um aumento na densidade de canais de sódio funcionais nas membranas das

células tratadas com NGF (Rudy et al., J. Neurosci. 7: 1613-1625 (1987); Mandel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 924-928 (1988); O'Laigue et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1701-1705 (1980)). A análise por "Northern blot" revelou que as células PC12 indiferenciadas continham um nível basal de mRNA de canal de sódio que aumentava em simultâneo com um aumento da actividade do canal observada após tratamento com NGF (Mandel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35: 924-928 (1988)).

Há já bastante tempo existe uma necessidade de se diagnosticar e/ou tratar patologias relacionadas com a condução imitada nos nervos do sistema nervoso periférico (SNP) associadas com lesões no SNP ou com estados de doença genética ou outros, tais como aqueles que envolvem a falta de, ou defeitos nos, canais de sódio (CSs) do SNP. Em vista da possibilidade de existirem canais de sódio específicos para um tipo de célula ou tecido, a descoberta e utilização de CSs do SNP isolados e de ácido nucleico que os codifica proporcionaria uma oportunidade para diagnosticar ou tratar tais patologias ou através do rastreio de fármacos adequados para a modulação de CSs do SNP para terapia génica *in situ* ou *in vivo* para substituir ou suplementar CSs do ANP em pelo menos uma porção do sistema nervoso periférico de um paciente mamífero que sofre de uma patologia relacionada com os CS do SNP.

OH Y. ET AL: 'The beta 1 subunit mRNA of the rat brain Nav1.1 channel is expressed in glial cells' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA (PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A), 1994, 91/21 (9985-9989)

discute a expressão de mRNA para a subunidade $\beta 1$ do canal de Na⁺ cérebro de rato em células gliais.

OH Y. ET AL: 'Rat brain Na⁺ channel mRNAs in non-excitabile Schwann cells' FEBS LETTERS (FEBS LETT.), 1994, 350/2-3 (342-346) discute a expressão de mRNA para os subtipos II e II (mas não subtipo I) do canal de Na⁺ cérebro de rato em células de Schwann de nervos ciáticos.

BECKH S.: 'Differential expression of sodium channel mRNAs in rat peripheral nervous system and innervated tissues' FEBS LETTERS (FEBS LETT.), 1990, 262/2 (317-322) descreve análises de hibridação de "ARN blot" utilizando sondas para os canais de sódio I, II e III em tecidos do sistema nervosa periférico.

GAUTRON S. ET AL: 'The glial voltage-gated sodium channel: Cell- and tissue-specific mRNA expression' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES AND THE UNITED STATES OF AMERICA (PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.), 1992, 89/15 (7272-7276) descreve o isolamento de um cADN que codifica para uma porção C-terminal de uma subunidade α de um canal de sódio putativo glial.

US4500530 descreve a utilização de lidoflazina na inibição de influxo extracelular de Ca⁺⁺ em glóbulos vermelhos.

Resumo da Invenção

A presente invenção (daqui para diante, "invenção") proporciona péptidos de canais de sódio (PCSs) específicos para o sistema nervoso periférico (SNP), ácidos nucleicos que

os codificam, vectores, células hospedeiras e anticorpos, assim como métodos para a sua produção e utilização, incluindo expressão recombinante, purificação e rastreio de fármacos com base em células. Também se apresenta terapia génica, cristalização, análise por difracção de raios-X, assim como determinação estrutural computadorizada e desenho de fármacos racional utilizando pelo menos uma sequência de aminoácidos de PCS de SNP e/ou dados de difracção de raios-X disponibilizados num suporte de leitura informática.

A presente invenção proporciona polipéptidos e polinucleótidos de canais de sódio do sistema nervoso periférico tal como definido nas reivindicações em anexo. A invenção inclui também sondas oligonucleotídicas específicas para sequências que codificam para PCS do SNP, assim como métodos para a detecção numa amostra, nos quais a sonda é marcada. A invenção inclui ainda métodos para a produção de uma PCS do SNP, compreendendo a cultura de um hospedeiro num meio de cultura, compreendendo um ácido nucleico de PCS do SNP; e o isolamento da PCS do SNP do referido hospedeiro ou do referido meio de cultura.

A invenção inclui ainda um anticorpo que se liga a um epitopo específico para a PCS do SNP, assim como células hospedeiras que expressam o anticorpo. São também apresentados métodos de diagnóstico ou terapêuticos.

A invenção inclui ainda vectores de administração de terapia génica que compreendem ácidos nucleicos que codificam, ou que são complementares, a pelo menos uma PCS do SNP, e suas composições farmacologicamente aceitáveis.

Também se apresentam métodos de terapia génica que administram um ácido nucleico de PCS do SNP a um animal numa quantidade eficaz para proporcionar um efeito de modulação dos CS do SNP, tal como um efeito analgésico.

Também se apresentam métodos para a purificação e a cristalização de uma PCS do SNP que podem ser analisados para obter padrões de difracção de raios-X de resolução suficientemente elevada para serem úteis na modelação molecular tridimensional da proteína, coordenadas atómicas, e/ou sequências de aminoácidos fornecidas num suporte informático e modelados em sistemas informáticos, utilizando métodos da invenção, para gerar estruturas secundárias, terciária e/ou quaternária de uma PCS do SNP, estruturas essas que contribuem para a respectiva estrutura tridimensional global, assim como para os locais activos e locais de ligação das PCS do SNP.

São também apresentados métodos de modelação molecular e sistemas informáticos para o desenho racional de fármacos (RDD). Estes métodos de desenho de fármacos utilizam programas de modelação por computador para encontrar agentes ou ligandos potenciais que são calculados para se ligar a locais sim ou domínios na PCS do SNP. São então submetidos a rastreio potenciais agentes ou ligandos relativamente à actividade de ligação ou modulação. Tais métodos de rastreio podem ser seleccionados de testes para pelo menos uma actividade biológica da proteína, como associada com uma patologia ou trauma relacionada com PCS e SNP, de acordo com testes para canais de sódio conhecidos. Os ligandos resultantes proporcionados por métodos da presente invenção são sintetizados e são úteis para tratar, inibir ou prevenir

pelo menos um trauma ou patologia relacionada com PCS e SCP em mamíferos.

Outros objectos, características, utilidades, realizações ou vantagens da presente invenção serão aparentes da descrição adicional aqui fornecida.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 representa uma sequência de 323 aminoácidos e a correspondente sequência de 969 nucleótidos de uma PCS do SNP como aminoácidos 233-555 da SEQ ID NO:2 e nucleótidos 699-1665 da SEQ ID NO:1, como a estrutura primária do Domínio III da subunidade alfa do canal de sódio do Nervo Periférico do tipo I (NPI) tanto para as sequências de aminoácido e de ADN. O código simples de aminoácidos é utilizado para denotar os aminoácidos deduzidos. YJI e YOIC referem-se aos iniciadores de oligonucleótidos utilizados para obter o fragmento inicial de PCR de cADN de INP.

Figura 2A-B mostra uma análise de "Northern blot" de um mRNA de uma subunidade α de canais de sódio em células de feocromocitoma de rato (PC12) tratadas com o Factor de Crescimento do Nervo (NGF). Na Figura 2(A), a sonda utilizada é pRB211 que codifica para o quarto domínio repetido altamente conservado do cana de sódio do tipo II de rato. Ambos os mRNA do tipo H e PN1 são detectados com esta sonda. Na Figura 2(B), a sonda utilizada contém sequências específicas para PN1. Os níveis do mRNA de canal de sódio são quantificados em referência à quantidade de mRNA de ciclofilina, tal como indicado. As células controlo são células PC 12 cultivadas na ausência de NGF.

Figura 3A-B apresenta um exemplo de uma distribuição de mARN de PN1 específica para os tecidos. A Figura 3(A) apresenta uma análise de "Northern blot" utilizando quantidades iguais de ARN dos tecidos. O mARN de PN1 é indicado pelo traço. 28S refere-se ao rARN 28S. A sonda contém sequências específicas para o gene PN1. Note-se a ausência de mARN de PN1 no músculo esquelético, músculo cardíaco e os baixos níveis de mARN de PN1 na corda espinal. A Figura 3(B) ilustra a análise de protecção contra RNase do mARN de PN1. PH1 refere-se à sonda PN1 protegida por mARN das diferentes amostras de tecidos. Actina refere-se às sequências de sonda de actina protegidas pelo mesmo mARN.

Figura 4A-F apresenta a localização de mARN de PN1 nos tecidos do Gânglio Cervical Superior (SCG) e do Gânglio da Raiz Dorsal (DRO) por análise de hibridação *in situ*. As Figuras 4A-4B representam neurónios hibridados com uma sonda de ARN antisense específica para PN1. As Figuras 4C-4D representam neurónios hibridados com uma sonda específica para PN1 marcada radioactivamente na presença de ADN competidor de PN1 não marcado. As Figuras 4E-4F representam secções de tecidos hibridados com uma sonda antisense do tipo II.

Figura 5 mostra uma análise de "blot" que compara os níveis de PN1 e de mARN de subunidade α do tipo I do cérebro em SCG. A sonda pRB11 conservada para canais de sódio detecta todos os tipos de transcritos PN1 E do tipo II/IIA.

Figura 6A-B apresenta uma análise por "Northern blot" que revela uma expressão diferencial de PN1 e mARNs de canais de sódio do tipo 1 durante o desenvolvimento pós-natal em ratos.

A Figura 6(A) apresenta um auto-radiograma representativo de uma análise por "Northern blot" utilizando como sonda ARN pRB211 antisense marcada radioativamente. Apresentam-se os dias pós-natal 7 (P7) a 42 (P42). A Figura 6(B) apresenta um gráfico da quantificação ao longo do tempo após o nascimento dos "Northern blot" que apresentam um decréscimo do mRNA do tipo I.

Figura 7A-D apresenta a estrutura primária deduzida da porção clonada de cADN de uma subunidade α de PN1 na forma de uma sequência parcial de 3033 nucleótidos (SEQ ID NO:1) e uma sequência de 1011 aminoácidos (SEQ ID NO:2).

Figura 8A-D apresenta uma comparação de sequências de aminoácidos primárias deduzidas de PN1 (1-988 de SEQ ID NO:2) e da subunidade α do tipo II/IIA do cérebro (SEQ ID NO:7). É também apresentada uma sequência consenso (SEQ ID NO:8).

Figura 9A-9D apresenta a totalidade da sequência de ADN para a PCS do SNP PN1 (SEQ ID NO:9).

Figura 10 apresenta a totalidade da sequência de aminoácidos para a PCS do SNP PN1 (SEQ ID NO:10).

Figura 11A-11E apresenta sequências de aminoácidos para PN1 de rato ("PATPN1") (SEQ ID NO:10) e duas sequências humanas PN1 esperadas "HUMPN1A" (SEQ ID NO:11) "HUMPN1B" (SEQ ID NO:16) HUMPN1C (SEQ ID NO:15) e HUMPN1D (SEQ ID NO:12). As sequências alternativas incluem aquelas nas quais "X" é 0, 1, 2, ou 3 dos mesmos aminoácidos ou de aminoácidos diferentes, que podem ser opcionalmente seleccionados da Tabela 1 ou da Tabela 2.

Figura 12 apresenta um sistema informático adequado para a determinação da estrutura tridimensional e/ou o desenho racional de fármacos.

Figura 13A-B apresenta uma sequência de ADN representativa que codifica para uma PN1 humana (HUM PN1A) (SEQ ID NO:12)

Figura 14A-B apresenta uma sequência de ADN representativa que codifica para uma PN1 humana (HUM PN1B) (SEQ ID NO:14)

Descrição Detalhada da Invenção

Existe a necessidade de se modular a actividade de pelo menos um canal de sódio (CSs) específico do sistema nervoso periférico (SNP). Tal modulação poderia potencialmente proporcionar agentes de diagnóstico ou analgésicos para dor ou patologias associadas com a condução nervosa no SNP.

Descobriu-se agora que certos canais de sódio - correspondendo às PCSs do SNP da invenção - seria preferencialmente ou selectivamente expressos no sistema nervoso periférico (SNP). Estes canais de sódio modulam a condução de impulsos nos nervos periféricos preferencialmente no SNP. A presente invenção proporciona péptidos de canais de sódio (PCSs) específicos do sistema nervoso periférico (SNP), ácidos nucleicos que os codificam, vectores, células hospedeiras e anticorpos, assim como métodos de os produzir e utilizar, incluindo expressão recombinante, purificação e rastreio de fármacos com base em células. Também se apresenta terapia génica, cristalização, análise por difracção de raios-X, assim como determinação estrutural computadorizada e desenho de fármacos racional utilizando pelo menos uma

sequência de aminoácidos de PCS de SNP e/ou dados de difracção de raios-X disponibilizados num suporte de leitura informática.

Os PCSs de SNP da invenção são tal como definidos nas reivindicações anexas. Também se apresentam aqui péptidos de canais de sódio do SNP (PCS SNP), por exemplo um conjunto de canais de sódio (CS) do SNP com actividade de SC, na forma de um fragmento, sequência de consenso ou unidade de repetição. Um PCS do SNP da invenção pode ser preparado por.

- (a) métodos de ADN recombinante;
- (b) digestão proteolítica da molécula intacta ou de um seu fragmento;
- (c) métodos de síntese química de péptidos bem conhecidos na técnica; e/ou
- (d) qualquer outro método capaz de produzir um PCS do SNP e com uma conformação semelhante a uma porção activa de um PCS do SNP com uma actividade de CS. A actividade de CS pode ser detectada através de um rastreio utilizando testes de rastreio conhecidos para a actividade de canal de sódio, *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. Tal como aqui apresentado, a sequência peptídica mínima para que se tenha actividade baseia-se na unidade mais pequena que contenha ou que compreende uma região particular, domínio, sequência de consenso, ou unidade de repetição daquela, de pelo menos um PCS do SNP.

Tal como aqui utilizado, um PCS do SNP inclui uma associação de dois ou mais domínios polipeptídicos, tais como domínios transmembranares, de revestimento de poros, ou seus fragmentos, correspondendo a um PCS do SNP, tais como 1-40

domínios ou qualquer gama ou valor nesse intervalo. Os domínios transmembranares, de revestimento de poros citoplasmáticos ou outros domínios de um PCS do SNP da apresentação podem ter pelo menos 74% de homologia, tais como 74-100% de homologia ou identidade global, ou qualquer gama ou valor nesse intervalo a um ou mais domínios CS correspondentes tais como aqui descritos (por exemplo, tal como apresentado nas Figuras 1, 7, 8, 10 ou 11). Tal como pode ser entendido por qualquer perito na técnica, a configuração acima dos domínios é fornecida como uma parte de um PCS de SNP da invenção, de modo que um PCS do SNP funcional, quando expresso numa célula adequada, seja capaz de transportar iões de sódio através de uma bicamada lipídica, uma membrana celular ou uma membrana modelo. Em células intactas com canais de sódio suficientes, a célula pode ser capaz de gerar alguma forma de potencial de acção, tal como numa célula que expressa pelo menos um PCS do SNP da presente invenção. Tal transporte, tal como medido por testes de actividade CS adequados, estabelece a actividade CS de um ou mais PCSs do SNP da invenção.

Um PCS do SNP da invenção tem pelo menos 90% de identidade relativamente à Figura 7 (sequência de aminoácidos). O PCS do SNP da invenção pode ter 90-99, 91-99, 92-99, 93-99, 94-99, 95-99, 96-99, 97-99, ou 98-99% de identidade. Também se apresentam aqui péptidos com uma porção de uma sequência de aminoácido CS que correspondem substancialmente a pelo menos um fragmento de 20 a 2005 aminoácidos e/ou uma sequência de consenso de um PCS do SNP ou grupo de PCSs do SNP, em que o PCS do SNP tem homologia ou identidade de pelo menos 74-99%, tal como 88-99% (ou qualquer gama ou valor nesse intervalo, por exemplo, 87-99, 88-99, 89-99) de homologia relativamente

a pelo menos uma sequência ou sequência de consenso das Figuras 1, 7, 8, 10 ou 11. Os PCSs do SNP da invenção mantêm a actividade biológica de CS. Prefere-se que o PCS do SNP da invenção não seja um que ocorra naturalmente ou no caso de ocorrer naturalmente esteja numa forma purificada ou isolada que não ocorre na natureza. Um PCS do SNP tal como aqui apresentado corresponde substancialmente a um conjunto de domínios de PN1, com pelo menos 10 aminoácidos contíguos das Figuras 1, 7, 8, 10 e 11, ou com pelo menos 74% de homologia.

Também se apresenta aqui um PCS de SNP que pode compreender pelo menos um domínio correspondente a domínios de canais de sódio conhecidos, tais como domínios CS da corda espinal ou de cérebro de rato, tais como IIs6 (por exemplo, 1-3 a 14-17 (IIs6), 18-23 a 210-214 (citoplasmático), 229-236 a 254-258 (IIIS1), 268-272 a 293-297 (IIIS2), 300-304 a 321-325 (IIIS3), 326-330 a 347-351 (IIIS4), 368-374 a 389-393 (IIIS5), 474-478 a 500-504 (IIIS6), 553-559 a 577-583 (IVs1), 589-593 a 611-615 (IVs2), 619-623 a 642-646 (IVs3), 654-658 a 678-682 (IVs4), 690-694 a 711-715 (IVs5), 779-783 a 801-805 (IVs6), 348-352 a 368-372, 501-505 a 550-554, 233-553, 676-678 a 689-693, 554-557 a 941-945, ou qualquer gama ou valor nesses intervalos, correspondendo a SEQ ID NO:2 tal como apresentado na Figura 7A-7D, ou suas variantes tais como substituições apresentadas na Tabela 1 ou na Tabela 2, com 74-100% de homologia geral ou qualquer gama de valores no intervalo. Pelo menos um destes domínios está presente nos PCSs do SNP apresentado pela Figura 11A-E, ou fragmentos destes. Domínios alternativos são também codificados por ADN que híbrida sob condições restritivas a pelo menos 30 nucleótidos contíguos das Figuras 1, 7, 9, 13 ou 14, ou tendo codões substituídos para esse fim que codificam para o mesmo

aminoácido que um codão particular. Adicionalmente, também se consideram domínios de fosforilação (por exemplo PKA e PKC), tal como seria reconhecido pelos peritos na técnica, quando proporcionando um PCS do SNP ou um ácido nucleico codificante tal como aqui apresentado.

A percentagem de homologia ou de identidade pode ser determinada, por exemplo, através da comparação da informação sobre a sequência utilizando o programa informático GAP, versão 6.0, disponível através do Genetics Computer Group da Universidade do Wisconsin (UWGCG). O programa GAP utiliza o método de alinhamento de Needleman e Wunsch (J. Mol Biol. 48: 443 (1970), tal como revisto por Smith e Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)). Resumidamente, o programa GAP define a semelhança como o número de símbolos alinhados (ou seja, nucleótidos ou aminoácidos) que são iguais, dividido pelo número total de símbolos na sequência mais curta das duas. Os parâmetros por defeito preferidos para o programa GAP incluem: (1) uma matriz de comparação unitária (contendo o valor 1 para as identidades e 0 para as não identidades) e a matriz de comparação ponderada de Gribskov e Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745 (1986), tal como descrito por Schwartz e Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) uma penalidade de 3,0 para cada intervalo e uma penalidade adicional de 0,10 para cada símbolo em cada intervalo; e (3) uma penalidade para intervalos nas pontas. Noutro exemplo, o péptido apresentado corresponde a uma porção da SEQ ID NO:2 biologicamente activa como CS, ou uma sua variante, por exemplo, como apresentado na Figura 11A-D.

Assim, qualquer perito na técnica, dadas as técnicas e os procedimentos apresentados na presente especificação, saberá como adicionar, remover ou substituir outros resíduos aminoácidos noutras posições de um CS de modo a obter um pCS do SNP, incluindo variantes modificadas por substituição ou deleção ou adição, por exemplo, com uma substituição tal como apresentada nas Tabelas 1 ou 2 abaixo.

Um PCS do SNP aqui apresentado também inclui uma variante em que pelo menos um resíduo aminoácido no péptido foi conservativamente substituído, adicionado ou deletado por pelo menos um aminoácido diferente. Para uma descrição total da química e estrutura de proteínas, ver, por exemplo, Schulz, et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, Nova Iorque, 1978, e Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., São Francisco, 1983, que são aqui incorporados por referência. Para uma apresentação de substituições na sequência de nucleótidos, tais como preferências de codões, ver Ausubel et al., eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc., Nova Iorque, NY, (1987, 1992, 1993, 1994, 1995) em §§ A.1.1-A.1.24, e Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), nos Apêndices C e D.

As substituições conservativas de um PCS do SNP da invenção inclui uma variante na qual pelo menos um resíduo de aminoácido no péptido foi conservativamente substituído, adicionado ou deletado por pelo menos um aminoácido diferente. Tais substituições são preferentemente realizadas de acordo com a seguinte lista tal como apresentada na Tabela

1, substituições essas que podem ser determinadas por experimentação de rotina para proporcionar propriedades estruturais e funcionais modificadas de uma molécula de péptido sintetizada, mantendo a actividade biológica de CS, tal como determinada por testes de actividade de CS conhecidos. No contexto da invenção, o termo PCS do SNP ou "substancialmente correspondendo a" inclui tais substituições.

Tabela 1

Resíduo Original	Substituição Exemplificativa
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr, Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Alternativamente, outro grupo de substituições de PCSs de SNP da invenção é aquele em que pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de proteína foi removido e um resíduo diferente adicionado no seu lugar de acordo com a Tabela 2 seguinte. Os tipos de substituições que podem ser realizadas na molécula de proteína ou de péptido da invenção podem ser baseados na análise das frequências de alterações de aminoácidos entre uma proteína homóloga de espécie diferente,

tais como aquelas apresentadas na Tabela 1-2 de Schulz et al. *infra*. Com base em tal análise, as substituições conservativas alternativas são aqui definidas como permutas num dos seguintes cinco grupos:

TABELA 2

1. Resíduos alifáticos pequenos, não polares ou ligeiramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Resíduos polares, negativamente carregados e as suas amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Resíduos polares, positivamente carregados:
His, Arg, Lys;
4. Resíduos alifáticos grandes, não polares:
Met, Leu, Ile, Val (Cys); e
5. Resíduos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

A maioria das deleções e das adições e substituições de acordo com a invenção são aquelas que não produzem alterações radicais nas características da molécula de proteína ou de péptido. Define-se "características" de um modo não inclusivo para definir tanto alterações na estrutura secundária, por exemplo hélice α ou folha β , assim como alterações na actividade fisiológica, por exemplo, em testes de ligação a receptores.

Deste modo, com base nos exemplos acima, de substituições específicas, podem ser realizadas substituições alternativas por experimentação de rotina, para proporcionar PCSs do SNP alternativas da invenção, por exemplo, realizando uma ou mais substituições conservativas de fragmentos CS que podem proporcionar actividade CS. No entanto, quando se pretende confirmar o efeito exacto da substituição, deleção, ou

adição, o perito na técnica entenderá que o efeito é pelo menos uma substituição, adição ou deleção será avaliado por pelo menos um teste de rastreio da actividade de canal de sódio, tal como, mas não limitado a, testes imunológicos ou biológicos, para confirmar a actividade biológica, tal como, mas não limitado à, actividade de canal de sódio.

As variantes da sequência de aminoácidos de um PCS do SNP da invenção podem também ser preparadas por mutações no ADN. Tais variantes incluem, por exemplo, deleções, ou adições, ou substituições de, resíduos na sequência de aminoácidos. Qualquer combinação de deleção, adição e substituição pode também ser levada a cabo para se chegar à construção final, desde que a construção final possua alguma actividade CS. Preferentemente, encontra-se actividade CS melhorada em relação àquela do péptido não variante. Obviamente, as mutações que serão realizadas no ADN que codifica para a variante não devem colocar a sequência fora da grelha de leitura aberta e preferentemente não criarão regiões complementares que poderiam produzir uma estrutura secundária de mRNA (ver, por exemplo, Publicação do Pedido de Patente EP No. 75,444; Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*). Ao nível genético, estas variantes são normalmente preparadas por mutagénese dirigida de nucleótidos no ADN que codifica para um PCS do SNP, produzindo assim ADN que codifica para a variante, e depois expressando o ADN numa cultura de células recombinantes. Os variantes tipicamente apresentam a mesma actividade biológica qualitativa que o CS que ocorre naturalmente (ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*).

Uma vez determinadas a estrutura ou as características de um canal de sódio do SNP, os PCSs do SNP podem ser produzidos por via recombinante ou por via sintética, e opcionalmente purificados, para proporcionar quantidades comercialmente úteis de PCSs do SNP para utilização em aplicações de diagnóstico ou investigação, de acordo com passos do método conhecidos (ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*, cujas referências são aqui totalmente incorporadas por referência).

Pode-se utilizar uma variedade de metodologias conhecidas na técnica para se obter uma PCS do SNP da invenção isolado. Numa realização, o péptido é purificado a partir de tecidos ou células que produzem naturalmente o péptido. Alternativamente, os fragmentos dos ácidos nucleicos acima descritos poderiam ser utilizados para expressar a proteína PCS do SNP em qualquer organismo. As amostras da invenção incluem células, extractos de proteínas ou extractos de membranas de células, ou fluidos biológicos. A amostra irá variar dependendo do formato do teste, o método de detecção e a natureza dos tecidos, células ou extractos utilizados como amostra.

As células e/ou o tecido pode incluir, células ou tecidos de animais normais ou patológicos, tais como do sistema nervoso periférico, e seus extractos ou culturas celulares, proporcionadas *in vivo*, *in situ* ou *in vitro*, na forma de tecidos e/ou células cultivadas, passajadas, não passajadas, transformadas, recombinantes ou isoladas.

Qualquer organismo eucariótico superior pode ser utilizado como uma fonte de pelo menos um ICS do SNP ou PCS do SNP da

invenção, desde que o organismo de origem contenha naturalmente tal péptido. Tal como aqui utilizado, "organismo de origem" refere-se ao organismo original do qual se deriva a sequência de aminoácidos do péptido, independentemente do organismo no qual o péptido é expresso e/ou finalmente isolado. Os organismos de origem preferidos se pelo menos um ISC do SNP ou um ácido nucleico codificante pode ser qualquer animal vertebrado, tais como mamíferos, aves, peixes ósseos, enguias eléctricas, rãs e sapos. Entre os mamíferos, os receptores preferidos são mamíferos das Ordens Primata (incluindo humanos, macacos), Artiodáctilos (incluindo cavalos, cabras, vacas, ovelhas, porcos), Roedores (incluindo ratinhos, ratos, coelhos, e hamsters), e Carnívoros (incluindo gatos, e cães). Os organismos de origem mais preferidos são humanos.

O perito na técnica pode facilmente seguir métodos conhecidos para isolar proteínas de modo a obter o péptido livre de contaminantes naturais. Estes incluem, mas não se limitam a: imunocromatografia, cromatografia de exclusão molecular, HPLC, cromatografia de permuta iónica, e cromatografia de imunoafinidade. Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*; Colligan, *infra*.

Moléculas de Ácidos Nucleicos Isoladas que Codificam para Péptidos PCS do SNP Numa realização, a presente invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para um péptido com uma sequência de aminoácidos correspondente a novos PCSs do SNP tais como definidos nas reivindicações anexas. Também se apresenta uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos de PCS do SNP com uma homologia ou identidade

global superior a 70% em relação a uma sequência de pelo menos 60 nucleótidos presente em SEQ ID NO:1 (preferentemente superior a 80%; mais preferentemente superior a 90%, tal como 70-99% e qualquer gama ou valor nesse intervalo). Noutra realização preferida, a molécula isolada de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos de PCS do SNP correspondente à Figura 7. Também se revela aqui sequências de nucleótidos que codificam para pelo menos um domínio das figuras 1, 7, 8, 10 e 11.

Também se incluem no âmbito desta invenção os equivalentes funcionais das moléculas de ácidos nucleicos isoladas aqui descritas e seus derivados desde que sejam abrangidas pelas reivindicações em anexo. Por exemplo, tal como apresentado acima para as sequências de aminoácidos PCS do SNP, as sequências de ácidos nucleicos apresentadas em SEQ ID NO_1 podem ser alteradas por substituições, adições ou deleções que originam moléculas funcionalmente equivalente. Devido à degenerescência das sequências codificantes de nucleótidos, podem ser utilizadas outras sequências de ADN que codificam para substancialmente a mesma sequência de aminoácidos do uma PCS do SNP na prática da invenção. Apresentam-se aqui sequências de ácidos nucleicos que codificam para a totalidade ou para porções das sequências de aminoácidos do PCS do SNP de Figuras 1, 8, 10 e 11, as quais são alteradas pela substituição de codões diferentes que codificam para um resíduo de aminoácidos funcionalmente equivalente no interior da sequência, produzindo deste modo uma alteração silenciosa.

Tais alterações funcionais de uma dada sequência de ácidos nucleicos oferecem uma oportunidade para promover a secreção e/ou o processamento de proteínas heterólogas codificadas por

sequências de ácidos nucleicos estranhas a elas fundidas. Todas as variações da sequência nucleotídica do gene de PCS do SNP permitido pelo código genético são, deste modo, incluídas nesta invenção desde que sejam abrangidas pelas reivindicações em anexo. Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*. Os fragmentos do PCS do SNP são também apresentados.

Além disso, a sequência de ácido nucleico pode compreender uma sequência de nucleótidos que resulta da adição, deleção ou substituição de pelo menos um nucleótido a na extremidade 5' e/ou 3' de uma sequência de um ácido nucleico correspondente à Figura 7. Também se apresentam aqui sequências de ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma porção das Figuras 1, 8, 20 ou 11, ou uma sua variante. Qualquer nucleótido ou polinucleótido pode ser utilizado a este respeito, desde que a sua adição, deleção ou substituição não remova a actividade de canal de sódio que é codificada pela sequência de nucleótidos. Além disso, a molécula de ácido nucleico da invenção pode, conforme necessário, conter locais de reconhecimento de endonucleases de restrição que não removem a actividade do PCS do SNP codificado.

Além disso, é possível deletar codões ou substituir um ou mais codões por codões diferentes de codões degenerados para produzir um péptido estruturalmente modificado, mas um que tenha substancialmente a mesma utilidade ou actividade daquela do péptido produzido pela molécula de ácido nucleico não modificada. Tal como reconhecido na técnica, os dois péptidos são funcionalmente equivalentes, assim como o são as duas moléculas de ácidos nucleicos que conduzem à sua

produção, mesmo se as diferenças entre as moléculas de ácido nucleico não se relacionam com a degenerescência do código genético. Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*.

Isolamento de Ácidos Nucleicos Noutro aspecto da presente invenção, proporcionam-se moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam para péptidos com sequências de aminoácidos correspondentes aos PCS do SNP. Em particular, a molécula de ácido nucleico pode ser isolada de uma amostra biológica contendo ácido nucleico de mamífero, tal como correspondente a uma sonda específica para um CS do SNP obtido de um organismo eucariótico superior.

A molécula de ácido nucleico pode ser isolada de uma amostra biológica contendo ácido nucleico utilizando técnicas conhecidas, tais como mas sem limitação a, amplificação de iniciadores ou clonagem de cADN.

A molécula de ácido nucleico pode ser isolada de uma amostra biológica contendo ADN genómico ou de uma biblioteca genómica. Amostras biológicas adequadas incluem, mas não se limitam a, células ou tecidos animais normais ou patológicos, tais como fluido cerebrospinal (SNC), sistema nervoso periférico (neurónios, gânglios) e porções, células do coração, músculo liso, esquelético ou cardíaco, sistema nervoso autónomo, e extractos de culturas celulares destes, proporcionadas *in vivo*, *in situ* ou *in vitro*, na forma de tecidos e/ou células cultivadas, passajadas, não passajadas, transformadas, recombinantes ou isoladas. O método de obtenção da amostra biológica irá variar dependendo da natureza da amostra.

Um perito na técnica reconhecerá que o genoma de mamíferos pode ser sujeito a ligeiras variações alélicas, desde que a sequência codifique para um PCS do SNP de acordo com as reivindicações anexas. Quando um alelo de PCS do SNP não codifica para a sequência de aminoácidos idêntica àquela encontrada na Figura 8, pode ser isolado e identificado como um PCS do SNP utilizando as mesmas técnicas aqui utilizadas, e especialmente técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para amplificar o gene apropriado com iniciadores baseados nas sequências aqui apresentadas. Tais variações são apresentadas, por exemplo, na Figura 11 e nas Tabelas 1 e 2.

A clonagem de cADNs de grandes dimensões é idêntica (por exemplo, PN1 como um PCS do SNP da invenção inclui clones sobreponíveis de cerca de 13 kDa) mas exige maior experimentação de rotina, do que os cADNs de menores dimensões. Um método útil baseia-se no rastreamento de cADN de uma biblioteca de bacteriófagos (ver, por exemplo, Sambrook, *infra*, ou Ausubel, *infra*). As sondas para o rastreamento são marcadas, por exemplo, com hexâmeros aleatórios e a enzima de Klenow (*kit* da Pharmacia). Se os cADNs 5' não são obtidos com estas abordagens, pode ser preparada uma biblioteca de sub-cADN na qual se utilizam iniciadores PN1 específicos para iniciar a reacção da transcriptase reversa em vez de oligos dT ou de iniciadores aleatórios. A sub-biblioteca de cADN é então clonada em vectores convencionais tais como lambda zap e rastreada utilizando técnicas convencionais. Esta estratégia foi utilizada anteriormente (Noda et al. Nature 320: 188-192 (1986); Noda et al., Nature 322: 826-828 (1986)) para clonar os sADNs dos canais de sódio do tipo I e II do cérebro. A construção de um cADN de comprimento total é levada a cabo através da subclonagem de fragmentos que se

sobrepõem num vector de expressão (seja procariótico ou eucariótico). Esta tarefa é mais difícil com cADNs de grandes dimensões dada a escassez de locais de restrição únicos, mas se utilizam restrição, clonagem ou PCR rotineiras para unir os fragmentos.

Síntese do Ácido Nucleico Pretende-se também que as moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção incluam aquelas sintetizadas quimicamente. Por exemplo, pode-se desenhar uma molécula de ácido nucleico com a sequência nucleotídica que codifica para o produto de expressão de um gene PCS do SNP e, se necessário, pode ser dividida em fragmentos mais pequenos apropriados. Assim, um oligómero que corresponde a uma molécula de ácido nucleico, ou a cada um dos fragmentos divididos, pode ser sintetizado (por exemplo, de 10-6015 nucleótidos ou qualquer gama ou valor nesse intervalo, tal como 10-100 nucleótidos). Tais oligonucleótidos sintéticos podem ser preparados, por exemplo, através de técnicas conhecidas (Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*, ou Sambrook, *infra*), ou através da utilização de um equipamento de síntese de ADN automatizado.

Uma sonda oligonucleotídica marcada pode ser obtida sinteticamente ou por clonagem. Se necessário, as extremidades 5' dos oligómeros podem ser fosforiladas utilizando a polinucleótido cinase T4. A utilização de cinases em cadeias simples antes do emparelhamento ou para a marcação pode ser conseguida utilizando um excesso de enzima. Se a utilização da cinase for para a marcação da sonda, o ATP pode conter radioisótopos com elevada actividade específica. Depois, o oligómero de ADN pode ser submetido a emparelhamento e ligação com a ligase T4 ou semelhantes.

Uma Sonda de Ácido Nucleico para a Detecção Específica de PCS do SNP Noutra realização, a presente invenção refere-se a uma sonda de ácido nucleico de 15-6000 nucleótidos para a detecção específica da presença de PCS do SNP numa amostra que compreende as moléculas de ácido nucleico acima descritas ou pelo menos um fragmento destas que se liga sob condições restritivas a um ácido nucleico que codifica para pelo menos uma PCS do SNP.

A sonda do ácido nucleico pode ser utilizada para o rastreio numa biblioteca apropriada de ADN cromossómico ou de cADN através de passos de métodos de hibridação conhecidos de modo a obter uma molécula de ácido nucleico que codifique para a PCS do SNP da invenção. Uma biblioteca de ADN cromossómico ou de cADN pode ser preparada a partir de células apropriadas de acordo com métodos reconhecidos na técnica (ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*).

Em alternativa, leva-se a cabo síntese química orgânica de modo a obter sondas de ácido nucleico com sequências nucleotídicas que correspondem a porções adequadas da sequência de aminoácidos da PCS do SNP. Assim, as sondas de ácido nucleico sintetizadas podem ser utilizadas como iniciadores nos passos de métodos de amplificação de ácidos nucleicos.

A invenção pode assim proporcionar métodos para a amplificação de ADN ou de ARN utilizando iniciadores nucleotídicos reticulados estáveis ao calor, que se reticulam aos iniciadores da invenção para originar ácido nucleico que codifica para PCSs do SNP de acordo com a invenção.

São bem conhecidos na técnica métodos para a amplificação de ARN ou ADN e podem ser utilizados de acordo com a invenção sem experimentação desnecessária, com base nos ensinamentos e nas metodologias aqui apresentadas. De acordo com a invenção, a utilização de ácidos nucleicos que codificam para porções dos PCSs do SNP de acordo com a invenção, tais como iniciadores de amplificação, permite vantagens em relação a iniciadores de amplificação conhecidos, devido ao aumento da sensibilidade, selectividade e/ou velocidade de amplificação.

Métodos conhecidos de amplificação de ADN ou de ARN incluem, mas não se limitam a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e processos de amplificação relacionados (ver, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, de Mullis et al.; 4,795,699 e 4,921,794 de Tabor et al.; 5,142,033 de Innis; 5,122,464 de Wilson et al.; 5,091,310 de Innis; 5,066,584 de Gyllensten et al.; 4,889,818 de Gelfand et al.; 4,994,370 de Silver et al.; 4,766,067 de Biswas; 4,656,134 de Ringold; 5,340,728 de Grosz et al.; 5,322,770 de Gelfand et al.; 5,338,671 de Scalice et al.; PCT WO 92/06200 de Cetus Corp.; PCT WO 94/14978 de Strack et al., cujas revelações são aqui inteiramente incorporadas por referência) e amplificação mediada por ARN a qual utiliza ARN antisense relativamente à sequência-alvo como um molde para a síntese de ADN de cadeia dupla (Patente U.S. No. 5,130,238 de Malek et al., com a designação comercial NASBA), sendo o conteúdo total destas patentes aqui inteiramente incorporadas por referência. Revisões da técnica de PCR são apresentadas por Mullis (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273 (1986)); Saiki et al. (Bio/Technology 3: 1008-1012 (1985)); e Mullis et al (Meth. Enzymol. 155: 335-350 (1987)). Um perito

na técnica pode facilmente desenhar tais sondas com base na sequência aqui apresentada utilizando métodos tais como programas informáticos de alinhamento e análise de sequências conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*.

As sondas de hibridação da invenção podem ser marcadas por técnicas convencionais de marcação tais como com uma marcação radioactiva, enzimática, fluorescente, de biotina-avidina, quimioluminescente, e qualquer outra marcação adequada. Após a hibridação, as sondas podem ser visualizadas utilizando métodos conhecidos. As sondas de ácidos nucleicos da invenção incluem sondas de ARN, assim como de ADN, tais como sondas geradas utilizando metodologias conhecidas na técnica (Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*). Numa realização do método acima descrito, uma sonda de ácido nucleico é immobilizada num suporte sólido. Exemplos de tais suportes sólidos incluem, mas não se limitam a, plásticos tais como policarbonato, hidratos de carbono complexos tais como agarose e SEPHAROSE, e resinas acrílicas, tais como esferas de poliacrilamida e de látex. As técnicas para o acoplamento de sondas de ADN a tais suportes sólidos são bem conhecidas na técnica (Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*).

As amostras de teste adequadas para métodos de utilização de sondas de ácidos nucleicos da invenção incluem, por exemplo, células ou extractos de ácidos nucleicos de células, ou fluidos biológicos. A amostra utilizada nos métodos acima descritos irá variar com base no formato do teste, no método de detecção e na natureza dos tecidos, células ou extractos a serem testados. Os métodos para a preparação de extractos de

ácidos nucleicos de células são bem conhecidos na técnica e podem ser facilmente adaptados de modo a obter uma amostra que seja compatível com o método utilizado.

Métodos para a Detecção da Presença de um Ácido Nucleico que Codifica para um PCS do SNP numa Amostra Biológica. Noutra realização, a presente invenção refere-se a métodos para a detecção da presença de ácido nucleico que codifica para um PCS do SNP numa amostra. Tais métodos podem compreender (a) colocar em contacto a amostra com a sonda de ácido nucleico acima descrita, em condições tais que ocorra hibridação, e (b) detectar a presença de uma sonda marcada ligada ao ácido nucleico de PCS do SNP. Um perito na técnica pode seleccionar uma sonda de ácido nucleico marcada adequada de acordo com metodologias conhecidas na técnica, tais como descritas acima. As amostras a serem testadas incluem, mas não se limitam a, amostras de ARN de tecido de mamífero.

Verificou-se que o PCS do SNP era expresso em nervos periféricos e nas células de gânglios das raízes dorsais. Deste modo, podem usar-se sondas do PCS do SNP para detectar a presença de ARN de células NP em tal tipo de amostra biológica. Além disso, a identificação de níveis de expressão alterados do ARN de PCS do SNP num indivíduo, em comparação com os níveis normais, pode indicar a presença de doença. As sondas de PCS do SNP podem ainda ser utilizadas para testar actividade celular em geral e especificamente em tecidos do sistema nervoso periférico.

Um Kit para a Detecção da Presença de PCS do SNP numa Amostra. Também se descreve um kit para a detecção da presença de PCS do SNP numa amostra compreendendo pelo menos um recipiente contendo a sonda de ácido nucleico acima mencionadas. O kit

pode ainda compreender outros recipientes contendo um ou mais dos seguintes: reagentes de lavagem e reagentes capazes de detectar a presença de uma sonda de ácido nucleico de ligação. Exemplos de reagentes de detecção incluem, mas não se limitam, a sondas marcadas radioativamente, sondas marcadas enzimaticamente (peroxidase de rábano, fosfatase alcalina), e sondas de afinidade (biotina, avidina, ou estreptavidina) (Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*).

Um *kit* com compartimentos inclui qualquer *kit* no qual os reagentes são contidos em recipientes separados. Tais recipientes incluem pequenos recipientes de vidro, recipientes de plástico ou tiras de plástico ou papel. Tais recipientes permitem a transferência eficiente de reagentes de um compartimento para outro compartimento de tal modo que as amostras e reagentes não sofram de contaminação cruzada e os agentes ou soluções de cada recipiente podem ser adicionados de um modo quantitativo de um compartimento para outro. Tais recipientes incluirão um recipiente que aceitará a amostra a testar, um recipiente que contém a sonda ou os iniciadores utilizados no teste, recipientes que contêm reagentes de lavagem (tais como tampão fosfato salino, tampões TRIS, e semelhantes), e recipientes que contêm os reagentes utilizados para detectar a sonda hibridada, o anticorpo ligado, o produto amplificado, ou semelhantes.

O perito na técnica reconhecerá facilmente que as sondas de ácidos nucleicos descritas na invenção podem ser facilmente incorporadas num dos formatos de *kit* estabelecidos que são bem conhecidos na técnica.

Construções de ADN Compreendendo uma Molécula de Ácido Nucleico PCS do SNP e Hospedeiros Contendo estas Construções.

Uma sequência de ácido nucleico que codifica para um PCS do SNP da invenção pode ser recombinada com um vector de ADN de acordo com técnicas convencionais, incluindo extremidades lisas ou coesivas para ligação, digestão com enzimas de restrição para proporcionar as extremidades apropriadas, preenchendo as extremidades coesivas como apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar junções indesejáveis, e ligação com ligases apropriadas. São apresentadas técnicas para tais manipulações, por exemplo, por Ausubel *et al.*, *infra*, e são bem conhecidas na técnica.

Uma molécula de ácido nucleico, tal como ADN, é dita ser "capaz de expressar" um polipéptido se contém sequências nucleotídicas que contenham informação de regulação para a transcrição e a tradução e tais se sequências estão "operavelmente ligadas" a sequências nucleotídicas que codificam para o polipéptido. Uma ligação operável é uma ligação na qual as sequências de ADN de regulação e a sequência de ADN que se pretende expressar estão ligadas de tal modo a permitir a expressão genética na forma de PCSs do SNP ou fragmentos Ab em quantidades recuperáveis. A natureza precisa das regiões reguladoras necessárias para a expressão genética pode variar de organismo para organismo, tal como é bem conhecido em técnica análoga. Ver, por exemplo, Sambrook, *infra* e Ausubel *infra*.

A invenção deste modo engloba a expressão de um PCS do SNP, quer em células procarióticas, quer em células eucarióticas, apesar de ser preferida a expressão eucariótica.

Os hospedeiros preferidos são hospedeiros bacterianos ou eucarióticos, incluindo células de bactérias, leveduras, insectos, fungos, aves e de mamíferos quer *in vivo*, ou *in situ*, ou células hospedeiras de mamífero, insectos, aves ou de leveduras. Prefere-se que a célula ou tecido de mamífero seja de origem humana, de primata, hamster, coelho, roedor, vaca, porcos, ovelhas, cavalos, cabras, cães ou de gatos, mas pode ser utilizada qualquer outra célula de mamífero.

Os hospedeiros eucarióticos podem incluir células de leveduras, insectos, fungos e de mamífero quer *in vivo*, ou numa cultura de tecidos. Os hospedeiros eucarióticos preferidos podem também incluir, mas não se limitam a células de insecto, células de mamífero quer *in vivo*, ou em cultura de tecidos. As células de mamífero preferidas incluem ovócitos de *Xenopus*, células HeLa, células de origem fibroblástica tais como células VERO ou CHO-K1, ou células de origem linfóide e os seus derivados.

As células de mamífero proporcionam modificações pós-tradução às moléculas de proteína incluindo o enrolamento correcto ou a glicosilação nos locais correctos. As células de mamífero que podem ser úteis como hospedeiros incluem células de origem fibroblástica, tais como, mas sem limitação, NIH 3T3, VERO ou CHO, ou células de origem linfóide, tais como, mas sem limitação, ao hibridoma SP2/OAg14 ou um mieloma murino P3-X63Ag8, linhas celulares de hamster (por exemplo, CHO-K1 e progenitoras, por exemplo, CHO-DUXB11) e os seus derivados. Um tipo preferido de células de mamíferos são células que se pretende substituírem a função das células geneticamente deficientes *in vivo*. Células derivadas de neurónios são preferidas para a terapia génica de distúrbios do sistema

nervoso. Para uma célula hospedeira de mamífero, estão disponíveis diversos sistemas de vectores para a expressão de pelo menos um PCS do SNP. Pode ser utilizada uma grande variedade de sequências de regulação da transcrição e da tradução, dependendo da natureza do hospedeiro. Os sinais de regulação da transcrição e da tradução podem ser derivados de fontes virais, tais como, mas sem limitação, adenovírus, vírus do papiloma bovino, vírus Símio, ou semelhantes, nos quais os sinais de regulação estão associados a um gene particular que tem um nível de expressão muito elevado. Alternativamente, promotores de produtos de expressão de mamíferos, tais como, mas não limitados a, actina, colagénio, miosina, produção de proteína. Ver, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*.

Quando se pretende utilizar insectos vivos, os hospedeiros presentemente preferidos para a produção em larga escala de PCS do SNP de acordo com a invenção são os vectores baculovirais e bichos-da-seda. A produção de PCSs do SNP em insectos pode ser conseguida, por exemplo, através da infecção do hospedeiro insecto com um baculovírus modificado para expressar pelo menos um PCS do SNP através de métodos conhecidos pelos peritos nas técnicas relacionadas. Ver Ausubel et al, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, §§ 16.8-16.11 (1987, 1992, 1993, 1994).

Numa realização preferida, a sequência nucleotídica introduzida será incorporada num plasmídeo ou vector viral capaz de replicação autónoma no hospedeiro receptor. Qualquer de uma grande variedade de vectores pode ser utilizado para este efeito. Ver, por exemplo, Ausubel et al., *infra*, §§ 1.5, 1.10, 7.1, 7.3, 8.1, 9.6, 9.7, 13.4, 16.2, 16.6, e 16.8-

16.11. Factores de importância quando se selecciona um plasmídeo ou vector viral particular incluem: a facilidade com que as células receptoras que contêm o vector podem ser reconhecidas e seleccionadas daquelas células receptoras que não contêm o vector; o número de cópias do vector que se deseja num hospedeiro particular; e se é desejável ser capaz o vector "viajar" entre células hospedeiras de diferentes espécies.

Células hospedeiras diferentes têm características e mecanismos específicos para o processamento e a modificação na tradução e na pós-tradução (por exemplo, glicosilação, clivagem) de proteínas. Podem ser escolhidos sistemas hospedeiros ou linhas celulares para assegurar a modificação desejada e o processamento da proteína estranha expressa. Por exemplo, a expressão num sistema bacteriano pode ser usada para produzir um produto proteico central não glicosilado. A expressão em levedura produzirá um produto glicosilado. A expressão em células de mamífero pode ser utilizada para assegurar a glicosilação "nativa" da proteína PCS do SNP. Além disso, diferentes sistemas de expressão vector/hospedeiro podem conduzir a reacções de processamento tais como clivagens proteolíticas em graus diferentes.

Tal como discutido acima, a expressão de PCS do SNP em hospedeiros eucarióticos requer a utilização de regiões de regulação eucarióticas. Tais regiões incluirão, em geral, uma região promotora suficiente para comandar a iniciação da síntese de ARN. Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*; Sambrook, *infra*.

Uma vez preparado para expressão o vector ou molécula de ácido nucleico contendo as construções, as construções de ADN podem ser introduzidas numa célula hospedeira apropriada por qualquer um de uma variedade de métodos adequados, por exemplo, transformação, transfecção, conjugação, fusão de protoplastos, electroporação, tecnologia de bombardeamento com microprojecteis, precipitação com fosfato de cálcio, microinjecção directa, e semelhantes. Após a introdução do vector, as células receptoras são crescidas num meio selectivo, que selecciona para o crescimento de células contendo o vector. A expressão da(s) molécula(s) do gene clonado resulta na produção de pelo menos um PCS do SNP. Tal pode ter lugar nas células transformadas como tal, ou após a indução destas células para diferenciar (por exemplo, através da administração de bromodesoxiuracilo a células de neuroblastoma ou semelhantes).

Isolamento de PCS do SNP. As proteínas ou fragmentos de PCS do SNP desta invenção podem ser obtidos por expressão de ADN recombinante tal como descrito acima. Alternativamente, um PCS do SNP pode ser purificado de material biológico. Se desejado, o pelo menos um PCS do SNP expresso pode ser isolado ou purificado de acordo com passos de metodologias convencionais, tais como extracção, precipitação, cromatografia, cromatografia de afinidade, electroforese, ou semelhantes. Por exemplo, as células que expressam pelo menos um PCS do SNP em níveis adequados podem ser recolhidas por centrifugação, ou com tampões adequados, lisadas, e a proteína isolada por cromatografia em coluna, por exemplo, em DEAE-celulose, fosfocelulose, ácido polirribocitidílico-agarose, hidroxapatite ou por electroforese ou imunoprecipitação. Alternativamente, os PCSs do SNP podem ser

isolados através da utilização de anticorpos específicos tais como, mas não limitados, a um PCS do SNP ou anticorpo CS. Tais anticorpos podem ser obtidos por passos de metodologias conhecidas (ver, por exemplo, Colligan, *infra*; Ausubel, *infra*).

Para os efeitos da invenção, um método de purificação que é ilustrativos, sem ser limitante, consiste nos seguintes passos. Um primeiro passo na purificação de um PCS do SNP inclui a extracção da fracção do PCS do SNP de uma amostra biológica, tal com um tecido de nervo periférico ou de gânglio de raiz dorsal (DRG), em tampões, com ou sem agentes de solubilização tais como ureia, ácido fórmico, detergente, ou tiocianato. Um segundo passo inclui sujeitar o material solubilizado a cromatografia de permuta iónica em colunas Mono-Q ou Mono-S (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc; Piscataway, NJ). Do mesmo modo, o material solubilizado pode ser separado por qualquer outro processo no qual as moléculas podem ser separadas de acordo com, por exemplo, densidade de carga, distribuição de carga e peso molecular. A eluição do PCS do SNP da resina de permuta iónica é monitorizada através de um teste imunológico, tal com M-IRMA, em cada fracção. Os picos de imunorreacção seriam então submetidos a diálise, liofilização, e a cromatografia de exclusão molecular ou de filtração em gel. Num terceiro passo, a cromatografia de exclusão molecular ou de filtração em gel é um tipo de cromatografia de partição na qual a separação se baseia no tamanho molecular. São normalmente utilizados geles de dextrano, poli-acrilamida e agarose para este tipo de separação. Um gel útil para a invenção é SEPHAROSE 12 (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.). No entanto, podem ser utilizados outros métodos, conhecidos pelos peritos na

técnica, para separar eficazmente moléculas com base no tamanho. Um quarto passo no protocolo de purificação para um PCS do SNP pode incluir a análise dos picos com imunorreacção com electroforese em gel de dodecil-sulfato/poliacrilamida (SDS-PAGE), ainda outro passo de purificação por cromatografia em gel, e coloração, tal com, por exemplo, com prata. Um quinto passo num método de purificação pode incluir sujeitar o PCS do SNP obtido após SDS-PAGE a cromatografia por afinidade, ou qualquer outro procedimento baseado na afinidade entre uma substância a ser isolada e uma molécula à qual se pode ligar especificamente. Para a purificação suplementar do PCS do SNP, pode-se utilizar cromatografia de afinidade em SEPHAROSE conjugada com anticorpos monoclonais anti-PCS do SNP (anticorpos monoclonais gerados contra PCS do SNP substancialmente puro). São úteis métodos alternativos, tais como HPLC de fase reversa, ou qualquer outro método caracterizado pela separação rápida com boa resolução de picos.

Será reconhecido que outros passos de purificação podem ser substituídos pelo método preferido descrito acima. Os peritos na técnica serão capazes de desenhar esquemas de purificação alternativos sem experimentação desnecessária.

Um Anticorpo com Afinidade de Ligação a um Péptido PCS do SNP e um Hibridoma Contendo o Anticorpo. Noutra realização, a invenção refere-se a um anticorpo com afinidade de ligação específica a um péptido PCS do SNP tal como descrito acima ou de um seu fragmento. Aqueles que se ligam selectivamente ao PCS do SNP seriam escolhidos para utilização em métodos que incluiriam, mas que sem limitação, a análise da expressão alterada de PCS do SNP em tecidos contendo PCS do SNP.

As proteínas PCS do SNP da invenção podem ser utilizadas em diversos procedimentos e métodos, tais como para a geração de anticorpos, para utilização na identificação de composições farmacêuticas, e para o estudo de interações ADN/proteína.

O péptido PCS do SNP da invenção pode ser utilizado para produzir anticorpos ou hibridomas. Um perito na técnica reconhecerá que se um anticorpo for desejado, tal péptido seria gerado tal como aqui descrito e utilizado como um imunogénio.

Os anticorpos da invenção incluem anticorpos monoclonais e policlonais, assim como fragmentos destes anticorpos. A invenção inclui ainda anticorpos de cadeia simples. Os fragmentos de anticorpos que contêm o idiótipo da molécula podem ser gerados através de técnicas conhecidas.

O termo "anticorpo" pretende incluir anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (mAbs), anticorpos quiméricos, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) e anticorpos que podem ser marcados na forma solúvel ou ligada, assim como fragmentos destes obtidos por qualquer técnica conhecida, tais como, mas sem limitação a clivagem enzimática, a síntese de péptidos ou técnicas recombinantes. Anticorpos policlonais são populações heterogéneas de moléculas de anticorpos derivadas de soro de animais imunizados com um antigénio. Um anticorpo monoclonal contém uma população substancialmente homogénea de anticorpos específicos a antigénios, cuja população contém locais de ligação a epitópos substancialmente semelhantes. Os MAb's podem ser obtidos por métodos conhecidos pelos peritos na técnica. Ver, por

exemplo, Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Patente U.S. No. 4,376,110; Ausubel et al, eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); e Harlow e Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), sendo os conteúdos destas referências aqui inteiramente incorporados por referência. Tais anticorpos podem ser de qualquer classe de imunoglobulina incluindo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD e de qualquer subclasse destas. Um hibridoma que produza um anticorpo da invenção pode ser cultivado *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. A produção de elevados teores de mAbs *in vivo* ou *in situ* torna este o método de produção presentemente preferido.

Anticorpos quiméricos são moléculas com diferentes porções que são derivadas de diferentes espécies animais, tais como aqueles com uma região variável derivada de um mAb murino e uma região de imunoglobulina humana constante, os quais são principalmente utilizados para reduzir a imunogenicidade na aplicação e aumentar os rendimentos na produção, por exemplo, quando os mAbs murinos têm rendimentos superiores aos rendimentos de hibridomas mas com maior imunogenicidade em humanos, de tal modo que são usados mAbs quiméricos humano/murino. Anticorpos quiméricos e os métodos para a sua produção são conhecidos na técnica (Cabilly et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., Pedido de Patente Europeia 125023; Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., Pedido de Patente Europeia 171

496; Morrison et al., Pedido de Patente Europeia 173 494; Neuberger et al., Pedido de Patente PCT WO 86/01533; Kudo et al., Pedido de Patente Europeia 184 187; Morrison et al., Pedido de Patente Europeia 173 494; Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., Publicação de Patente Internacional No. PCT/US86/02269; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988); e Harlow, *infra*. Estas referências são aqui inteiramente incorporadas por referência.

Um anticorpo anti-idiotípico (anti-Id) é um anticorpo que reconhece determinantes únicos geralmente associados com o local de ligação ao antigénio de um anticorpo. Um anticorpo Id pode ser preparado através da imunização de um animal da mesma espécie e tipo genético (por exemplo, estirpe de rato) como fonte do mAd que o mAb para o qual está a ser preparado um anti-Id. O animal imunizado reconhecerá e responderá aos determinantes idiotípicos do anticorpo de imunização através da produção de um anticorpo para estes determinantes idiotípicos (o anticorpo anti-Id). Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 4,699,880, que é aqui inteiramente incorporada por referência.

O anticorpo anti-Id pode também ser utilizado como um "imunogénio" para induzir ma resposta imunitária ainda noutro animal, produzindo um denominado anticorpo anti-anti-Id. O anti-anti-Id pode ter os mesmos epitopos que o mAb original que induziu o anti-Id. Assim, através da utilização de anticorpos para os determinantes idiotípicos de um mAB, é

possível identificar outros clones que expressam anticorpos de especificidade idêntica.

Deste modo, mAbs gerados contra um PCS do SNP da invenção podem ser utilizados para induzir anticorpos anti-Id em animais adequados, tais como ratinhos BALB/c. Células de baço de tais ratinhos imunizados são utilizadas para produzir hibridomas anti-Id que secretam mAbs anti-Id. Além disso, os mAbs anti-Id podem ser ligados a um veículo tal como hemocianina da lapa (KLH) e utilizados para imunizar ratinhos BALB/c adicionais. O soro destes ratinhos irá conter anticorpos anti-anti-Id que têm as propriedades de ligação do mAb origina específico para um epitopo específico de PCS do SNP. Os mAbs anti-Id têm assim os seus próprios epitopos idiotípicos, ou "idiotopos" estruturalmente semelhantes ao epitopo em avaliação.

O termo "anticorpo" também pretende incluir tanto moléculas intactas como fragmentos destas, tais como, por exemplo, Fab e $F(ab')_2$ que são capazes de se ligar ao antigénio. Os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ não têm o fragmento Fc do anticorpo intacto, são mais rapidamente removidos da circulação, e podem apresentar uma ligação aos tecidos menos específica do que um anticorpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Será reconhecido que Fab e $F(ab')_2$ e outros fragmentos dos anticorpos úteis na invenção podem ser utilizados para a detecção e/ou quantificação de um PCS do SNP de acordo com os métodos aqui apresentados para moléculas de anticorpo intactas. Tais fragmentos são tipicamente produzidos por clivagem proteolítica, utilizando enzimas tais como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$). Um anticorpo é dito como sendo

"capaz de se ligar" a uma molécula se for capaz de reagir especificamente com a molécula para assim ligar a molécula ao anticorpo. O termo "epitopo" pretende referir-se à porção de qualquer molécula capaz de ser ligada por um anticorpo que pode também ser reconhecida pelo anticorpo. Epitopos ou "determinantes antigénicos" geralmente consistem em grupos de superfície quimicamente activos de moléculas tais como cadeias laterais de aminoácidos ou de açúcares e têm características tridimensionais estruturais específicas assim como características de carga específicas.

Um "antigénio" é uma molécula ou uma porção de uma molécula capaz de se ser ligada por um anticorpo que é adicionalmente capaz de induzir um animal a produzir um anticorpo capaz de se ligar a um epitopo de tal antigénio. Um antigénio pode ter um ou mais epitopos. A reacção específica referida acima pretende indicar que o antigénio reagirá, de um modo altamente selectivo, com o seu anticorpo correspondente e não com o sem-número de outros anticorpos que podem ser evocados por outros antigénios.

Testes imunológicos. Os anticorpos da invenção, dirigidos contra um PCS do SNP, podem ser utilizados para detectar ou diagnosticar um CS do SNP ou patologias relacionadas com CS do SNP. São proporcionados pela invenção métodos de rastreio que podem incluir, por exemplo, testes imunológicos utilizando metodologias de testes rádio-imunológicos (RIA) ou testes de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), com base na produção de anticorpos específicos (monoclonais ou policlonais) para um PCS do SNP. Para estes testes, obtêm-se amostras biológicas através de biopsia de nervos, ou amostragem de outros tecidos do sistema nervoso periférico.

Por exemplo, numa forma de RIA, a substância a ser testada é misturada com anti-soro diluído na presença de um antigénio marcado radioactivamente. Neste método, a concentração da substância a ser testada será inversamente proporcional à quantidade do antigénio marcado ligado ao anticorpo específico e directamente relacionada com a quantidade de antigénio marcado livre. Outros métodos de rastreio adequados serão facilmente aparentes aos peritos na técnica.

Além disso, um perito na técnica pode facilmente adaptar procedimentos disponíveis actualmente, assim como as técnicas, métodos e kits apresentados acima relativamente a anticorpos, para gerar péptidos capazes de se ligarem a uma única sequência peptídica para gerar péptidos anti-péptido racionalmente desenhados, por exemplo ver Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", In: Synthetic Peptides, A User's Guide, W.H. Freeman, NY, pp. 289-307 (1992), e Kaspczek et al., Biochemistry 28: 9230-8 (1989).

Uma realização para levar a cabo o teste diagnóstico da invenção numa amostra biológica contendo um PCS do SNP, compreende:

- (a) contactar um anticorpo específico para um PCS do SNP marcado de forma detectável com um suporte sólido para conseguir a imobilização do referido anticorpo específico para um PCS do SNP ou de um seu fragmento.
- (b) contactar a amostra que se suspeite conter um PCS do SNP com o referido suporte sólido;
- (c) incubar o referido anticorpo específico para um PCS do SNP marcado de forma detectável com o referido suporte

durante um tempo suficiente para permitir a ligação do anticorpo específico para um PCS do SNP immobilizado ao PCS do SNP;

(d) separar o suporte de fase sólida da mistura de incubação obtida no passo (c); e

(e) detectar a marcação ligada e deste modo detectar e quantificar o PCS do SNP.

As concentrações específicas do anticorpo marcado de forma detectável e de PCS do SNP, a temperatura e o tempo de incubação, assim como outras condições de teste podem ser variadas, dependendo em vários factores, incluindo a concentração de uma PCS do SNP na amostra, a natureza da amostra, e semelhantes. A actividade de ligação de um dado lote de um anticorpo anti-PCS do SNP pode ser determinado de acordo com métodos bem conhecidos. Os peritos na técnica serão capazes de determinar condições de operação e óptimas para cada determinação utilizando experimentação de rotina. Outros tais passos como lavagem, agitação, filtração e outros semelhantes podem ser adicionados aos testes tal como normalmente ou necessário para a situação particular.

A detecção pode ser levada a cabo utilizando uma variedade de testes. Por exemplo, através da marcação radioactiva dos anticorpos específicos para PCS do SNP ou de fragmentos de anticorpos, é possível detectar o PCS do SNP através da utilização de testes radioimunológicos. Uma boa descrição de um teste radioimunológico pode ser encontrada em Colligan, *infra*, e Ausubel, *infra*, aqui inteiramente incorporados por referência. Preferentemente, a detecção das células que expressam um PCS do SNP pode ser conseguida através de técnicas de imagiologia *in vivo*, nas quais os anticorpos

marcados (ou os seus fragmentos) são proporcionados a um indivíduo, e a presença de PCS do SNP é detectada sem a remoção prévia de qualquer amostra de tecido. Tais procedimentos de detecção *in vivo* têm a vantagem de ser menos invasivos do que outros métodos de detecção, e são, além disso, capazes de detectar a presença de PCS do SNP em tecidos que não são facilmente removidos do paciente, tais como tecido do cérebro.

Existem muitas marcações e métodos de marcação *in vivo* diferentes conhecidos daqueles competentes na técnica. Exemplos de tipos de marcações que podem ser utilizados na invenção incluem isótopos radioactivos e isótopos paramagnéticos. Aqueles competentes na técnica conhecerão outras marcações adequadas para a ligação aos anticorpos utilizados na invenção ou serão capazes de as reconhecer, utilizando experimentação de rotina. Além disso, a ligação destas marcações aos anticorpos pode ser levada a cabo utilizando técnicas convencionais conhecidas daqueles competentes na técnica.

Para diagnóstico por imagiologia *in vivo*, o tipo de instrumento de detecção disponível é um factor principal para a selecção de um dado radionuclido. O radionuclido escolhido deve ter um tipo de decaimento que seja detectável para um dado tipo de instrumento. Em geral, qualquer método convencional para a visualização de imagiologia de diagnóstico pode ser utilizado de acordo com esta invenção. Por exemplo, podem ser utilizados para visualizar a imagiologia de diagnóstico detectores de tomografia de emissão de positrões (PET), gama, beta e imagiologia de ressonância magnética (MRI).

Os anticorpos úteis na invenção podem também ser marcados com isótopos paramagnéticos para efeitos de diagnóstico *in vivo*. Elementos que são particularmente úteis em Imagiologia de Ressonância magnética (MRI), incluindo ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , e ^{56}Fe .

Os anticorpos (ou seus fragmentos) da invenção são também particularmente adequados para utilização em testes imunológicos *in vitro*, para detectar a presença de um PCS do SNP em tecidos corporais, fluidos (tais como FCS), ou extractos celulares. Em tais testes imunológicos, os anticorpos (ou fragmentos de anticorpos) podem ser utilizados em fase líquida ou, preferentemente, ligados a um veículos de fase sólida, tal como descrito acima.

A detecção *in situ* pode ser conseguida através da remoção de uma amostra histológica de um paciente, e proporcionando a combinação de anticorpos marcados da invenção a esta amostra. O anticorpo (ou fragmento) é preferentemente proporcionado aplicando ou sobrepondo o anticorpo marcado (ou fragmento) a uma amostra biológica. Através da utilização de tal procedimento, é possível determinar não só a presença de um PCS do SNP, mas também a distribuição do PCS do SNP no tecido examinado. Utilizando a invenção, aqueles competentes na técnica facilmente se aperceberão que qualquer um de uma grande variedade de métodos histológicos (tais como procedimentos de coloração) pode ser modificado de modo a conseguir a referida detecção *in situ*.

Tal com aqui utilizado, uma quantidade eficaz de um reagente de diagnóstico (tal como um anticorpo ou um fragmento de

anticorpo) é uma quantidade capaz de conseguir a discriminação de diagnóstico desejada e irá variar dependendo de factores tais como a idade, o estado de saúde, o sexo, a progressão da doença do indivíduo, contra indicações, se existentes, e outras variáveis a serem ajustadas pelo médico. A quantidade de tais materiais que são tipicamente utilizados num teste de diagnóstico é geralmente entre 0,1 e 5 mg, e preferentemente entre 0,1, e 0,5 mg.

O teste da invenção é também idealmente adequado para a preparação de um *kit*. Tal *kit* pode compreender um veículo separado em compartimentos para receber em reclusão um ou mais recipientes tais como frascos, tubos e outros semelhantes, compreendendo cada um dos referidos recipientes os elementos separados do ensaio imunológico.

Por exemplo, pode existir um recipiente que contenha um primeiro anticorpo imobilizado num suporte de fase sólida, e ainda outro recipiente contendo um segundo anticorpo com marcação detectável em solução. Outro recipiente pode conter soluções padrão contendo diluições em série do PCS ao SNP a ser detectado. As soluções padrão de um PCS do SNP podem ser utilizadas para preparar uma curva padrão com a concentração do PCS ao SNP registada na abcissa e o sinal de detecção na ordenada. Os resultados obtidos de uma amostra contendo um PCS ao SNP podem ser interpolados de tal gráfico para resultar na concentração do PCS ao SNP.

Rastreio de Diagnóstico e Tratamento. Deve entender-se que apesar da seguinte discussão ser especificamente dirigida a pacientes humanos, os ensinamentos são também aplicáveis a qualquer animal que expresse pelo menos um CS do PNS. Os

métodos de diagnóstico e de rastreio aqui apresentados são especificamente úteis para um paciente do qual se suspeite ter o risco de desenvolver uma doença associada com um nível de expressão de PCS ao SNP alterado com base na história familiar, ou um paciente no qual se deseje diagnosticar uma doença relacionada com o PCS ao SNP.

De acordo com esta apresentação, o rastreio pré-sintomático de um indivíduo que necessite de tal rastreio é agora possível utilizando ADN que codifica para a proteína PCS ao SNP da invenção. O método de rastreio da invenção permite um diagnóstico pré-sintomático, incluindo um diagnóstico pré-natal, da presença de um gene CS ao SNP em falta ou aberrante em indivíduos, e assim uma opinião relativamente à probabilidade desse indivíduo desenvolver ou tenha desenvolvido uma doença associada a CS do SNP. Isto é especialmente valioso para a identificação de veículos de genes CS do SNP alterados ou em falta, por exemplo, de indivíduos com um historial familiar de uma patologia relacionada com CS do SNP. O diagnóstico precoce é também desejado de modo a maximizar a intervenção atempada apropriada.

Num exemplo preferido do método de rastreio, uma amostra de tecido seria tomada de tal indivíduo, e proceder-se-ia ao rastreio de (1) presença do gene PCS do SNP "normal"; (2) presença do mRNA do PCS do SNP e/ou (3) presença da proteína PCS ao SNP. O gene humano normal pode ser caracterizado com base, por exemplo, na detecção de padrões de digestão de restrição em ADN "normal" em comparação com aquele de pacientes, incluindo análise por RFLP, utilizando sondas de ADN preparadas contra a sequência de PCS do SNP (ou um seu

fragmento funcional) apresentada na invenção. De modo similar, o mRNA do PCS do SNP pode ser caracterizado e comparado aos (a) níveis e/ou (b) às dimensões do mRNA do PCS do SNP normal tal como encontrado numa população humana que não esteja em risco de desenvolver uma doença associada a PCS do SNP utilizando sondas semelhantes. Por último, a proteína PCS do SNP pode ser (a) detectada e/ou (b) quantificada utilizando um teste biológico para actividade PCS do SNP ou utilizando um teste imunológico e anticorpos PCS do SNP. Quando se testa uma proteína PCS do SNP, o teste imunológico é preferido pela sua rapidez. Um (1) padrão de dimensões de ADN de PCS do SNP aberrante, e/ou (2) dimensões ou níveis de mRNA do PCS do SNP aberrantes e/ou (3) níveis de proteína PCS do SNP aberrantes indicaria que o paciente está em risco de desenvolver uma doença associada a PCS do SNP.

Os métodos de rastreio e diagnóstico da invenção não necessitam que a totalidade da sequência de ADN que codifica para PCS do SNP seja utilizada para a sonda. Pelo contrário, é apenas necessário utilizar um fragmento ou uma dimensão de ácido nucleico que seja suficiente para detectar a presença do gene PCS do SNP numa preparação de ADN de um indivíduo normal ou afectado, a ausência de tal gene, ou uma propriedade física alterada de tal gene (tal como uma alteração no padrão de migração electroforética).

O diagnóstico pré-natal pode ser levado a cabo quando desejado, utilizando qualquer método conhecido para obter células fetais, incluindo amniocintese, amostragem das vilosidades coriônicas (CVS), e fetoscopia. A análise cromossómica pré-natal pode ser utilizada para determinar se

a porção do cromossoma que possui o gene PCS do SNP normal está presente num estado heterozigótico.

Visão Genérica dos Métodos de Purificação e Cristalização de PCS do SNP. Em geral, um PCS do SNP como uma proteína de membrana, é purificada em forma solúvel utilizando detergentes (por exemplo, octilglucósidos) ou outras moléculas anfifílicas adequadas. O PCS do SNP resultante está numa concentração e numa pureza insuficientes para cristalização. Isola-se então o PCS do SNP purificado e testa-se a actividade biológica e a ausência de agregação (que interfere com a cristalização). O PCS do SNP clivado e purificado preferentemente corre na forma de uma banda simples em electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições redutoras ou não redutoras (as condições não redutoras são utilizadas para avaliar a presença de pontes de cisteína). O PCS do SNP purificado é preferentemente cristalizado utilizando condições variantes de pelo menos um dos seguintes: pH, tipo de tampão, concentração de tampão, tipo de sal, tipo de polímero, concentração de polímero, outros ligandos que precipitam e concentração de PCS do SNP purificado e clivado por métodos conhecidos. Ver, por exemplo, Michel, Trends in Biochem. Sci. 8: 56-59 (1983); Deisenhofer et al. J. Mol. Biol. 180: 385-398 (1984); Weiss et al. FEBS Lett. 267: 268-272 (1990). Blundell, et al. Protein Crystallography Academic Press, Londres (1976); Oxender et al. eds., Protein Engineering Liss, Nova Iorque (1986); McPherson; The Preparation and Analysis of Protein Crystals Wiley, N.I. (1982); ou os métodos proporcionados num kit comercial, tal como CRYSTAL SCREEN (Hampton Research, Riverside, CA). A proteína cristalizada é também testada para pelo menos uma actividade de CS e cristais de dimensões e de

formas diferentes são ainda testados para adequação em difracção de raios-X. Geralmente, cristais de maiores dimensões permitem uma melhor cristalografia do que cristais de menores dimensões, e cristais mais largos permitem uma melhor cristalografia do que cristais mais finos. Ver, por exemplo, Blundell., *infra*; Oxender, *infra*; McPherson, *infra*; Wyckoff et al, eds., Diffraction Methods for Biological Macromolecules, Vols. 114-115: Methods in Enzymology, Orlando, FL Academic Press (1985).

Métodos de Cristalização de Proteínas. O método da gota suspensa é preferencialmente utilizado para cristalizar uma proteína PCS do SNP purificada solúvel. Ver, por exemplo, Taylor et al., J. Mol. Biol. 226: 1287-1290 (1992); Takimoto et al. (1992), *infra*; CRYSTAL SCREEN, Hampton Research. Uma mistura da proteína e do agente de precipitação pode incluir o seguinte: • pH (por exemplo, 4-10); • tipo de tampão (por exemplo, trometamina (TRIZMA), azida de sódio, fosfato, sódio ou cacodilato acetatos, imidazole, Tris, HCl, hepes de sódio); • concentração do tampão (por exemplo, 0,1-100 mM); • tipo de sal (por exemplo, azida de sódio, cloreto de cálcio, citrato de sódio, cloreto de magnésio, acetato de amónio, sulfato de amónio, fosfato de potássio, acetato de magnésio, acetato de zinco, acetato de cálcio); • tipo e concentração de polímero: (por exemplo, poletileno glicol (PEG) 1-50%, tipp 6000-10000); • outros ligandos que precipitam (sais: potássio, sódio, tartarato, sulfato de amónio, acetato de sódio, sulfato de lítio, formato de sódio, citrato de sódio, formato de magnésio, fosfato de sódio, fosfato de potássio; orgânicos: 2-propanol; não-voláteis: 2-metil-2,4-pentanodiol); e • concentração de PCS do SNP purificado (por exemplo, 0,1-100 mg/ml, com moléculas anfifílicas

(detergentes tais como octilglucósidos)). Ver, por exemplo, CRYSTAL SCREEN, Hampton Research.

As misturas acima são utilizadas e rastreadas através da variação de pelo menos um de pH, tipo de tampão, concentração de tampão, tipo de sal precipitante ou concentração, tipo de PEG, concentração de PEG e concentração da proteína clivada. Formam-se em 1-14 dias cristais na gama de dimensões de 0,1-1,5 mm. Estes cristais difractam raios-X até pelo menos uma resolução de 10 Å, tal como 1,5-10 Å, ou qualquer gama ou valor nesse intervalo, tal como, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5 ou 3, com 3,5 Å ou menos sendo preferidas para uma maior resolução. Além dos padrões de difracção com esta maior resolução, pode-se ainda utilizar uma resolução mais baixa, tal como 25-3,5 Å.

Cristais de Proteína. Os cristais aparecem após 1-14 dias e continuam a crescer em dias subsequentes. Alguns dos cristais são removidos, lavados e testados para actividade biológica, a qual é preferida para utilização em caracterizações adicionais. Outros cristais lavados são preferentemente corridos num gel corado e aqueles que migram na mesma posição que o PCS do SNP clivado purificado são preferentemente utilizados. Observam-se desde dois a cem cristais numa gota e podem ocorrer formas, tais como, mas sem limitação, bi-piramidal, rombóide, e cúbica. Espera-se que as análises de raios-X iniciais indiquem que tais cristais difractam a resolução moderadamente elevada a elevada. Quando são produzidos menos cristais numa gota, podem ter uma dimensão muito superior, por exemplo, 0,2-1,5 mm.

Métodos de Cristalografia de Raios-X de PCS do SNP. Os cristais assim produzidos para uma PCS do SNP são analisados utilizando uma fonte de raios-X adequada. Obtém-se um número de padrões de difracção adequado. Os cristais são preferentemente estáveis durante pelo menos 10 horas no raio de raios-X. São opcionalmente utilizados cristais congelados (por exemplo, -220 a -50°C) para exposições aos raios-X mais prolongadas (por exemplo, 4-72 horas), sendo os cristais relativamente mais estáveis aos raios-X no estado congelado. De modo a recolher o número máximo de reflexões úteis, são opcionalmente recolhidos múltiplos enquadramentos à medida que o cristal é rodado no raio de raios-X, por exemplo, durante 12-96 horas. São preferidos cristais de maiores dimensões (>0,2 mm), para aumentar a resolução da difracção de raios-X. Os cristais são preferentemente analisados utilizando uma fonte de raios-X de elevada energia de um sincrotrão. Utilizando cristais congelados, os dados de difracção de raios-X são recolhidos em cristais que difractam a uma resolução de 10-1,5 Å, sendo menores resoluções igualmente úteis, tais como 25-10 Å, suficiente para resolver a estrutura tridimensional de um PCS do SNP em detalhe considerável, tal como aqui apresentado.

Realizações Relativas a Meios Informáticos. Uma sequência de aminoácidos de um PCS do SNP e/ou dados de difracção de raios-X, úteis para a modelação computacional de um PCS do SNP ou de uma sua fracção, pode ser "proporcionada" numa variedade de meios para facilitar a sua utilização. Tal como aqui utilizado, proporcionado refere-se a uma manufactura, que contém uma sequência de aminoácidos de PCS do SNP e/ou dados de difracção de raios-X da presente invenção, por exemplo, a sequência de aminoácidos apresentada nas Figuras

1, 8, 10 ou 11, um seu fragmento representativo, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80-100% de identidade global a um fragmento de 5-2005 aminoácidos de uma sequência de aminoácidos das Figuras 11A-D ou de uma sua variante. Tal método proporciona a sequência de aminoácidos e/ou dados de difracção de raios-X numa forma que permite um perito na técnica analisar e realizar a modelação molecular da estrutura tridimensional de um PCS do SNP ou de um seu subdomínio.

Numa aplicação tal como aqui descrita, a sequência de aminoácidos de PCS do SNP, ou pelo menos de um seu subdomínio, e/ou os dados de difracção de raios-X tal como aqui descrito são registados num meio legível por computador. Tal como aqui utilizado, "meio legível por computador" refere-se a qualquer meio que possa ser lido e acedido directamente por um computador. Tal meio inclui, mas não se limita a: meios de armazenamento magnético, tal como disquetes, discos rígidos ou fitas magnéticas; meios de armazenamento óptico tais como discos ópticos ou CD-ROM; meios de armazenamento eléctrico, tais como RAM e ROM; e híbridos destas categorias tais como meios de armazenamento magnéticos/ópticos. Um perito na técnica facilmente apreciará como qualquer um dos presentemente meios de legíveis por computador conhecidos pode ser utilizado para criar uma manufactura compreendendo um meio legível por computador tendo nele registado uma sequência de aminoácidos e/ou dados de difracção de raios-X aqui apresentados.

Tal como aqui utilizado "registado" refere-se a um processo para o armazenamento de informação num meio legível por computador. Um perito na técnica pode facilmente adoptar

qualquer dos métodos presentemente conhecidos para registar informação em meio legível por computador para gerar manufacturas compreendendo informação de uma sequência de aminoácidos e/ou dados de difracção de raios-X aqui apresentados.

Está disponível ao perito na técnica uma variedade de estruturas de armazenamento para a criação de um meio de leitura em computador tendo gravado nesse meio uma sequência de aminoácidos e/ou dados de difracção de raios-X tal como aqui apresentado. A escolha da estrutura de armazenamento de dados será geralmente baseada nos meios escolhidos para aceder à informação armazenada. Além disso, uma variedade de programas de processamento de dados e de formatos pode ser utilizada para armazenar a informação de sequência e dos dados de raios-X aqui apresentada num meio legível por computador. A informação da sequência pode ser representada num ficheiro de texto de um processador de texto, formatado num programa informático comercialmente disponível tal como WordPerfect e Microsoft Word, ou representado na forma de um ficheiro ASCII, armazenado numa aplicação de base de dados, tal como DB2, Sybase, Oracle, ou semelhantes. Um perito na técnica pode facilmente adaptar qualquer número de formatos de estruturação de processador de dados (por exemplo, ficheiro de texto ou base de dados) de modo a obter um meio legível em computador tendo nele gravada a informação aqui apresentada.

Proporcionando a sequência PCS do SNP e/ou dados de difracção de raios-X num meio legível por computador, um perito na técnica pode aceder rotineiramente à sequência e aos dados de difracção de raios-X para modelar uma PCS do SNP, um seu

subdomínio, ou um seu ligando. Estão publicamente e comercialmente disponíveis algoritmos de computador que permitem a alguém competente na técnica aceder estes dados proporcionados num meio legível em computador e analisá-los para modelação molecular e/ou RDD.

Também são apresentados sistemas, particularmente sistemas baseados em computador, que contêm a sequência e/ou os dados de difracção aqui descritos. Tais sistemas são desenhados para realizar modelação molecular e RDD para um PCS do SNP ou pelo menos um seu subdomínio.

Tal como aqui utilizado, "um sistema baseado em computador" refere-se aos meios em equipamento, em meios de programas informáticos, e em meios de armazenamento de dados utilizados para analisar a sequência e/ou os dados de difracção de raios-X aqui apresentados. Os meios mínimos em equipamento do sistema baseado em computador aqui referido compreendem uma unidade de processamento central (CPU), meios de entrada de dados, meios de saída de dados, e meios de armazenamento de dados. Alguém competente na técnica pode facilmente apreciar qual dos sistemas baseados em computador actualmente disponíveis são adequados para a utilização aqui apresentada.

Como referido acima, os sistemas com base em computador aqui apresentados compreendem meios de armazenagem de dados tendo neles armazenados uma sequência de PCS do SNP ou de um seu fragmento e/ou dados de difracção de raios-X da presente invenção e os meios de equipamento necessários e meios de programa informático para suportar e implementar um meio de análise. Tal como aqui utilizado, "meio de armazenamento de dados" refere-se a memória que pode armazenar dados de

sequência ou de difracção de raios-X aqui apresentados ou um meio de acesso a memória que pode aceder manufacturas que tenham em si gravados os dados de sequência ou de raios-X aqui apresentados.

Tal como aqui utilizado, "meios de procura" ou "meios de análise" refere-se a um ou mais programas que são implementados no sistema com base em computador para comparar a sequência alvo ou o padrão estrutural alvo com a sequência ou dados de raios-X armazenados nos meios de armazenamento de dados. Os meios de procura são utilizados para identificar fragmentos ou regiões de um PCS do SNP que corresponda a uma sequência alvo ou padrão alvo particular. Estão apresentados publicamente diversos algoritmos conhecidos bem como diversos programas informáticos comercialmente disponíveis para conduzir meios de procuras e podem ser utilizados nos sistemas com base em computador aqui apresentados. Alguém competente na técnica pode facilmente reconhecer que qualquer um dos algoritmos ou pacotes de programas informáticos de implementação disponíveis para levar a cabo análises por computador podem ser adaptados para utilização nos presentes sistemas baseados em computador.

Tal como aqui utilizado, "um padrão estrutura alvo", ou "padrão alvo", refere-se a qualquer sequência ou combinação de sequências na qual as sequências são escolhidas com base numa configuração tridimensional ou mapa de densidade de electrões que se forma através do enrolamento do padrão alvo. Existe na técnica uma variedade de padrões alvo conhecidos. Os padrões alvo de proteínas incluem, mas não se limitam a, centros activos enzimáticos, subdomínios estruturais, epitopos, domínios funcionais e sequências de sinal. Podem

ser utilizados diversos formatos estruturais para os meios de entrada e de saída para receber e enviar a informação nos sistemas baseados em computador aqui apresentados.

Pode-se utilizar uma variedade de meios de comparação para comparar a sequência alvo ou o padrão alvo com os meios de armazenamento de dados para identificar padrões estruturais de mapas de densidade de electrões. Aqueles peritos na técnica podem facilmente reconhecer que qualquer um dos programas de modelação computadorizada publicamente disponíveis pode ser utilizado como meio de procura para os sistemas baseados em computador aqui apresentados.

Uma aplicação aqui apresentada encontra-se na Figura 12. A Figura 12 apresenta um diagrama de blocos de um sistema de computador 102. O sistema de computador 102 inclui um processador 106 ligado a um "bus" 104. Também se encontram ligados ao "bus" 104 uma memória principal 108 (preferentemente implementada como uma memória de acesso aleatório, RAM) e uma variedade de memórias de armazenamento secundário 110, tais como um disco rígido 112 e um meio de armazenamento amovível 114. O dispositivo de meio de armazenamento amovível 114 representa, por exemplo, uma unidade de disquete, uma unidade de CD-ROM, uma unidade de fita magnética, etc. Um meio de armazenamento amovível 116 (tal como uma disquete, um CD-ROM, uma fita magnética, etc) contendo lógica de controlo e/ou dados nela gravados pode ser inserida na unidade de meio de armazenamento amovível 114. O sistema de computador 102 inclui um programa informático apropriado para ler a lógica de controlo e/ou os dados do dispositivo de meio de armazenamento amovível 114 uma vez inserido no dispositivo de meio de armazenamento amovível

114. Um monitor 120 pode ser utilizado ligado ao "bus" 104 para visualizar os dados de determinação de estrutura.

A sequência de aminoácidos, do ácido nucleico que para ela codifica ou qualquer outra sequência e/ou dados de difracção de raios-X aqui apresentados podem ser armazenados de um meio bem conhecido na memória principal 108, e qualquer um dos dispositivos secundários de armazenamento 110, e/ou um dispositivo de armazenamento amovível 115. O programa informático para aceder e processar a sequência de aminoácido e/ou os dados de difracção de raios-X (tal como ferramentas de procura, ferramentas de comparação, etc.) reside na memória principal 108 durante a execução.

Determinação da Estrutura Tridimensional. Um ou mais passos de modelação informática e/ou algoritmos de computador são utilizados para proporcionar um modelo molecular 3-D de uma PCS do SNP clivada, utilizando dados de sequência de aminoácidos das Figuras 1, 8, 10 ou 11 (ou suas variantes) e/ou dados de difracção de raios-X. Se apenas se utiliza a sequência de aminoácidos, pode-se então utilizar um programa de modelação adequado para a determinação da estrutura tridimensional, por exemplo, LINUS (Rose et. al. Proteins: Structure, Function and Genetics (Junho, 1995) e as referências aí citadas. Prefere-se que o PCS SNP não tenha resíduos ou resíduos Ala-substituídos (para superfície) em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran, e resulta num perfil 3D-1D positivo (Luthy et al., Nature 356: 83-85 (1992)), sugerindo que todos os resíduos se encontram em ambientes aceitáveis (Kraulis (1991), *infra*). Alternativamente, as regiões não permitidas podem ser corrigidas através da utilização de algoritmos adequados, tais

como o programa RAVE aqui descrito. A determinação de fase é opcionalmente utilizada para resolver a estrutura tridimensional de um PCS do SNP clivado. Esta estrutura pode então ser utilizada para RDD de moduladores do PCS do SNP neuraminidase, endotelina catepsina A ou outra actividade biológica, por exemplo, que é relevante para uma patologia relacionada com PCS do SNP.

Modificação de Densidade e Interpretação do Mapa. Os mapas de densidade de electrões podem ser calculados utilizando programas tais como aqueles do pacote de informático CCP4 (SERC (UK) Collaborative Computing Project 4, Daresbury Laboratory, Reino Unido, 1979). Podem ainda ser utilizados ciclos de média dupla, tais como com o programa RAVE (Kleywegt & Jones, Bailey et al., eds., First Map to Final Model, SERC Daresbury Laboratory, Reino Unido, pp 59-66 (1994)) e expansão gradual do modelo. Para a visualização do mapa e construção do modelo pode ser utilizado um programa tal como "O" (Jones (1991), *infra*).

Refinamento e Validação do Modelo. Pode-se conseguir enrijecer o corpo da molécula e obter um refinamento posicional utilizando um programa tal como X-PLOR (Brünger (1992), *infra*), por exemplo, com os parâmetros estereoquímicos de Engh e Huber (Acta Cryst. A47: 392-400 (1991)). Se o modelo nesta fase nos mapas médios ainda tem falta de resíduos (por exemplo, pelo menos 5-10 por subunidade), alguns ou todos dos resíduos em falta podem ser incorporados no modelo durante ciclos adicionais de refinamento posicional e construção do modelo. O procedimento de refinamento pode iniciar-se utilizando dados de menor resolução (por exemplo, 25-10 Å a 10-3,0 Å e então gradualmente ampliado para incluir dados de

12-6 Å a 3,0-1,5 Å). Os valores β para átomos individuais podem ser refinados uma vez adicionados dados entre 2,9 e 1,5 Å. Subsequentemente podem ser gradualmente adicionadas águas. Um programa tal como ARP (Lamzin e Wilson, Acta Cryst. D49: 129-147 (1993)) pode ser utilizado para adicionar águas cristalográficas e como ferramenta para verificar áreas incorrectas no modelo. Programas tais como PROCHECK (Lackowski et al., J. Appl. Cryst. 26: 283-291 (1993)), WHATIF (Vriend, J. Mol. Graph. 8: 52-56 (1990)) e PROFILE 3D (Lüthy et al., Nature 356: 83-85 (1992)), assim como a análise geométrica gerada por X-PLOR podem ser utilizados para verificar a existência de erros na estrutura. Para o ciclo final de refinamento, 20-5% dos dados mais fracos podem ser rejeitados utilizando um limite de corte $IF_{obs}I/\sigma$ e um escalamento anisotrópico entre F_{obs} e F_{cate} aplicado após avaliação cuidada da qualidade e abrangência dos dados.

Análise Estrutural. Um programa tal como DSSP pode ser utilizado para atribuir elementos de estrutura secundária (Kabsch e Sander (1983), *infra*). Um programa tal como SUPPS (do pacote de computação cristalográfica BIOMOL) pode ser utilizado para algumas ou todas as superposições de mínimos quadrados de vários modelos e de partes de modelos. As superfícies acessíveis a solventes e os potenciais electrostáticos podem ser calculados utilizando tais programas como GRASP (Nicholls et al. (1991), *infra*).

Determinação da Estrutura. A estrutura de um PCS do SNP pode então ser resolvida com o procedimento de substituição molecular tal como utilizando X-PLOR (Brünger (1992), *infra*). Pode ser construído um modelo de procura parcial para o monómero utilizando uma proteína relacionada, tal como a

estrutura da carboxipeptidase sérica de trigo (Liao *et al.* (1992), *infra*). A função de rotação e de translação pode ser utilizada para resultar duas ou mais orientações e posições para duas subunidades para formar um dímero fisiológico tal como determinado com base nas suas interacções. Podem correr-se ciclos de média dupla da densidade utilizando o programa RAVE e a expansão do modelo pode ser utilizada para adicionar resíduos em falta para cada monómero, resultando num modelo com 95-99,9% do número total de resíduos. O modelo pode ser refinado num programa tal como X-PLOR (Nrünger (1992), *supra*), a um factor R cristalográfico adequado. Os dados do modelo são então gravados num meio legível por computador para utilização em análise suplementar, tal como desenho racional de fármacos.

Desenho Racional de Fármacos que Interagem com o PCS do SNP. A determinação da estrutura tridimensional de um PCS do SNP clivado, tal como aqui descrito, proporciona a base para o desenho de ligandos novos e específicos para o diagnóstico e/ou o tratamento de pelo menos uma patologia relacionada com o PCS do SNP. Podem ser tomadas várias abordagens para a utilização da estrutura cristalina de um PCS do SNP no desenho racional de ligandos desta proteína. É opcionalmente realizado um exame manual, assistido por computador, da estrutura do centro activo. A utilização de um programa informático tal como GRID (Goodford, *J. Med. Chem.* 28: 849-857 (1985)) um programa que determina locais de interacção prováveis entre sondas e vários grupos funcionais característicos e a superfície do enzima, serve para analisar o centro activo para determinar estruturas de compostos inibitórios. Os cálculos do programa, com grupos e moléculas inibidores adequados (por exemplo aminas primárias protonadas) como sonda, são utilizados para identificar **hotspots** potenciais na proximidade

de posições acessíveis a níveis de isoenergéticos adequados. São então testados ligandos adequados, tais como compostos ou composições inibidores ou estimuladores moduladores, para actividade de modulação de pelo menos um PCS do SNP.

Um ligando de modulação de PCS do SNP de diagnóstico ou terapêutico tal como aqui apresentado pode ser, mas não se limita a, pelo menos um seleccionado de um ácido nucleico, uma proteína, um elemento, um lípido, um anticorpo, um sacárido, um isótopo, um hidrato de carbono, um agente de imagiologia, uma lipoproteína, uma glicoproteína, um enzima, uma sonda detectável, e anticorpo ou fragmento destes, ou qualquer combinação destes, que pode ser marcado de forma detectável tal como para a marcação de anticorpos. Tais marcações incluem, mas não se limitam a, marcações enzimáticas, compostos ou elementos radioisotópicos ou radioactivos, compostos fluorescentes ou metais, compostos quimioluminescentes e compostos bioluminescentes. Alternativamente, pode ser utilizado qualquer outro agente de diagnóstico ou terapêutico conhecido.

Após se realizarem experiências preliminares para determinar o K_I do substrato com cada actividade enzimática de um PCS do SNP, é determinada a natureza dependente do tempo da modulação dos valores K_I do ligando (por exemplo, através do método de Henderson (Biochem. J. 127: 321-333 (1972))). Por exemplo, o substrato (ou controlo negativo onde apropriado) e o enzima são pré-incubados em tampão. As reacções são iniciadas através da adição de substrato. São recolhidas alíquotas ao longo de um período de tempo adequado e em cada uma a reacção é parada através da adição nas alíquotas de uma solução de paragem adequada (por exemplo hidróxido de sódio em etanol aquoso). A

concentração do produto é determinada, por exemplo, por fluorimetria, utilizando um espectrômetro. Os gráficos de fluorescência em relação ao tempo podem ser praticamente lineares ao longo o período do ensaio, e são utilizados para obter valores para a velocidade inicial na presença (V_i) ou ausência (V_0) de ligando. O erro está presente em ambos os eixos num gráfico de Henderson, tornando-o inapropriado para análise de regressão convencional (Lcatherbarrow. Trends Biochem. Sci. 15: 455-458 (1990)). Deste modo, os valores de K_I são obtidos a partir dos dados através do ajuste a uma versão modificada da equação de Henderson para inibição competitiva:

$$Q^2 + (K_1 - Q - I)Q - K_1I = 0$$

em que (utilizando a notação de Henderson (Biochem. J. 127: 321-333 (1972))):

$$Q = K_1 \left(\frac{A_1 + K_2}{K_2} \right) \text{ and } I = \frac{V_0}{V_i}$$

Esta equação é resolvida para a raiz positiva com a restrição que

$$Q = K_1(A_1 + K_2)/K_2$$

utilizando PROCNLIN de SAS (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA) que realiza regressão não linear utilizando técnicas dos mínimos quadrados. O método iterativo utilizado é opcionalmente o método da secante multivariado, similar ao método de Gauss-Newton, excepto que as derivadas na série de

Taylor são estimadas a partir do histograma de iterações em vez de fornecido analiticamente. É opcionalmente utilizado um critério de convergência adequado, por exemplo, em que há uma alteração na função de perda de menos que 10^{-a} .

Uma vez encontrados e isolados ou sintetizados ligandos de modulação, realizam-se estudos cristalográficos dos compostos complexados a um PCS do SNP. Como um exemplo não limitante, os cristais do PCS do SNP são embebidos durante 2 dias em 0,01-100 mM de ligando e são recolhidos dados de difracção de raios-X num detector de área e/ou num detector de placa fotográfica (por exemplo, um detector de placa fotográfica Mar) utilizando uma fonte de raios-X de ânodo rotativo. Os dados são recolhidos com uma resolução a mais elevada possível, por exemplo, 1,5-3,5 Å e agregados com um factor-R em intensidades adequadas. Constrói-se um modelo atómico do inibidor no mapa de diferenças de Fourier (F-F). O modelo pode ser refinado para uma solução num ciclo de emparelhamento simulado (Brünger (1987), *infra*) envolvendo 10-500 ciclos de refinamento de energia, 100-10000 passos I-FS de dinâmica à temperatura ambiente e/ou 10-500 ciclos mais de refinamento de energia. São também utilizadas restrições harmónicas para o refinamento atómico, excepto para átomos num raio de 10-15 Å relativamente ao inibidor. Um factor-R é seleccionado para o modelo tanto para os desvios r.m.s. relativamente aos comprimentos ideais das ligações, assim como para os ângulos, respectivamente. As medições directas da inibição enzimática proporcionam mais uma confirmação que os ligandos modelados são moduladores de pelo menos uma actividade biológica de um CS do SNP.

Assim, são também apresentados ligandos de um PCS do SNP, com base na estrutura cristalina desta enzima. É também importante a demonstração de níveis clinicamente úteis, por exemplo, a actividade *in vivo* é também importante. Na avaliação de inibidores do PCS do SNP para a actividade biológica em modelos animais (por exemplo, rato, ratinho, coelho) são utilizadas várias vias orais e parenterais de administração. Utilizando esta abordagem, espera-se que a modulação de um PCS do SNP ocorra em modelos animais adequados, utilizando os ligandos descobertos por modelação molecular e cristalografia de raios-X. Aqui apresentado pode ser, mas não se limita a, pelo menos um seleccionado de um ácido nucleico, uma proteína, um elemento, um lípido, um anticorpo, um sacárido, um isótopo, um hidrato de carbono, um agente de imagiologia, uma lipoproteína, uma glicoproteína, uma enzima, uma sonda detectável, e anticorpo ou fragmento destes, ou qualquer combinação destes, que pode ser marcado de forma detectável tal como para a marcação de anticorpos, tal como aqui descrito. Tais marcações incluem, mas não se limitam a, marcações enzimáticas, compostos ou elementos radioisotópicos ou radioactivos, compostos fluorescentes ou metais, compostos quimioluminescentes e compostos bioluminescentes. Alternativamente, pode ser utilizado qualquer outro agente de diagnóstico ou terapêutico conhecido.

Um agente terapêutico tal como aqui apresentado pode ter um efeito terapêutico na célula alvo como uma célula ou neurónio do sistema nervoso periférico, sendo o efeito seleccionado de, mas sem limitação: correcção de um gene ou de uma proteína defeituosos, uma acção como fármaco, um efeito tóxico, um efeito de estimulação do crescimento, um efeito de inibição do crescimento, um efeito metabólico, um efeito catabólico, um

efeito anabólico, um efeito neuro-humoral, um efeito estimulador da diferenciação celular, um efeito inibidor da diferenciação celular, um efeito neuromodulador, um efeito estimulador das células estaminais pluripotentes, e quaisquer outros efeitos terapêuticos conhecidos que modulam pelo menos um CS numa célula do sistema nervoso central podem ser proporcionados por um agente terapêutico administrado a uma célula alvo através da administração farmacêutica ou através um vector de administração.

Um ácido nucleico terapêutico como um agente terapêutico pode ter, mas não se limita a, pelo menos um dos seguintes efeitos terapêuticos na célula alvo: inibição da transcrição de uma sequência de ADN; inibição da tradução de uma sequência de ARN; inibição da transcrição reversa de uma sequência de ARN ou de ADN; inibição da modificação pós-tradução de uma proteína; indução da transcrição de uma sequência de ADN; indução da tradução de uma sequência de ARN; indução da transcrição reversa de uma sequência de ADN ou de ARN; indução de uma modificação pós-tradução de uma proteína; transcrição de um ácido nucleico como um ARN; tradução do ácido nucleico como uma proteína ou uma enzima; e incorporação do ácido nucleico num cromossoma de uma célula alvo para expressão constitutiva ou transiente do ácido nucleico terapêutico.

Os efeitos terapêuticos dos ácidos nucleicos terapêuticos podem incluir, mas não se limitam a: reprimir um gene deficiente ou o processamento da sua expressão, tal como ARN ou ADN antisense; inibição da replicação ou síntese viral; terapia génica por expressão de um ácido nucleico heterólogo que codifica para uma proteína terapêutica ou que corrige uma proteína defeituosa; modificação de um ARN defeituoso ou a sua

sub-expressão tal como um hnARN, um mARN, um tARN, ou um rARN; codificar para um fármaco ou pro-fármaco, ou para um enzima que gera um composto como um fármaco ou um pro-fármaco em células patológicas ou normais que expressam o receptor quimérico; e quaisquer outros efeitos terapêuticos conhecidos.

Um ácido nucleico que codifica, ou proporciona o efeito terapêutico, de qualquer toxina, pro-fármaco ou fármaco genético conhecidos para administração a células nervosas patogénicas e pode também incluir genes sob o controlo de uma sequência reguladora da transcrição (TRSs) específica de um tecido, específica para células patogénicas contendo CS. Tais TRSs limitariam ainda a expressão do agente terapêutico na célula alvo, de acordo com métodos conhecidos.

Exemplos não limitativos de tais agentes ou ligandos moduladores de PCS do SNP aqui apresentados e seus métodos incluem compostos piperizina substituídos com metilo/halofenilo, tais como lidoflazina (ver, por exemplo Merck Index Monograph 5311 e patente U.S. No. 3,267,104, ambas aqui inteiramente incorporadas por referência). Tais compostos foram testados e verificou-se que inibiam a actividade de canais de sódio de pelo menos um PCS do SNP da presente invenção em linhas celulares que expressavam pelo menos um PCS do SNP, tais como PC12, PK1-4 e outras células isoladas ou recombinantes que expressam pelo menos um PCS do SNP da presente invenção. Deste modo, apresentam-se agentes ou ligandos moduladores de PCS do SNP tais como piperizina substituídos com metilo/halofenilo. As substituições podem incluir piperizinas substituídas por alquilo e/ou halofenilo.

Administração Farmacêutica/de Diagnóstico. Utilizando compostos ou composições moduladores de PCS do SNP (incluindo antagonistas e agonistas tal como descrito acima) apresenta-se um método para modular a actividade da proteína PCS do SNP numa célula. Em geral, agentes (antagonistas ou agonistas) que tenham sido identificados inibir ou aumentar a actividade de PCS do SNP podem ser formulados de modo que o agente possa ser contactado com uma célula que expresse uma proteína PCS do SNP *in vivo*. O contacto de tal célula com tal agente resulta na modulação *in vivo* da actividade das proteínas PCS do SNP. Desde que não exista uma barreira de formulação ou uma barreira de toxicidade, os agentes identificados nos testes descritos acima serão eficazes para a utilização *in vivo*.

Também se apresenta um método para a administração de PCS do SNP ou de um composto ou composição de modulação de PCS do SNP (incluindo antagonistas e agonistas de PCS do SNP) a um animal (preferentemente, um mamífero (especificamente, um humano)) numa quantidade suficiente para resultar num nível alterado do PCS do SNP no animal. O composto ou composição de modulação de CS do SNP ou de PCS do SNP administrado poderia especificamente afectar funções associadas a PCS do SNP. Além disso, uma vez que o PCS do SNP é expresso em tecidos do sistema nervoso periférico, a administração do composto ou composição de modulação de CS do SNP ou de PCS do SNP poderia ser utilizada para alterar os níveis de PCS do SNP no sistema nervoso periférico.

Os antagonistas do PCS do SNP podem ser utilizados para tratar a dor devida a traumas ou patologias envolvendo o sistema nervoso central ou periférico, ou patologias relacionadas com níveis de expressão anormalmente elevados de pelo menos um

canal de sódio (CS) que ocorre naturalmente e específico do sistema nervoso (SN), em que um antagonista de PCS do SNP também inibe pelo menos um CS do SN, ou em que a dor é mediada em determinado grau por um CS do SN. Tais patologias, incluem, mas não se limitam a; doenças inflamatórias, neuropatias (por exemplo, neuropatia diabética), distrofias (por exemplo, distrofia reflexo-simpática, neuralgia pós-herpética); trauma (danos nos tecidos devidos a qualquer causa); dor focal devida a qualquer causa.

As doenças inflamatórias podem incluir, mas não se limitam a, patologias inflamatórias crónicas e patologias inflamatórias vasculares. As patologias inflamatórias crónicas incluem, mas não se limitam a sarcoidose, doença inflamatória crónica do intestino, colite ulcerosa, e doença de Crohn e patologias inflamatórias vasculares, tais como, mas não limitadas a, coagulação intravascular disseminada, aterosclerose, e doença de Kawasaki.

Os agonistas de PCS do SNP podem ser utilizados para tratar patologias que envolvem o sistema nervoso periférico ou central, ou patologias relacionadas com os níveis de expressão anormalmente baixos de pelo menos um canal de sódio (CS) que ocorre naturalmente e específico do sistema nervoso (SN), em que um agonista de PCS do SNP também aumenta ou estimula pelo menos um CS do SN. Tais patologias incluem, mas não se limitam a, doenças neurodegenerativas, doenças do tracto gastrointestinal devidas a disfunção do sistema nervoso entérico (por exemplo, colite, ileíte, síndrome do intestino inflamado); doenças do sistema cardiovascular (por exemplo, hipertensão e falha cardíaca congestiva); doenças do tracto genitourinário envolvendo enervação simpática e

parassimpática (por exemplo, hiperplasia benigna da próstata, impotência); doenças do sistema neuromuscular (por exemplo, distrofia muscular, esclerose múltipla, epilepsia).

As doenças neurodegenerativas podem incluir, mas não se limitam a, *doenças desmielisantes*, tais como a esclerose múltipla e a mielite transversa aguda; *doenças hipercinéticas do movimento*, tais como a Coreia de Huntington e coreia senil; *doenças hipocinéticas do movimento*, tais como a doença de Parkinson; *supranucleoplasia progressiva*; *degenerações espinocerebelares*, tais como a ataxia espinhal, a ataxia de Firederich, degenerações de sistemas múltiplos (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, and Machado-Joseph); e distúrbios sistémicos (doença de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia, e distúrbios multi-sistémicos mitocondriais); *distúrbios nucleares desmielisantes*, tais como a esclerose múltipla, a mielite transversa aguda; *distúrbios da unidade motora*, tais como atrofia musculares neurogénicos (degeneração da célula do corno anterior, tal como a esclerose lateral amiotrófica, a atrofia muscular espinhal infantil e a atrofia muscular espinhal juvenil); ou qualquer seu subconjunto.

A administração farmacêutica/de diagnóstico de um composto ou composição farmacêutica/de diagnóstico da invenção para uma patologia relacionada com CS do SNP pode ser administrada por quaisquer meios que atinjam o seu objectivo desejado, por exemplo, para tratar ou prevenir um cancro ou um estado pré-canceroso.

O termo "protecção", como em "protecção de uma infecção ou doença", tal como aqui utilizado, engloba "prevenção",

"supressão" ou "tratamento". "Prevenção" envolve a administração de uma composição Farmacêutica *prévia à indução* da doença. "Supressão" envolve a administração de uma composição *prévia ao aparecimento clínico* da doença. "Tratamento" envolve a administração da composição protectora *após o aparecimento* da doença. Será entendido que em medicina humana e veterinária, não é sempre possível distinguir entre "prevenção" e "supressão" uma vez que pode ser desconhecido, latente ou não ainda apercebidos pelo paciente o ou os acontecimentos que de facto induzem a doença, até bem depois da ocorrência do acontecimento ou acontecimentos. Deste modo, é comum utilizar o termo "profilaxia" como distinto de "tratamento" e englobando tanto "prevenção" como "supressão" tal como aqui definidos. O termo "protecção", tal como aqui utilizado, pretende incluir "profilaxia". Ver, por exemplo, Berker, *infra*, Goodman, *infra*, Avery, *infra* e Katamg, *infra*, os quais são aqui inteiramente incorporados por referência, incluindo todas as referências neles citados. A "protecção" proporcionada não tem de ser absoluta, ou seja, a doença não necessita de ser totalmente prevenida ou erradicada, desde que exista uma melhoria estatisticamente significativa em relação a uma população de controlo. A protecção pode ser limitada à mitigação da gravidade ou da rapidez do início dos sintomas da doença.

Pelo menos um composto ou composição de modulação de CS do SNP aqui apresentado pode ser administrado por qualquer meio que permita atingir o objectivo desejado, utilizando uma composição farmacêutica tal como previamente descrito.

Por exemplo, a administração pode ser realizada através de várias vias parentéricas tais como as vias subcutânea,

intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intracraniana, transdérmica, ou bucal. Alternativamente, ou em simultâneo, a administração pode ser por via oral. A administração parenteral pode ser por injeção de bolus ou por perfusão gradual ao longo do tempo.

Um modo adicional de utilização de um composto ou composição apresentado aqui é por aplicação tópica. Um composto ou composição de diagnóstico/farmacêutico da invenção pode ser incorporado em veículos aplicados topicamente tais como pomadas ou unguentos.

Para a aplicação tópica, é preferido aplicar uma quantidade eficaz de composto ou composição de diagnóstico/farmacêutica de acordo com a invenção à área alvo, por exemplo, superfícies da pele, membranas mucosas, e semelhantes, que são adjacentes a neurónios periféricos que se pretende tratar. Esta quantidade situa-se normalmente na gama entre cerca de 0,0001 mg a cerca de 1 g de composto de modulação da CS do SNP por aplicação, dependendo da área a ser tratada, se a utilização é de diagnóstico, profilática ou terapêutica, da gravidade dos sintomas, e da natureza do veículo tópico utilizado. Uma preparação tópica preferida é um unguento, em que cerca de 0,001 a cerca de 50 mg de ingrediente activo é utilizado por cc de base do unguento.

Um regime típico para o tratamento ou profilaxia compreende a administração de uma quantidade eficaz ao longo de um período de um ou vários dias, até e incluindo entre uma semana e cerca de seis meses.

Entende-se que a dosagem de um composto ou composição de diagnóstico/farmacêutico da invenção administrada *in vivo* ou *in vitro* será dependente da idade, sexo, estado de saúde, e peso do receptor, do tipo de tratamento simultâneo, se existente, da frequência do tratamento, e da natureza do efeito de diagnóstico/farmacêutico desejado. As gamas doses eficazes aqui proporcionadas não pretendem ser limitantes e representam gamas de dosagem preferidas. No entanto, a dosagem mais preferida será à medida do indivíduo, tal como entendido e passível de ser determinado pelo perito na técnica relevante. Ver, por exemplo, Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16ª edição, Merck and Co., Rahway. N.J., 1992; Goodman et al., eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª edição. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); Avery's *Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 3ª edição, ADIS Press, LTD., Williams E Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osol et al., eds., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edição. Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992). As moléculas da invenção tal como definidas nas reivindicações anexas podem ser utilizadas em diagnóstico ou em terapia tal como aqui discutido.

A dose total necessária para cada tratamento pode ser administrada através de doses múltiplas ou através de uma única dose. O composto ou composição de diagnóstico/farmacêutico pode ser administrado isoladamente ou em conjunto com outros agentes de diagnóstico e/ou

farmacêuticos dirigidos à patologia, ou dirigidos a outros sintomas da patologia.

Quantidades eficazes de um composto ou composição de diagnóstico/farmacêutico da invenção são desde cerca de 0,1 µg a cerca de 100mg/kg de peso corporal, administradas a intervalos de 4-72 horas, durante um período de 2 horas a 1 ano, e/ou qualquer valor nestes intervalos, tal como 0,0001-1,0, 1-10, 10-50 e 50-100, 0,0001-0,001, 0,001, 0,01-0,1, 0,1-1,0, 1,0-10, 5-10, 10-20, 20-30 e 50-100 mg/kg, a intervalos de 1-4, 4-10, 10-16, 16-24, 24-36, 36-48, 48-72 horas, durante um período de 1-14, 14-28, ou 30-44 dias, ou 1-24 semanas, ou qualquer gama ou valor nestes intervalos.

Os receptores da administração de compostos e/ou composições da invenção podem ser quaisquer animais vertebrados, tais como mamíferos, aves, peixes ósseos, rãs e sapos. Entre os mamíferos, os receptores preferidos são mamíferos das Ordens Primata (incluindo humanos, macacos), Artiodáctilos (incluindo cavalos, cabras, vacas, ovelhas, porcos), Roedores (incluindo ratinhos, ratos, coelhos, e hamsters), e Carnívoros (incluindo gatos, e cães). Entre as aves, os receptores preferidos são perus, galinhas e outros membros da mesma ordem. Os receptores mais preferidos são humanos.

Terapia Génica. Um vector de administração da presente invenção pode ser, mas não se limita a, um vector viral, um lipossoma, um anticorpo anti-PCS do SNP ou anti CS do SNP, ou um ligando CS, sendo um ou mais destes vectores de administração associado com um agente diagnóstico ou terapêutico.

O vector de administração pode compreender qualquer agente terapêutico ou de diagnóstico que tenha um efeito terapêutico ou de diagnóstico na célula alvo. A especificidade do vector de administração relativamente à célula alvo é assim proporcionada pela utilização de um vector de administração específico para a célula alvo.

O vector de administração pode também ser um vector viral compreendendo pelo menos um domínio de ligação seleccionado do grupo que consiste num anticorpo ou fragmento, anticorpo ou fragmento de local de ligação quimérico, uma célula alvo ou ligando específico, um receptor que se liga a um ligando da célula alvo, um anticorpo anti-idiotípico, um lipossoma ou outro componente que seja específico para a célula alvo. Um PCS do SNP pode estar já associado com a célula alvo, ou o vector de administração pode ligar-se à célula alvo através de um ligando do receptor da célula alvo e vice-versa.

Assim, o agente de diagnóstico ou terapêutico tal como o ácido nucleico, proteína fármaco, composto, composição terapêutico e de diagnóstico e semelhantes é preferentemente administrado à célula alvo, por exemplo, em que o ácido nucleico é preferentemente incorporado no cromossoma da célula alvo, com exclusão parcial ou completa das células não alvo.

A invenção pretende deste modo proporcionar vectores de administração, contendo um ou mais agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico, incluindo vectores adequados para terapia génica.

Num método de tratamento de uma doença associada a PCS do SNP num paciente que necessite de tal tratamento, pode-se proporcionar ADN funcional do PCS do SNP às células do SNP de tal paciente de um modo e em quantidades que permitam a expressão da proteína PCS do SNP proporcionada por tal gene, durante um tempo e numa quantidade suficiente para tratar tal paciente, tal como um vector de administração adequado. São conhecidos na técnica muitos sistemas de vector que proporcionam tal administração a pacientes humanos que necessitem de um gene ou proteína ausente da célula. Por exemplo, podem ser utilizados sistemas de retrovírus e especialmente sistemas de vírus do herpes simplex. Tais métodos são proporcionados, por exemplo, nos ensinamentos de Breakefield, et al., *The New Biologist* 3: 203-218 (1991); Huang, Q. et al., *Experimental Neurology* 115: 303-316 (1992), WO93/03743 e WO90/09441. A administração de uma sequência de ADN que codifique para uma proteína PCS do SNP funcional substituirá efectivamente o gene PCS do SNP em falta ou mutado da invenção.

Alternativamente, o composto ou a composição de modulação do PCS do SNP é expressa na forma de um gene recombinante numa célula, de tal modo que as células possam ser transplantadas num mamífero, preferentemente humano, que necessite de terapia génica. Para proporcionar terapia génica a um indivíduo, adiciona-se uma sequência genética que codifica para o composto ou composição que modula o PCS do SNP ao vector e introduz-se numa célula hospedeira. Exemplos de doenças que podem ser adequadas para terapia génica incluem, mas não se limitam a, doenças ou distúrbios neurodegenerativos, doença de Alzheimer, esquizofrenia, neoplasias e cancro. Exemplos de vectores que podem ser

utilizados em terapia génica incluem, mas não se limitam, vectores retrovirais, adenovirais deficientes ou outros vectores virais (Mulligan, R.C., *Science* 260: 926-932 (1993)). Ver Anderson, *Gene Therapy*, 246 *J. Amer. Med. Assn.* 2737 (1980); Friedmann, *Progress toward human gene therapy*, 244 *Science* 1275 (1989); Anderson, 256 *Science* 808 (1992); protocolos de terapia génica humana publicados em *Human Gene Therapy*, Mary Ann Liebert Publishers, N.Y. (1990-1994); Bank et al., 565 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 37 (1999); LTR-Vectors (Patente U.S. No. 4,405,712); Ausubel, *infra*, §§ 9.10-9.17; Jon A. Wolff., ed. *Gene Therapeutics: methods and applications of direct gene transfer*, Birkhäuser, Boston (1994).

Os meios pelos quais o vector contendo o gene pode ser introduzido na célula inclui mas não está limitado a, microinjecção, electroporação, transdução, ou transfecção utilizando DEAE-Dextrano, lipofecção, fosfato de cálcio ou outros procedimentos conhecidos pelo perito na técnica (Sambrook *infra*; Ausubel, *infra*).

Preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não-aquosas. Exemplos de solventes não aquosos são o propileno glicol, o polietileno glicol, óleos vegetais tais como o azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como o oleato de etilo. Veículos aquosos incluem água, solução alcoólica/aquosa, emulsões ou suspensões, incluindo meio salino e tamponizado. Veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, cloreto de sódio e dextrose de Ringer, lactato de Ringer, ou óleos fixados. Veículos intravenosos incluem recarregadores de fluidos e nutrientes, recarregadores de electrólitos, tais

como aqueles baseados na dextrose de Ringer e semelhantes. Podem também estar presentes conservantes, tais como por exemplo, anti-microbianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes e semelhantes. Ver, em geral, Osol et al., eds. Remington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., (1980).

Também se apresenta uma composição farmacêutica compreendendo um composto ou uma composição que modula CS do SNP ou PCS do SNP numa quantidade suficiente para alterar a actividade associada a PCS do SNP, e um diluente, veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. As concentrações e tamanhos de dose unitária apropriados podem ser facilmente determinados por um perito na técnica (Ver, por exemplo, Osol et al. ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Ed., Mack, Easton PA (1980) e WO 91/19008).

Também se apresentam aqui composições farmacêuticas que compreendem uma quantidade eficaz de pelo menos um oligonucleótido de PCS do SNP, em combinação com um veículo farmacêuticamente eficaz. Tais oligonucleótidos antisense incluem, mas não se limitam a, pelo menos uma sequência nucleotídica de 12-500 bases de comprimento que é complementar a sequência de ADN da SEQ ID NO:1, ou a uma sequência de ADN que codifique pelo menos 4 aminoácidos de SEQ ID NO:2 da Figura 11A-11E.

Alternativamente, o ácido nucleico de PCS do SNP pode ser combinado com um veículo lipofílico tal como qualquer um de um número de esteróis, incluindo colesterol, colato e ácido desoxicólico. Um esterol preferido é o colesterol.

Os ácidos nucleicos de terapia génica PCS do SNP e as composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas

por qualquer meio que permitam conseguir o seu objectivo pretendido. Por exemplo, a administração pode ser pelas vias parenterais, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou transdérmica. A dosagem administrada será dependente da idade, saúde e peso do receptor, tipo de tratamento simultâneo, se existente, frequência do tratamento, e natureza do efeito desejado.

As composições no âmbito desta invenção incluem todas as composições em que o ácido nucleico do PCS do SNP (tal como definido nas reivindicações anexas) é contido numa quantidade eficaz para atingir a expressão aumentada de pelo menos um PCS do SNP num neurónio ou gânglio do sistema nervoso periférico. Apesar das necessidades individuais variarem, a determinação das gamas óptimas de quantidades eficazes de cada componente está no âmbito da perícia na técnica. Tipicamente, o ácido nucleico PCS do SNP pode ser administrado a mamíferos, por exemplo humanos, numa dose de 0,005 a 1 mg/kg/dia, ou numa quantidade equivalente do seu sal farmacologicamente aceitável, por dia do peso corporal do mamífero a ser tratado.

Formulações adequadas para a administração parenteral incluem soluções aquosas do ácido nucleico PCS do SNP numa forma solúvel em água, por exemplo, sais solúveis em água. Além disso, podem ser administradas suspensões dos compostos activos na forma de suspensões para injeção de base oleosa apropriadas. Veículos ou solventes lipofílicos adequados incluem óleos gordos, por exemplo, óleo de sésamo, ou ésteres de ácidos gordos sintéticos, por exemplo, oleato de etilo ou triglicéridos. As suspensões para injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão

incluindo, por exemplo, carboximetil celulose de sódio, sorbitol, e/ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode ainda conter estabilizantes.

Alternativamente, pelo menos um PCS do SNP pode ser codificado por construções de ADN que são administradas na forma de viriões, os quais são preferentemente incapazes de se replicar *in vivo* (ver, por exemplo, Taylor, WO 92/06693). Por exemplo, tais construções de ADN podem ser administradas utilizando vírus baseados no herpes (Gage et al., Patente U.S. No. 5,082,670). Alternativamente, sequências de ARN antisense PCS do SNP, ribozimas PCS do SNP, e EGS PCS do SNP podem ser codificados por construções ARN que são administrados na forma de viriões, tais como retrovírus e adenovírus recombinantes deficientes em replicação. A preparação de vetores retrovirais é bem conhecida na técnica (ver, por exemplo, Brown et al., "Retroviral Vectors," em DNA Cloning: A Practical Approach, Volume 3, IRL Press, Washington, D.C. (1987)).

A especificidade para a expressão genética no sistema nervoso periférico pode ser conferida utilizando sequências reguladoras específicas de determinadas células apropriadas, tais como promotores ou "enhancers" específicos de determinadas células. Uma vez que a fosforilação das proteínas é crítica para a regulação neuronal (Kennedy, "Second Messengers and Neuronal Function," em An Introduction to Molecular Neurobiology, Hall, Ed., Sinauer Associates, Inc. (1992)), as sequências de promotores de proteínas cinases podem ser utilizadas para conseguir níveis suficientes de expressão genética PCS do SNP.

Assim a terapia génica pode ser utilizada para aliviar patologias relacionadas com canais e sódio através da inibição da expressão inapropriada de uma forma particular de CS do SNP. Além disso, a terapia génica pode ser usada para aliviar tais patologias proporcionando o nível de expressão apropriado de uma forma particular de PCS do SNP. Neste caso, as sequências de ácido nucleico PCS do SNP particulares podem ser codificadas por construções de ADN ou ARN que são administradas na forma de vírus, tais como descrito acima.

Tendo agora descrito de forma geral a invenção, a mesma vai ser mais facilmente percebida através de referência aos seguintes Exemplos que são proporcionados a título de ilustração, e não se pretende que limitem a invenção, excepto se especificado.

Exemplo 1:

Clonagem e Sequenciação de um Ácido Nucleico que Codifica para um CS do SNP

Materiais e Métodos

Cultura Celular. Células C12 e subclones PKI-4 PC12 foram crescidos como descrito anteriormente (Mandel et al. 1988). Adicionou-se NGF (subunidade 2,5 S, gentilmente fornecida pelo Dr. S. Halegous, SUNY em Stony Brook), ao meio de cultura a uma concentração final de 110 ng/ml. O subclone PKI-4 PC12 que expressa uma proteína cinase inibidora dependente de cAMP (PKI) foi também proporcionado pelo Dr. S. Halegous (ver D'Areangeto et al. J. Cell Biol. 122: 915-921 (1993)).

Amplificação por PCR. O ARN celular total foi isolado, de acordo com o método de Cathals et al. DNA 2: 329-335 (1983), de um subclone PC12 (PKI-4) que expressa elevados teores da proteína cinase inibidora dependente de cAMP. Utilizou-se dois µg do ARN total preparado das células PKI-4 tratadas com NGF para sintetizar a primeira cadeia de cADN utilizando iniciadores hexâmeros aleatórios para a reacção de transcriptase reversa. O cADN serviu de molde para a amplificação por PCR, utilizando um par de oligonucleótidos iniciadores degenerados que especificavam uma região de 400 pares de bases no interior do domínio de repetição III do gene da subunidade α do canal de sódio. O iniciador 5' (designado YJ1: GCGAAGCTT(TC)TIATTTT(TI)I(GATC)IAT(ATC)ATGGG (SEQ ID NO:3), o sublinhado indica um local de restrição *HindIII*), correspondeu aos aminoácidos FWLIFSIM (SEQ ID NO_4) nas posições 1347-1354 no gene de canal de sódio do tipo U. O iniciador 3' (designado YOIC: GCAGGATCC(AG)TT(AG)AAA(AG)TT(AG)TC(AGT)AT(AGT)AT(AGCT)AC (AGCT)CC (SEQ ID NO:5), o sublinhado indica um local de restrição *BamHI*), correspondeu aos aminoácidos GVIIDNFN (SEQ ID NO:6) nas posições 1470-1447 no gene de tipo II. A mistura de reacção de amplificação consistia em 5% do cADN, 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, Taq polimerase (Perkin-Elmer) num tampão consistindo em 0,1 M KCl, 0,1 M TRIS HCl (pH 8,3) e gelatina (1 mg/ml). A reacção foi levada a cabo num termociclador Perkin-Elmer como se segue: 5 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min.), emparelhamento (37°C, 1 min.), e extensão (72°C, 1 min) seguindo-se 25 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min.), emparelhamento (50°C, 1 min.) e extensão (72°C, 1 min.). Os produtos de PCR foram excisados de um gel de agarose de baixo

ponto de fusão (SEAPLAQUE GTG, FMC BIOPRODUCTS) e subclonados num vector plasmídico Bluescript II SK previamente restrito com *HindIII* e *BamHI*. Realizou-se um rastreio aos clones para inserções de cADN utilizando uma "miniprep" (Sambrook et al., *infra*) e sequenciou-se em ambas as direcções por terminação de cadeia didesoxi (*kit* Sequenase 2.0, UNITED STATES BIOCHEMICAL). Os dados da sequência foram compilados e analisados utilizando o programa informático GENWORKS (INTELLIGENETICS, INC., Mountain View, CA).

Construção e Rastreio de Biblioteca de cADN. Purificou-se Poli(A)+ mARN do subclone PKI-4 PC12 (*kit* de purificação de mARN, PHARMACIA) e utilizou-se para construir uma biblioteca de cADN Lambda ZAP II iniciada aleatoriamente ou com oligo (dt) (STRATAGENE corp., La Jolla, CA). A biblioteca consistia em $5,6 \times 10^4$ clones independentes antes da amplificação. O rastreio de aproximadamente 4×10^4 recombinantes utilizando o produto de PCR clonado pPC12-1 marcado com iniciadores aleatórios (*kit* da PHARMACIA) resultou no isolamento de 5 cADNs com uma gama de dimensões de 1-3 kb. A análise de sequências e a comparação com sequências publicadas estabeleceu que dois dos cADNs juntos codificavam para 3033 pb da nova subunidade α do canal de sódio, PN1.

Análise por "Northern Blot" e testes de protecção da ribonuclease. Isolou-se ARN celular total de cérebro, de corda espinhal, de gânglio cervical superior, de gânglio das raízes dorsais, de músculo esquelético, de músculo cardíaco, e de glândula adrenal de ratos Sprague-Dawley adultos utilizando o método convencional de Chirgwin, Biochemistry 18: 5294-5299 (1979). Submeteu-se o ARN a electroforese e transferiu-se para uma membrana de Nylon tal como previamente

descrito (Cooperman et al., Proc. Nat'l Acad Sci. USA 84: 8721 (1987)) (DURALON-UV; STRATAGENE CORP.). As manchas de ARN foram reticuladas ao Nylon utilizando o agente de reticulação Stratalinker UV (STRATAGENE CORP.) e hibridadas com sondas de ARN antisense marcadas com ³²P-UTP geradas a partir dos seguintes moldes linearizados: pPC12-1, pRB211 (Cooperman, *infra*, 1987), p1B15 (ciclofilina; Danielson et al., DNA 7: 261-267 (1988)), e cérebro de rato do tipo 1, que contém 51 pb de uma sequência de intrão 5' não traduzida e 267 pb de sequência codificante do canal de sódio do tipo I. As sondas de ARN foram transcritas ou com ARN polimerase T3 (pPC12-1), T7, (pNach1), ou SP6 (pRB211, p1B15) de acordo com as instruções do fabricante (PROMEGA CORP, Madison, WI). As manchas foram lavadas uma vez em 2 x SSC, 0,1% NaDodSO₄ durante 15 min. a 68°C, seguindo-se duas lavagens em 0,2 x SSC, 0,1% NaDodSO₄ durante 15 min. a 68°C. Utilizou-se autorradiografia com filme XAR-5 pré-exposto (EASTMAN KODAK CO., Rochester, NY) para quantificação de mARN por densitometria.

Os testes de protecção da ribonuclease foram levados a cabo utilizando um *kit* (RPA II, AMBION INC., Austin, TX). Hibridou-se ARN total com 10⁻⁴ cpm de sonda ARN gerada de pPC12-1. Para controlar as diferenças na quantidade total de ARN entre amostras, incluiu-se uma sonda de ARN antisense para β actina, transcrita da pTRI-β-actina (AMBION, INC.).

Hibridação in situ. A preparação do tecido e a hibridação foram levadas a cabo utilizando uma modificação do procedimento descrito por Yokouchi et al., Develop. 113: 431-444 (1991). Procedeu-se à dissecação de SCG e DRG de ratos Sprague-Dawley adultos e fixaram-se em 4% paraformaldeído (em

0,1 M PBS) durante 2-6 horas a 4°C. O tecido foi então enxaguado ≈ 5 min. Em 0,1 M PBS (pH 7,3), crioprottegido em 30% de sacarose (em 0,1 M PBS) durante 2 horas a 4°C e embebido em O.C.T. (TISSUETEK). Recolheram-se secções de criostato (14 µM) em lâminas SUPERFROST/Plus (FISHER SCIENTIFIC), secas ≈ 2 horas à temperatura ambiente, e depois armazenadas a -80°C.

Imediatamente antes da pré-hibridação, as secções foram trazidas à temperatura ambiente, e re-hidratadas em 0,1 M de PBS (pH 7,3) contendo 0.3% Triton X-100 durante 5 min. As secções foram então tratadas com 0,2 N de HCl durante 20 min., lavadas em 0,1 M PBS durante 5 min., e digeridas com proteinase K (5 µg/ml em 0,1 M de PBS) durante 40 min. a 37°C. As secções foram então pós-fixadas com 4% de paraformaldeído (em 0,1 M de PBS), enxaguadas com 0,1 M de PBS contendo 0,1 M de glicina durante 15 min., e equilibradas em 50% formamida, 2 x SSC durante 1 hora (temperatura ambiente).

As secções foram hibridadas com sondas de ARN antisense marcadas com digoxigenina transcritas de pPC 12-1 ou pNach2 (Cooperman et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84: 8721 (1997)) de acordo com as instruções do fabricante para marcação de ARN com digoxigenina-UTP (BOEHRINGER MANNHEIM). As sondas não marcadas foram sintetizadas substituindo a digoxigenina-UTP com rUTP. Cada secção foi coberta com ≈ 100 µl de solução de hibridação contendo 20 mM de TRIS HCl (pH 8,0), 2,5 mM de EDTA, 50% de formamida, 0,3 M de NaCl, 1x solução de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, 1 mg/ml de tARN, e sonda a uma concentração de 0,7 µg/ml. As secções foram então cobertas com coberturas PARAFILM e incubadas numa câmara

húmida durante uma noite a 45°C. Após a hibridação, as secções foram lavadas em 50% de formamida, 2 x SSC a 45°C durante 1 hr., seguindo-se a digestão por RNase em 0,5M de NaCl, 10 mM de TRIS HCl (pH 8,0), e 20 µg/ml de RNase A (BOEHRINGER MANNHEIM). As secções foram seguidamente lavadas a 45°C em 50% de formamida, 2 x SSC durante 1 hora, e 50% de formamida, 1 x SSC durante 1 hora.

A detecção imunológica foi levada a cabo utilizando um kit (GENIUS 3 KIT, BOEHRINGER MANNHEIM), de acordo com as instruções do fabricante. Na maioria das experiências, as secções foram incubadas na solução de coloração durante = 3-5 horas à temperatura ambiente. As secções foram então tapadas com AQUA-MOUNT (Lerner Laboratories) e armazenadas no escuro.

Densitometria. Os níveis de mRNA de canal de sódio foram determinados através de análise de densitometria dos autorradiogramas utilizando o programa informático Bio Image (Millipore Corp., Ann Arbor, Michigan). Os níveis de mRNA foram normalizados para os níveis quantificados de mRNA de ciclofilina.

Resultados

Isolamento de um cADN expresso preferencialmente nos nervos periféricos. D'Arcangelo et al., J. Cell Biol. 122: 915-921 (1993) mostraram previamente que o tratamento de células PC12 com NGF aumenta o nível de um transcrito genético de um canal de sódio de ~ 11 kb que não hibrida a sondas específicas para qualquer um dos genes de canais de sódio conhecidos. Um transcrito de dimensão idêntica foi também detectado no mRNA de gânglios sensoriais e simpáticos de rato adulto, mas não

no mRNA do cérebro. Estes resultados sugerem que o transcrito codificava para um novo membro da família de genes de canais de sódio /denominado Nervo Periférico do tipo 1 (PN1)).

Para confirmar a identidade do gene PN1, amplificaram-se cADNs de um subclone PC12 tratado com NGF que expressa preferencialmente mRNA de PN1 (células PKI-4) D'Arcangelo et al. pela reacção em cadeia da polimerase (PCR), utilizando um par de iniciadores oligonucleotídicos degenerados que especificam uma região de 400 pares de bases (pb) do gene da subunidade α do canal de sódio (ver Métodos, Figura 1). Ambos os iniciadores especificaram regiões putativas abrangendo a membrana no interior do domínio de repetição III, as quais são altamente conservadas entre os canais de sódio sensíveis à voltagem. As regiões amplificadas entre os iniciadores incluem os resíduos de revestimento do poro, estritamente conservados, assim como resíduos que são divergentes entre as diferentes subunidades α de mamíferos. A análise das sequências dos produtos de PCR revelou um cADN, pPC12-1, que codificava para uma porção de uma nova subunidade α do canal de sódio putativa (Figura 1). Foram isolados cADNs adicionais que encapsulavam a totalidade da região codificante para PN1.

Para determinar se pPC12-1 codifica para uma parte do gene PN1, o cADN foi utilizado para gerar sondas de ARN antisense para análise por "Northern blot" de mRNA a partir de células PC12 controlo e tratadas com NGF (Figura 2B). Para comparação um "blot" duplicado (Figura 2A) foi hibridado com uma sonda antisense pRB211, a qual codifica para uma região altamente conservada da subunidade α do canal de sódio (Cooperman et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84: 8721 (1987)) e que apresenta hibridação cruzada com o transcrito PN1, e que, tal

como ilustrado por D'Arcangelo et al., J. Cell Biol. 122: 915-921 (1993), os níveis do transcrito detectado deveria aumentar rapidamente e de forma transiente após tratamento com NGF (máximo \approx 5 horas). A comparação das Figuras 2A e 2B mostra que pPC12-1 satisfaz ambos os critérios. Ainda, de forma consistente com D'Arcangelo et al. J. Cell Biol. 122: 915-921 (1993), verificou-se que a indução por NGF do transcrito detectada por pPC12-1 é independente de actividade de proteína cinase dependente de cAMP.

Para se isolar cADNs adicionais que codificam para PN1, preparou-se uma biblioteca de cADN Lambda ZAP II iniciada aleatoriamente ou com oligo (dt) (STRATAGENE, $5,6 \times 10^6$ clones independentes) a partir de poli(A) + mARN isolado do mesmo subclone PC12 do qual foi isolado pPC12-1. O rastreio a 4×10^4 recombinantes com uma sonda gerada a partir de PC12-1 resultou no isolamento de 2 cADNs adicionais sobrepostos que são juntos para originar um cADN de 3033 pb (Figura 7). Foram ainda isolados mais cADNs que encapsularam a totalidade da região codificante para PN1.

Análise da estrutura primária deduzida de PN1. Tal como ilustrado na Figura 8, a estrutura primária deduzida de PN1 codifica para o domínio de repetição II do gene da subunidade α do canal de sódio. A comparação com o canal de sódio do tipo II mostra que a sequência PN1 contém todos os padrões estruturais característicos de canais de sódio sensíveis à voltagem, incluindo seis domínios transmembranares putativos (IIIS1-IIIS6). O domínio S4, apesar de servir como sensor de voltagem, apresenta o padrão altamente conservado de um resíduo carregado positivamente (lisina ou arginina) a cada três posições. Além disso, os segmentos de revestimento de

poros putativos (IIISS1-IIISS2) contêm resíduos que se verificou estarem envolvidos na permeação selectiva do sódio (Heinemann et al., Nature 356: 441-443 (1992)) assim como afinidade TTX (Terlaue et al., FEBS Lett. 293: 93-96 (1991)). Além destas características altamente conservadas, a subunidade α do canal de sódio sofre várias modificações pós-tradução características. Todos os canais de sódio sequenciados até à data apresentam um padrão distintivo de locais de glicosilação (N-ligados) ligados à asparagina, que são encontrados quase exclusivamente nas voltas extracelulares que unem as hélices S5 e S6 transmembranares. Os locais de glicosilação N-ligados de PN1 estão em boa concordância com este padrão; três potenciais locais de glicosilação extracelulares estão localizados entre IIIS5 e IIIS6. Dois destes locais também se encontram nos canais de sódio dos tipos I, II e III.

A subunidade α é fosforilada por uma proteína cinase C (PKC), e a sequência PN1 deduzida contém o local de fosforliação PKC de consenso altamente conservado na serina¹⁵⁰⁶ (Figura 1). Este resíduo localiza-se na volta citoplasmático que junta os domínios III e IV e que foi implicado na inactivação de canal, e análise de mutação mostrou que esta serina é necessária para a modulação PKC da inactivação de canal (West et al., 1991).

Determinaram-se a totalidade das sequências de ADN (Figura 9A-D) e de aminoácidos (Figura 10). A sequência de aminoácido de PN1 de rato foi comparada com sequências humanas novas (Figura 11A-E) apresentadas no Exemplo 2.

Em suma, a estrutura primária deduzida de PN1 contém a totalidade dos distintivos estruturais e funcionais característicos de uma subunidade α de um canal de sódio sensível à voltagem.

O gene PN1 é expresso preferencialmente no SNP. Para determinar se o gene PN1 era expresso preferencialmente no SNP, isolou-se ARN total de cérebro, corda espinhal, SCG, DRG, músculo esquelético, e músculo cardíaco de rato adulto e submeteu-se a análise por "Northern blot". As manchas foram hibridadas com a sonda antisenso específica para PN1 gerada a partir de pPC12-1. Tal como apresentado na Figura 3A, encontraram-se níveis elevados de hibridação a um transcrito de \approx 11 kb tanto em SCG como em DRG. Foram observados níveis de hibridação muito mais baixos mas detectáveis tanto na corda espinhal como no cérebro. Não se observou qualquer hibridação detectável no mARN de músculo esquelético, músculo cardíaco ou fígado.

Foram também preparadas análises de protecção à RNase. Isolou-se ARN total dos mesmos tecidos utilizados na análise por "Northern blot", assim como da glândula adrenal, e hibridou-se à sonda antisenso específica para PN1 (pPC12-1). O mARN de SCG, DRG, cérebro, corda espinhal, e glândula adrenal protegeu um fragmento de 343 da sonda PN1 (Figura 4B). As bases não protegidas representam sequências do iniciador oligonucleotídico e de plasmídeo. A sonda PN1 não foi protegida pelo mARN quer de músculo esquelético quer de músculo cardíaco.

Para determinar as quantidades relativas de mARN de PN1 nos vários tecidos, analisaram-se por densitometria

autorradiografias de três experiências separadas de protecção à RNase. Para controlar pequenas diferenças na quantidade total de ARN entre amostras, incluiu-se uma sonda de ARN antisense para β actina. Os níveis de mARN PN1 tanto em SCG como em DRG são aproximadamente 40 vezes superiores do que na corda espinhal, glândula adrenal e cérebro.

O gene PN1 é expresso em neurónios simpáticos e sensoriais.

Para determinar se o gene PN1 é expresso em neurónios dos gânglios periféricos, utilizou-se hibridação *in situ* para examinar a distribuição celular de mARN de PN1 em SCG e DRG de rato adulto. Hibridaram-se secções do criostato com uma sonda de ARN específica para PN1 marcada com digoxigenina (pPC12-1), a qual foi visualizada utilizando um anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina. Tal como apresentado na Figura 4A, B a sonda antisense PN1 marcou a maioria dos corpos celulares neuronais tanto em SCG como em DRG. Para confirmar que o sinal de hibridação era devido à ligação da sonda especificamente a mARN de PN, realizaram-se dois controlos negativos diferentes: (1) Hibridaram-se secções com a sonda marcada com digoxigenina na presença de um excesso de 100 vezes de sonda antisense PN1 não marcada. (2) Experiências anteriores mostraram que SCG e DRG contêm níveis extremamente baixo de mARN de canais de sódio do tipo II (Beckh, S., FEBS Lett. 262: 317-322 (1990)). Deste modo, também foram hibridadas secções com uma sonda antisense específica para o tipo II. Tal como ilustrado, na Figura 4C-F, ambas estas experiências de controlo reduziram grandemente o sinal de hibridação. Ainda, em consonância com os resultados para as análises de "Northern blot" e de protecção à RNase, descobriu-se que a hibridação da sonda PN1 marcada a

secções do córtex cerebral do rato adulto não resultou em coloração detectável.

Apesar da sonda PN1 ter corado a maioria dos corpos celulares tanto em SCG como em DRG, descobriu-se que a variabilidade célula a célula dos níveis de mARN de PN1 diferia entre os dois gânglios. Os neurónios SCG eram relativamente homogéneos, dado que a intensidade do produto de reacção era relativamente constante entre as diferentes células. No entanto, os neurónios DRG eram significativamente heterogéneos dado que a intensidade de coloração variava consideravelmente de célula para célula. Por exemplo, na Figura 4B, as setas indicam dois neurónios DRG com aproximadamente o mesmo diâmetro que diferem marcadamente na intensidade de coloração.

Finalmente, descobriu-se que a sonda PN2 não corava células não neuronais tais como células satélite e células de Schwann. No entanto, é possível que estas células contenham níveis muito baixos de mARN de PN1 que não sejam detectáveis através deste método.

Neurónios SCG também expressam o gene do canal de sódio do tipo I. A análise de "Northern blot" anterior mostrou que o mARN de SCG contém dois transcritos de canais de sódio distintos. Tal como se mostrou, o transcrito maior, de 11 kb, codifica para o canal de sódio PN1. No entanto, o transcrito mais pequeno ainda não foi identificado. Colocou-se a hipótese que este transcrito mais pequeno codificada para o canal de sódio do tipo I, uma vez que se encontraram níveis moderados de mARN do tipo I noutros tecidos do SNP (Beckh, S., FEBS Lett. 262: 317-322 (1990)). Para testar esta

hipótese, hibridaram-se "Northern blots" de mRNA de SCG isolados de ratos adultos com uma sonda antisenso específica para gene do canal de sódio do tipo I (pNach1, ver Métodos acima). Tal como ilustrado na Figura 5, a sonda específica para o tipo I hibridou especificamente com o transcrito mais pequeno. Além disso, descobriu-se que o mRNA de SCG protege a sonda de tipo I em ensaios de protecção à RNase.

Os genes da subunidade PN1 α putativa e da subunidade do tipo I α são regulados de forma distinta durante o desenvolvimento.

Diversos estudos mostraram que os genes dos canais de sódio dos tipos I, II e III são regulados de forma diversa durante o desenvolvimento em ambos os sistemas nervoso central e periférico. Para determinar se os genes do PN1 e de tipo I são também regulados independentemente durante o desenvolvimento, mediu-se os níveis de mRNA relativos em SCG isolado de ratos a diferentes idades após o nascimento. Para visualizar ambos os transcritos em simultâneo, hibridaram-se "Northern blots" com a sonda pRH211 do gene conservado de canal de sódio. Tal como apresentado na Figura 6A, em SCG removido no dia 7 após o nascimento (P7), os níveis de mRNA de PN1 e de tipo I são aproximadamente iguais. No entanto, a P14, a sua abundância relativa desviou-se de tal modo que o mRNA de PN1 excede o de tipo I por \approx vezes. Este aumento na razão dos níveis de mRNA de PN1 em relação ao de tipo I continua durante pelo menos as quatro semanas seguintes após o nascimento. Em P42, PN1 é o transcrito de gene de canal de sódio predominante, sendo os níveis de mRNA de PN1 várias vezes superior ao do tipo I.

Para se quantificar as alterações nos níveis de mRNA ao longo do desenvolvimento, analisaram-se autorradiografias de três

experiências diferentes por densitometria. Para controlar as diferenças na quantidade de ARN total entre filas, os "blots" foram subsequentemente "blots" hibridados com uma sonda para o controlo interno ciclofilina. Tal como ilustrado na Figura 6B, na qual a percentagem máxima de mARN é representada em função da idade após o nascimento, o desvio na abundância relativa dos dois transcritos é largamente devido a uma diminuição durante o desenvolvimento no nível de mARN do canal de sódio do tipo I. De P7 a P42, o nível do mARN do tipo I diminui em aproximadamente 80%.

Exemplo 2:

Rastreo de Fármacos para Antagonistas de PN-1

A capacidade de um ligando de PCS do SNP (por exemplo, antagonistas ou agonistas) em inibir ou aumentar a actividade de uma PCS do SNP é avaliada com células que expressam pelo menos um PCS do SNP. Um teste para a actividade de PCS do SNP em tais células é utilizado para determinar a funcionalidade da proteína PCS do SNP na presença de pelo menos um agente que pode actuar como antagonista ou agonista, e assim, são identificados agentes que interferem ou aumentam a actividade de PCS do SNP. São utilizadas duas ou mais linhas celulares (cada uma expressando um PCS do SNP diferente), assim como usando opcionalmente uma ou mais linhas celulares que expressam um canal de sódio específico do SNC como controlo.

Estes agentes são seleccionados e rastreados (1) aleatoriamente; (2) por selecção racional; e ou (3) por desenho utilizando, por exemplo, técnicas de modelação computacional.

Existem numerosas variações de testes que podem ser utilizados pelo perito na técnica sem a necessidade de desnecessária experimentação de modo a isolar agentes de modulação ou ligandos de um PCS do SNP. Os métodos de determinação de agente incluem Desenho Molecular Assistido por Computador (CADM), ligação agente-PCS do SNP, testes e sínteses químicas sofisticados, rastreamento dirigido, tecnologia de biblioteca combinatorial de péptidos, tecnologia antisense e/ou testes biológicos, de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, Rapaka et al., eds., Medications Development: Drug Discovery, Databases, and Computer-Aided Drug Design, NIDA Research Monograph 134, NIH Publication No. 93-3638, U.S. Dept. of Health and Human Services, Rockville, MD (1993); Langone, Methods in Enzymology, Volume 203, Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Parte B, Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides and Drugs, Seção III, pp 587-702, Academic Press, Nova Iorque (1991)).

Alternativamente são utilizadas bibliotecas de expressão celular, ou outras células que foram selecionadas ou modificadas geneticamente para expressar e apresentar PCS do SNP através da utilização de ácidos nucleicos de PCS do SNP da invenção são preferidas em tais métodos, enquanto que as linhas celulares hospedeiras podem ser escolhidas de modo a não terem receptores relacionados. Rapaka, *infra*, (1993) nas páginas 58-65.

Um agente PCS do SNP no contexto da presente invenção refere-se a qualquer molécula química ou biológica que se associa com um PCS do SNP *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*, e pode ser, mas sem limitação, compostos químicos ou composições

sintéticos, recombinantes ou naturalmente obtidos, por exemplo, ácidos nucleicos, péptidos, hidratos de carbono, derivados de vitaminas, hormonas, neurotransmissores, vírus ou seus domínios de ligação a receptores, opsinas, rodopsinas, nucleósidos, nucleótidos, factores da cascata de coagulação, odorantes ou feromonas, toxinas, factores de crescimento, factores activadores das plaquetas, péptidos neuroactivos, neuro-humores, ou qualquer composto biologicamente activo, tais como fármacos ou compostos que ocorrem naturalmente.

Os agentes são seleccionados e submetidos a rastreio aleatoriamente ou seleccionados ou desenhados de forma racional utilizando técnicas de modelação computacional. Para o rastreio aleatório, os agentes potenciais são seleccionados e testados relativamente à sua capacidade de se ligarem a PCS do SNP ou a um seu fragmento. Alternativamente, os agentes podem ser seleccionados ou desenhados de forma racional. Tal como aqui utilizado, um agente é dito ser "seleccionado ou desenhado de forma racional" quando o agente é escolhido com base na configuração de pelo menos um PCS do SNP (por exemplo, tal como apresentado na Figura 11). Por exemplo, um perito na técnica pode facilmente adaptar procedimentos actualmente disponíveis para gerar agentes capazes de se ligarem a uma sequência peptídica específica de modo a gerar compostos desenhados racionalmente, tais como compostos químicos, ácidos nucleicos ou péptidos. Ver, por exemplo, Rapaka, *infra*, (1993); Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides," em *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman, Nova Iorque (1992), pp. 289-307; e Kaspczak et al., *Biochemistry* 28: 9230-2938 (1989).

Um método para o rastreio de um agente que modula a actividade de pelo menos um PCS do SNP compreendendo:

(a) incubar pelo menos uma linha celular que expressa pelo menos um PCS do SNP com um agente a ser testado; e

(b) testar a pelo menos uma linha celular para a actividade de pelo menos uma proteína PCS do SNP através da medição do efeito do agente na ligação de PCS do SNP ou na actividade PCS do SNP distinguindo o teste preferentemente o efeito do agente em PCS do SNP alternativos e determina que o agente tem pouco ou nenhum efeito nos canais de sódio do SNC, ou tem relativamente menos efeito nos canais de sódio do SNC.

Qualquer célula pode ser utilizada no teste acima desde que expresse para uma forma funcional de uma proteína PCS do SNP e a actividade PCS do SNP possa ser medida. As células de expressão preferidas são as células ou organismos eucarióticos. Tais células podem ser modificadas para conter sequências de ADN que codificam para a proteína PCS do SNP utilizando procedimentos de rotina conhecidos na técnica. Alternativamente, um perito na técnica pode introduzir mRNA que codifica para a proteína PCS do SNP directamente na célula.

Numa realização alternativa, podem modificar-se geneticamente populações de células estaminais para células neuronais ou gliais para que expressem um canal iónico PCS do SNP funcional. Tais células que expressem o canal iónico PCS do SNP podem ser transplantadas para a região doente ou lesada do sistema neurológico do mamífero (Neural Transplantation. A Practical Approach, Donnet & Djorklund, eds., Oxford University Press, Nova Iorque, NY (1992)). Noutra realização,

pode-se modificar geneticamente o tecido embrionário ou neurónios fetais para que expressem canais iónicos PCS do SNP e transplantá-los para a região doente ou lesada do sistema límbico do mamífero. A exequibilidade de transplantar neurónios dopaminérgicos fetais em pacientes com a doença de Parkinson já foi demonstrada (Lindvall et al., Archives of Neurology 46: 615-631 (1989)).

São actualmente utilizadas pelo menos dois tipos de abordagens para expressar clones de canais de sódio dependentes da voltagem de modo a gerar proteínas dos canais funcionais. Numa abordagem, o mRNA que codifica para o cADN é expresso em ovócitos de *Xenopus*. O cADN do canal de sódio é clonado no vector de expressão bacteriano tal como o plasmídeo recombinante pGEM (Melton, et al., 1984). A transcrição do cADN clonado é levada a cabo utilizando uma ARN polimerase tal como a polimerase SP6 ou a polimerase T7 com um análogo de terminação tal como M⁷G(5')ppp(5')G. O ARN resultante (por exemplo, cerca de 50 nL, correspondendo a 2-5 ng) é injectado em ovócitos da fase V e fase VI isolados de *Xenopus*, que são incubados durante 3-5 dias a 19°C. Os ovócitos são testados para expressão do canal de sódio com uma pinça de voltagem de dois microeléctrodos (Trimmer et al, Neuron 3: 33-49 1989).

Numa abordagem alternativa, os cADNs que codificam para um canal de sódio dependente da voltagem são clonados em qualquer um de um número de vectores de expressão de mamíferos, e transfectados para células de mamíferos que não expressam canais de sódio dependentes da voltagem endógenos (tais como linhas celulares de fibroblastos). Os clones transfectados são seleccionados que expressam o cADN clonado

transfectado. A expressão do canal de sódio é medida com uma técnica de pinça de voltagem para célula inteira utilizando um eléctrodo de adesivo (D'Arcangelo et al., J. Cell. Biol. 122: 915-921 (1993)).

Fontes de PCSs do SNP e Linhas Celulares Úteis para o Rastreamento de Fármacos. Qualquer linha celular que expresse (naturalmente, por indução ou devido a expressão recombinante de um PCS do SNP) pode ser utilizada para o rastreamento de fármacos. Como um exemplo não limitante, as células PC12 expressam tanto os canais de sódio PN1 como de Tipo II. As células A126-1B2 são mutantes deficientes na actividade de Proteína Cinase A (PKA) e que expressam PN1, mas que se descobriu agora não expressarem canais de sódio do Tipo II. PKI-4 é uma linha celular transfectada com um cADN que codifica para um péptido inibidor de PKA. Cada uma destas linhas celulares pode ser utilizada como uma fonte de PCS do SNP da presente invenção, ou como uma linha celular como tal para utilização no rastreamento de fármacos. O tratamento de células PC12 com NGF reduz ambos os canais de sódio PCS do SNP (PN1) e do tipo II, enquanto que NGF induz apenas PN1 em células A126-1B2. As células PKI-4 expressam um PCS do SNP (PN1) sem tratamento com NGF (D'Arcangelo et al., J. Cell Biol. 122: 913-921 (1993)).

Adicionalmente, ou alternativamente, podem também ser utilizados sistemas de expressão heteróloga nos quais linhas celulares (tais como célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO)) são transfectadas de forma estável com cADN que codifica para PN-1. Os passos de métodos para a transfecção e expressão estável de cADN para formar linhas celulares heterólogas são bem conhecidos na técnica. Uma vantagem de

utilizar células transfectadas é que são obtidos clones que expressam níveis muito elevados de uma PCS do SNP, tal como PN-1.

Para fazer o rastreio de moduladores de PCS do SNP, como antagonistas ou agonistas, os fármacos são examinados pela sua capacidade de:

- (a) inibir ou aumentar a ligação de radioligandos a PCS do SNP (reacção de ligação do ligando marcado), e/ou
- (b) inibir ou aumentar o fluxo iónico através do canal do PCS do SNP numa linha celular que expressa um PCS do SNP.

Podem-se utilizar neurotoxinas marcadas que se ligam aos ligandos para caracterizar os canais de sódio do SNP. Por exemplo, estudos anteriores identificaram pelo menos seis locais de ligação de neurotoxinas distintos em canais de sódio não SNP previamente caracterizados (revistos em Lombert et al., FEB 219 (2): 355-359 (1987)). Pensa-se que muitos destes locais estão alostericamente acoplados uns aos outros (para uma revisão, ver Strichartz et al., Ann Rev. Neurosci 10: 237-268 (1987), e referências aí citadas). Noutras palavras, a ligação de um fármaco ou toxina a um local de neurotoxina particular pode ser sensível à ligação ao fármaco em não apenas naquele local, mas também noutros locais no canal. Trata-se de uma vantagem para um programa de rastreio de fármacos dado que para um dado ligando marcado, a probabilidade de se identificarem agentes que se ligam preferentemente a um PCS do SNP é acrescida.

As técnicas aqui descritas para medir a ligação do ligando marcado a um PCS do SNP da invenção em células intactas (por

exemplo, linhas celulares heterólogas que expressam PKI de PC12 ou PCS do SNP) em suspensão são semelhantes àquelas descritas previamente para a ligação de um radioligando a outros canais de sódio em preparações sinaptossomal do cérebro (ver por exemplo, Catterall et al., J. Biol. Chem. 256 (17): 8922-8927 (1981)). No entanto, é bem reconhecido pelos peritos na técnica que estas técnicas são modificadas do modo rotineiro para utilização de células ligadas a substrato ou preparações de células danificadas, com base nos ensinamentos e metodologias aqui apresentadas.

Crescem-se células A126-1B2, PC12, PK1-4 ou outras que expressam um PCS do SNP utilizando técnicas convencionais, e tratam-se opcionalmente com NGF durante 1-2 dias para induzir a expressão de PN-1. As células são recolhidas e testadas para a actividade de fluxo de iões com agentes de potencial alternativos.

Para ambos os radioligandos, as reacções de ligação são levadas a cabo, por exemplo, a 37°C e depois paradas. As amostras são rapidamente filtradas sob vácuo, lavadas com tampão gelado, e a radioactividade ligada é medida por contagem de cintilações.

O Fluxo de Iões testa directamente a capacidade de um potencial agente de PCS do SNP inibir ou aumentar a actividade de uma função PCS do SNP, através da sua capacidade de inibir ou aumentar o influxo de marcadores iónicos ao longo de um PCS do SNP.

A maioria dos estudos anteriores de canais de sódio utilizaram ²²Na como marcador (ver, por exemplo, Catterall et

al., J. Biol. Chem. 256(17):8922-8927 (1981)). No entanto, a elevada toxicidade de ^{22}Na pode ser uma desvantagem para a sua utilização em rastreio de fármacos de elevado débito. Uma alternativa menos tóxica é o ião guanidínio (^{14}C), cujo influxo se demonstrou ser um indicador fiável da abertura do canal de sódio (Reith, Europ. J. Pharmacol. 188: 33-41 (1990)). Deste modo, podem ser utilizados métodos de rotina para realizar o rastreio de compostos para modular a actividade de canal iónico de SCP do SNP. Adicionalmente, estes métodos são bem conhecidos por serem facilmente modificados para utilização com ^{22}Na . Do mesmo modo, estes passos de métodos conhecidos podem ser modificados para utilização com células ligadas a substratos ou vesículas preparadas a partir de células danificadas, de acordo com passos de métodos conhecidos.

Para o teste do fluxo de guanidínio os métodos para ^{22}Na são modificados daqueles de Reith (Europ. J. Pharmacol. 188: 33-41 (1990) para sinaptossomas), por exemplo, tal como descrito no Exemplo 2 abaixo. As alíquotas de uma suspensão celular contendo células heterólogas que expressam pelo menos uma PCS do SNP são incubadas durante 10 minutos a 37°C na presença de agentes que abrem canais (tipicamente, veratridina a $100\ \mu\text{M}$) e de fármacos em teste num volume total de $100\ \mu\text{M}$ ($0,20\text{-}0,25\ \text{mg}$ de proteína). O fluxo iónico é iniciado através da adição de solução HEPES/TRIS contendo $4\ \text{mM}$ de guanidina HCL (final) e $100\ \text{dpm/nmol}$ (^{14}C) guanidina. A reacção é continuada durante 30 segundos e é parada através da adição de tampão de incubação gelado, seguida pela filtração rápida sob vácuo num filtro Whatman GF/C. Os filtros são lavados rapidamente com tampão de incubação gelado e a radioactividade é determinada por contagem de cintilações. A assimilação não específica é

determinada em paralelo através da inclusão de 1 mM de terodotoxina tanto durante a pré-incubação como durante a assimilação.

Utilizando o teste do fluxo de guanidínio foram testados vários compostos substituídos metilo/halofenilo, tais como a lidoflazina (ver, por exemplo Merck Index Monograph 5311 e patente U.S. No. 3,267,104, ambas aqui inteiramente incorporadas por referência), verificando-se que inibiam a actividade de canais de sódio de pelo menos um PCS do SNP da presente invenção em linhas celulares que expressavam pelo menos um PCS do SNP, com um pIC50 de 6,51 para a lidoflazina em células PKI-4. Deste modo, a presente invenção proporciona agentes moduladores de PCS do SNP como piperazinas substituídas com metilo/halofenilo.

Exemplo 3:

Identificação da Sequência de PCS SNP Humana de uma Biblioteca de cADN do Sistema Nervoso Periférico Humano

De modo similar aos procedimentos apresentados no Exemplo 1, utilizou-se uma biblioteca de cADN do sistema nervoso periférico humano (como uma biblioteca DRG humana) para a amplificação por reacção em cadeia da polimerase (PCR). O PCR utilizou um iniciador 5' correspondente ao ADN que codifica para os 604-611 de SEQ ID NO:2, e um iniciador 3' correspondente que codifica para os aminoácidos 723-731 de SEQ ID NO:2.

A mistura reaccional de PCR consistiu em 5% do cADN, 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPSs, 0,5 µM de cada iniciador, Taq

polimerase (Perkin-Elmer) num tampão consistindo em 0,1 M KCl, 0,1 M TRIS HCl (pH 8,3) e gelatina (1 mg/ml). A reação foi levada a cabo num termociclador Perkin-Elmer como se segue: cinco ciclos de desnaturação (94°C, 1 min.), emparelhamento (37°C, 1 min.), e extensão (72°C, 1 min) seguindo-se 25 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min.), emparelhamento (50°C, 1 min.) e extensão (72°C, 1 min.).

Os produtos de PCR resultantes proporcionaram um cADN amplificado humano que codificava para os aminoácidos 646.658 de SEQ ID NO:2, tal como apresentados na Figura 11A-E.

Exemplo 4:

Clonagem e Sequenciação de uma Sequência PN-1 Humana de uma Biblioteca de cADN do Gânglios das Raízes Dorsais Humanas

Tal como nos exemplos 1 e 3 acima, são utilizados iniciadores adicionais de PCR correspondentes a SEQ ID NO:1 para isolar clones da biblioteca de cADN DRG humana que engloba a totalidade da região codificante de um ou mais PCS do SNP da presente invenção. Um iniciador 5' inclui a sequência 5' TTTGTGCCCCACAGACCCCAG 3' (SEQ ID NO: 17) e um iniciador 3' inclui a sequência 5' ACACAAATTCTTGATCTGGAATTGCT 3' (SEQ ID NO: 18) ou 5' CAACCTCAGACAGAGCAATGA 3' (SEQ ID NO: 19), que são utilizados para PCR "nested". De acordo com os Exemplos 1 e 3 acima, o PCR é executado para obter cADNs que codificam para um SCP do SNP humano.

Realiza-se PCR adicional "andando" 5' ou 3' da sequência correspondente ao produto de PCR acima. Deste modo, são

proporcionados os cADNs que englobam a totalidade da região codificante de um ou mais PCSs do SNP humanos.

Os clones cADN ou produtos de PCR adicionais, que codificam para a totalidade de PCS do SNP, são subclonados num vector plasmídico anteriormente restringido com locais de restrição adequados. Os clones são rastreados para inserções de cADN através de uma "miniprep" (Sambrook et al., *infra*) e sequencia-se em ambas as direcções por terminação de cadeia didesoxi (*kit* Sequenase 2.0, United States Biochemical). Os dados da sequência foram compilados e analisados utilizando o programa informático Genworks (Intelligenetics, Inc., Mountain View, CA). As sequências alternativas de aminoácidos esperadas para uma sequência PN1 humana são apresentadas na Figura 11 A-D e nas SEQ ID NOS:7, 11 e 12, em que Xaa representa 0, 1, 2, ou 3 aminoácidos.

Os transcritos da dimensão do resultante PCS do SNP são então confirmados com o presente para mRNA ou cADN de SNP humano (codificando para uma sequência de 1970-1990 aminoácidos da Figura 11A-E). No entanto, tal como no Exemplo 1, não se espera que tais transcritos sejam detectados em mRNA do cérebro. Este resultado esperado confirma novos membros humanos da família de genes de canais de sódio (denominados Nervo Periférico Humano do tipo I (HUMPNI1A e HUMPNI1B da Figura 11A-E, em que X é 0, 1, 2 ou 3 do mesmo ou de aminoácidos diferentes).

As sequências completas de ADN e de aminoácidos de PN1s humanos inéditos são então confirmadas e espera-se que contenham todas as características de domínio estruturais e

funcionais de uma subunidade α de um canal de sódio sensível à voltagem de mamífero.

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipéptido isolado de um canal de sódio específico do sistema nervoso periférico (SNP), polipéptido esse que:

(i) compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade com a FIGURA 7 (sequência de aminoácidos); e

(ii) forma um canal de sódio sensível à voltagem do tipo I do SNP capaz de transportar iões de sódio quando o polipéptido é expresso em ovócitos de *Xenopus*.

2. O polipéptido da Reivindicação 1, compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade em relação à FIGURA 7 (sequência de aminoácidos).

3. O polipéptido da Reivindicação 1, compreendendo uma sequência de aminoácidos da FIGURA 7 (sequência de aminoácidos).

4. Um anticorpo que se liga a um epitopo específico para um péptido de acordo com a Reivindicação 2.

5. O anticorpo de acordo com a Reivindicação 4, em que o referido anticorpo é um anticorpo detectável que tem uma marcação que pode ser detectada ou que se liga a uma marcação que pode ser detectada.

6. Uma célula hospedeira que produz um anticorpo de acordo com a Reivindicação 4.

Uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo:

(A) uma sequência polinucleotídica que codifica para uma sequência de aminoácidos, que tem pelo menos 90% de identidade com a FIGURA 7 e que forma um canal de sódio do tipo I sensível à voltagem do sistema nervoso periférico (SNP) capaz de transportar iões sódio quando o polinucleótido é expresso em ovócitos de *Xenopus*; ou

(B) uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência polinucleotídica que codifica para um polipéptido de canal de sódio do sistema nervoso periférico da FIGURA 7 (sequência de aminoácidos).

8. Uma molécula de ácido nucleico compreendendo a sequência complementar à sequência polinucleotídica de comprimento total apresentada na Reivindicação 7(B).

9. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a Reivindicação 7 compreendendo uma sequência polinucleotídica da FIGURA 7 (sequência de ácido nucleico).

10. Um método para a produção de um vector recombinante compreendendo a inserção de um ácido nucleico da Reivindicação 7 num vector.

11. Um vector recombinante compreendendo o ácido nucleico da Reivindicação 7,

12. Um método para a produção de uma célula hospedeira recombinante cultivada introduzindo o vector recombinante da Reivindicação 11 numa célula hospedeira cultivada.

13. Uma célula hospedeira cultivada compreendendo o vector da Reivindicação 11.

14. Um virião recombinante compreendendo o ácido nucleico da Reivindicação 7.

15. Um método para a produção recombinante de um polipéptido, compreendendo os passos de:

(i) introdução do vector da Reivindicação 11 numa célula hospedeira;

(ii) cultura da célula hospedeira sob condições que permitam a expressão do polipéptido do vector; e

(iii) isolamento do polipéptido.

16. Um ensaio biológico para aferir candidato a agente de modulação de um polipéptido de canal de sódio (PCS) do sistema nervoso periférico, compreendendo:

(A) contactar o agente candidato com uma linha celular que expresse na membrana celular da referida célula o referido PCS do sistema nervoso periférico, em que o referido PCS compreende uma sequência de aminoácido da FIGURA 7 (sequência de aminoácido); e

(B) avaliar a modulação da actividade biológica do CS da referida célula mediada pelo referido contactar do referido agente candidato.

17. O teste biológico de acordo com a Reivindicação 16, em que a referida linha celular é escolhida de células do feocromocitoma (PC12) ou uma forma recombinante destes, compreendendo um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 7.

18. Uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 7, ou um ácido nucleico antisense complementar ao comprimento total deste e um veículo farmacêuticamente aceitável.

PN I
Tipo II

ATAGTGAACACAGCTGGTTTGAAGCTTCATCGTTCATGATCCTGCTCAGCAGTGGAGCTCTGGCTTTTGAA 75
I V E H S N F H S F I V L K I L L S S G A L A F E
I V E H N W F H T F I V -----
GATATCTATATTCGAAAGACAAAAGACCATTAAAGATTATCTGGAATATCTGACAAGATATTCACTACATCTTC 150
D I Y I E K R K T I K I I L E Y A D K I F T Y I F

ATCTCGAAATGCTTCTAAATGGGTGCAATATGGGTATAAAACATATTTCACCTAATGCGCTGGTGTGGCTGGAC 225
I L E H L L K W V X Y G Y K T Y F T N A W C W L D

TCTTAATGTTGATGTGTCTCTAGTTACTTTAGTAGCCACACACTTTGCTACTCAGACCTTGGCCCCATTAA 300
P L I V D V S L V T L V A N T L G Y S D L G F I K

TCTCTAGGACACTGAGGGCCCTAAGACCCCTAAGAGCCCTGTCTAGATTGAAAGCAATGAGGGTACTGCTCAC 375
S L R T L R A L R F L R A L S R F E G M R V V V H
F E G M R V

GCCTCTATAGGAGCAATCCCTTCCATCATGAACCTGCTTCTGCTGCTTATATCTGCTGCTAATATTAGCATC 450
A L I G A I F R I H N V L L V C L I P W L I F S I

ATGGGAGTCAATCTCTTTCTGCTGCAAGTTCATGAGTGTCTCAGACCCACCGATGGGTCACCAATTTCTACATCT 525
M G V N L F A G K F Y E C V H T T D C S R F F T S

CAAGTTCGAAACCCCTTCTGAGTCTTTTGGCTGATGACCTTACTGCAATGTCGGATGGGAAACCTGAAAGTA 600
Q V A N R S E C F A L N N V S G H V R W K N L R V

AAGTTCGACACAGCTTGGCTTGGTTAAGTGTGCTGCTCAAGTTCGCAACATTCAGGGCTGGATGGATATTATG 675
N F D N V G L G Y L S L L Q V A T F K G W H D I N

TATCCAGCAGTTGACTCTGTTAATGTAAATGAACAGCCGAAATACGAAATACAGTCTCTACAGTTACTTTACTTT 750
Y A A V D S V N V N E Q P K Y E Y S L Y N Y I Y F

GTATCTTCATCATCTTGGGCTCATCTTCAAGTTCGAACTGTTTCAATGGGTTCATCAAGATATTTCACCCAA 825
V I F I I F G S F F T L N L F I G V I I D N F H Q

CAGAAAAGAGCTTGGAGGTCAGATATCTTTATGACAGAGACCGAGAAATACTATATGCAATGAAAGAG 900
Q K K K L G G O D I F M T E E Q K K Y Y N A H K K

CTTGGGTCCAAAACCCACAAAACCAATTCCAAGGCCAGGAAACAAATTCACAGGATGTTATATTTCAC 969
L G S K K F Q K F I P R P G H K F Q C C I F D

Figura 1

SCG

DRG

4A

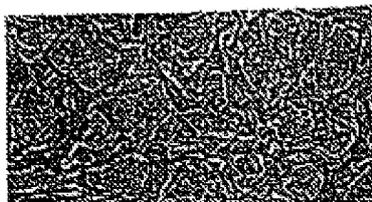


PNI

4B

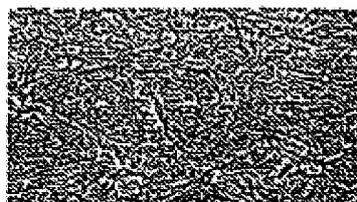


4C



PNI
(Unlabeled)

4D



4E



Type II

4F



Figuras 4A a 4F

Sonda de Gel Sonda Sonda
de Na Específica Específica
Conservado para PN1 para o Tipo I

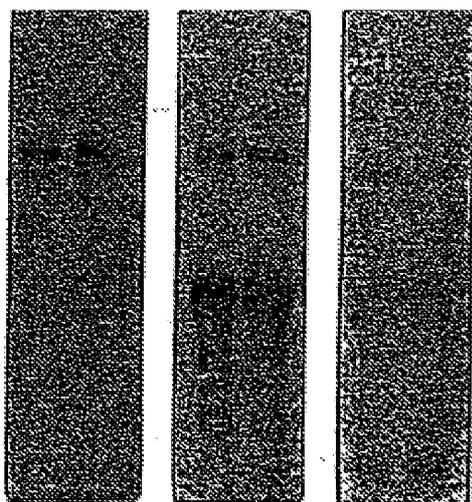
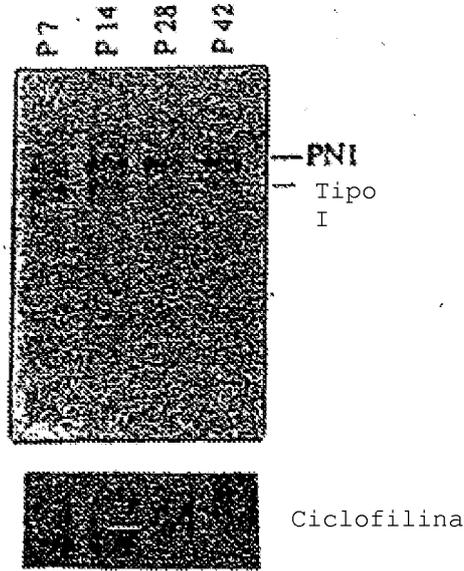
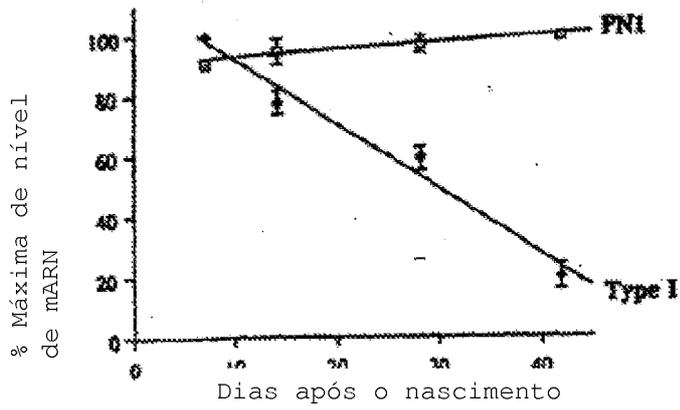


Figura 5

6A



6B



(-30.26
-14.12 SE)

Figura 6A e 6B

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGGAACTTG	TGGTCTGAA	CCGTTCCTG	GCTCTTTTC	TGAGTTCCT	50
R N L V	V L N	L F L	A L L L	S S F	
TAGTTCGAC	AATCTTACG	CAATTCAGG	AGACACCGAT	GCAAACAACC	100
S S D	N L T A	I E E	D T D	A N N L	
TCCAGTTCG	AGTGGCCAG	ATTAGAGGG	GAATCAATTA	CGTGAACAG	150
Q I A	V A R	I K R G	I N Y	V K Q	
ACCCTGGTG	AATTCATTT	AAATTCATTT	TOCAAAAAGC	CAAAGGGCTC	200
T L R E	F I L	K S F	S K K P	K G S	
CAAGGACCA	AAACGACAG	CAGTCCCAA	CAACAGAAA	GAAACTATA	250
K D T	K R T A	D P N	N K K	E N Y I	
TTTCAAACG	TACCCCTGG	GAGATGAGC	AGGATCACAA	TTTCTCAAA	300
S N R	T L A	E M S K	D H N	F L K	
GAAAGGATA	GGATCAGTG	TATGGCAGC	AGTCTAGACA	AAAGCTTTAT	350
E K D R	I S G	Y G S	S L D K	S F M	
GGATGAANT	GATACAGAT	CCCTTTCCT	TAAACCCAGC	CCTACAGTGA	400
D E N	D Y Q S	F I H	N P S	L T V T	
CAGTCCANT	TGCACCTGG	GAGTCTGAT	TGGAGATTAT	GAACACAGAA	450
V P I	A P G	E S D L	E I M	N T E	
GAGCTTAGC	GTAGCTCAG	CAGTACTAC	AGCAAGACA	AACCGAACCG	500
E L S S	D S D	S D Y	S K E K	R N R	
ATCAAGCTCT	TCTAGTGGC	GCACTGTGA	CAACCCCTCG	CCAGGAGAG	550
S S S	S E C S	T V D	N P L	P G E E	
AGGAGGCTG	AGCAGAGCC	GTAAGGCGC	ATGAGCCCTG	AGCCTGCTTT	600
E A E	A E P	V N A D	E P E	A C F	
ACAGATGGT	GTTGAGGAG	ATTTCATTC	TGCCAAGTDA	ATGTAGACTC	650
T D G C	V R R	F P C	C Q V N	V D S	
TGGAAAGGG	AAAGTTTGG	GGACCATCAG	GAAGAGGTC	TACAGGATAG	700
G K G	K V W W	T I R	K T C	Y R I V	
TTGAACACG	CTGGTTTGA	AGCTTCATG	TTCTCATGAT	CTGCTCAGC	750
E H S	W F E	S F I V	L H I	L L S	
AGTGGAGCT	TGGCTTTTGA	AGTATCTAT	ATTGAAACA	AAAAGACCAT	800
S G A L	A F E	D I Y	I E K K	K T I	
TAGATTTAT	CTGGAGTATG	CTACACAGAT	ATTCACCTAC	ATCTTCATTC	850
K I I	L E Y A	D K I	F T Y	I F I L	
TGGAANTGCT	TCTAAANTGG	GTCGATATG	GGTATAAAC	ATATTTCACT	900
E M L	L K W	V A Y G	Y K T	Y F T	
ATGGCCCTGG	GTGGCCGGA	CTCTTAATTT	GTGAGTGGT	CTCTAGTTC	950
N A W C	W L D	F L I	V D V S	L V T	

Figura 7A

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TTTAGTAGCC	AACACTCTTG	GCTACTCAGA	CCTTGGCCCC	ATTAAATCTC	1000
L V A N T L G	Y S D L G P	I K S L			
TACGGACTCT	GAGGGCCCCA	AGACCCCTAA	GAGCCTTGTC	TAGATTGAA	1050
R T L R A L	R P L R A L	S R F E			
GGANTGAGGG	TAGTGGTCAA	CGCACTCATA	GGAGCAATTC	CTTCCATCAT	1100
G M R V V V N	A L I G A I P	S I M			
GAAGTGGCTT	CTGGTGGCC	TATATCTCTG	GCTAATTTTT	AGCATCATGG	1150
N V L L V C L	I F W L I F	S I M G			
GAGTCAATCT	GTTTGTGGC	AAGTCTATG	AGTGTGTCAA	CACCACCTAT	1200
V N L F A G	K F Y E C V N	T T D			
GGTACCGAT	TTCCTACTC	TCAAGTTGCA	AACCGTCTG	AGTGTGTTC	1250
G S R F P T S	Q V A N R S E	C F A			
CCTGATGAC	GTTAGTGGAA	ATGTCCGATG	GAAAACTG	AAAGTAACT	1300
L M N V S G N	V R W K N L	K V N F			
TGCACAAGGT	TGGGCTTGGT	TACCTGTGGC	TCTTCAAGT	TGCACATTC	1350
D N V G L G	Y L S L L Q V	A T F			
AAGGCTCGA	TGCATATAT	GTATGCAGCA	GTGTACTCTG	TATATGAAA	1400
K G W M D I M	Y A A V D S V	N V N			
TGCACAGCTG	AANTACCAT	ACAGTCTCA	CAATGACATT	TACTTGTCA	1450
E Q P K Y E Y	S L Y M Y I	Y F V I			
TCTTCTCAT	CTTGGCTCA	TCTTCAAGT	TGAACCTGTT	CAATGGTGT	1500
F I I F G S	F F T L N L F	I G V			
ATCTATGTA	ATTTCAACCA	ACAGAAAAA	AAGCTTGGAG	GTCAGATAT	1550
I I D N F N Q	Q K K K L G G	Q D I			
CTTATGACA	GAAGAACGA	AGAAATACTA	TATGCAATG	AAGAACCTG	1600
F M T E E Q K	K Y Y N A M	K K L G			
GGTCCAAAAA	ACCACAAAAA	CCATTTCCAA	GGCCAGGGAA	CAATTTCCAA	1650
S K K P Q K	P I P R P G N	K F Q			
GGATGATAT	TIGACTTAGT	GACAAACCA	GCTTTGATA	TCACATCAT	1700
G C I F D L V	T N Q A F D I	T I M			
GGTCTTATA	TGCCCAACA	TGGTACCAT	GATGGTAGAA	AAAGAGGGC	1750
V L I C L N M	V T M M V E	K E G Q			
AAACTGAGTA	CAATGATAT	GTTTACACT	GGATCAACAT	GGTCTTACT	1800
T E Y M D Y	V L H W I N M	V F I			
ATCCCTGTA	CIGGGGAGTG	TGTCTGAG	CTAATCTCC	TCAGACATA	1850
I L F T G E C	V L K L I S L	R H Y			
CACTTCACT	GIGGGTGA	ACATTTGTA	TTTGTGTA	GIGTCTCT	1900
Y F T V G W N	I L Y F V V	V I L S			

Figura 7B

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCATGTGAGG	AMGTTTCCTC	GCTGAGATGA	TAGAGAAGTA	TTTCGTGTCC	1950
I V G	M F L	A E M I	E K Y	F V S	
CCTACCCCTGT	TOGGAGTCAT	CCGCTCTGGCC	AGGATTTGGAC	GAATCCTACG	2000
P T L F	R V I	R L A	R I G R	I L R	
CCTGATCAAA	CGCGCCAAGG	GGATCCGGCAC	TCTGCTCTTT	GCTTTGATGA	2050
L I K	G A K G	I R T	L L F	A L M M	
TGTODCTTCC	TGCGCTGTTC	AACATCGGCC	TCTGCTTTTT	CCTGGTCTTG	2100
S L P	A L F	N I G L	L L F	L V M	
TTGATCTACG	CCATCTTTGG	GATGTCCAAC	TTTGCCCTACG	TTAAAAAGGA	2150
F I Y A	I F G	M S N	F A Y V	K K E	
CGCTGGAAAT	AATGACATGT	TCAACTTTGA	GACTTTTGGC	AACAGCATGA	2200
A G I	N D M F	N F E	T F G	N S M I	
TCTGCTGTGT	CCAAMTCACC	ACCTCTGGCG	GCTGGGAGGG	ACTGCTGGCC	2250
C L F	Q I T	T S A G	W D G	L L A	
CCCATCTTCA	ACAGCGCAC	TCCTGACTGT	GACCTTAAA	AAGTTCACCC	2300
P I L N	S A P	P D C	D P K K	V H P	
AGGAAGTICA	GTCGAGGGG	ACTGTGGGAA	CCCATCCGTG	GGGATTTTTT	2350
G S S	V E G D	C G N	P S V	G I F Y	
ACTGTGTGAG	CTACATCATC	ATATCTCTCC	TGGTGGTGGT	GAACATGTAC	2400
F V S	Y I I	I S F L	V V V	N M Y	
ATGCGTGTCA	TCCTGGAGAA	CTTCAGGGTC	CCCACCGAAG	AGAGCACCTGA	2450
I A V I	L E N	F S V	A T E E	S T E	
GCTCTCTAGT	GAGCAGCACT	TTGAGATGTT	CTACGAGGTC	TGGGAGAGTT	2500
P L S	E D D F	E M F	Y E V	W E K F	
TCGACCTTGA	CGCCACTCAG	TTCTATAGAT	TCTGCAAGCT	CTCTGACTTT	2550
D P D	A T Q	F I E F	C K L	S D F	
GCAGCTGGCC	TGCTCTCTCC	CCTCTCTATC	GCAAAGCCAA	ACAAAGTCCA	2600
A A A L	D P P	L L I	A K P N	K V Q	
GCTCATCTCC	ATGGACCTGC	CCATGGTGGAG	TGGAGACGGC	ATCCACTTCC	2650
L I A	M D L P	M V S	G D R	I H C L	
TGGACATCTT	GTTTCTTTTT	ACAAAGGGG	TCTTGGGTGA	GGGTGGAGAG	2700
D I L	F A F	T K R V	L G E	G G E	
ATGGATCTCT	TTGGTTCACA	GATGGAAGAA	AGGTTCAATG	CAGCCATCC	2750
M D S L	R S Q	M E E	R F M S	A N P	
TTCTAAAGTG	TCCTATGAC	CCATCAAGNC	CACACTGAAG	AGAAAACAAG	2800
S K V	S Y E P	I T T	T L K	R K Q-E	
AGGAGGTGTC	CCCGACTATC	ATTCAAGGGG	CTTACAGAGG	GATTCGGCTC	2850
E V S	A T I	I Q R A	Y R R	Y R L	

Figura 7C

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGCAACACCG	TCAAGAYTAT	ATCGAGTATA	TACATAAAAG	ATGGAGACAG	2900
R Q H V	K N I S	S I Y I	K D G D	R	
GGATGATGAT	TTGCCCAATA	AAGAAGATAC	AGTTTTTIGAT	AACGTCGACG	2950
D D D	L P N K	E D T	V F D	N V N E	
AGAACTCAAG	TCCGAAAAG	ACAGATGTAA	CTGCCICAC	CATCTCCCA	3000
N S S	P E K	T D V	T A S	T I S P	
CCCTCCATG	ACAGTGTAC	AAAGCCAGAT	CAA		3033
P S Y D	S V T	K F D	Q		

Figura 7D

PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	MARSVLVPPG	PDSFRFTRE	SLAAIEQRIA	EKAKRPKQE	RKUEDDENG	50
Consensus	50
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	KPNSDLEAGK	SLPFIYGDIP	PEMVSEPLED	LDPYIINKKT	FIVLNKRGKAI	100
Consensus	100
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	SRFSATSALY	ILTPFNPIRK	LAKILVHSL	FNVLINCTIL	TNCVFTMSN	150
Consensus	150
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	PFDWTKNVEY	TFTGIYTFES	LIKILARGPC	LEDFTFLRNP	WMLDFTVIT	200
Consensus	200
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	FAYVTEFVNL	GNVSALRTER	VLRALKTISV	IPGLKTIWGA	LIQSVKRLSD	250
Consensus	250
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	VMILTVFCLS	VFALIGLQLF	KSNLRNKCLQ	WPPDNSTPEI	NITSFTMNSL	300
Consensus	300
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	DWNGTAFNRT	VNMFWDEYI	EDKSHFYFLE	GONDALICGN	SSDAGQCPDG	350
Consensus	350
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	YICVKAGRNP	NYGYTSPDTF	SWAFLSLFRL	HTQDFWENLY	QLTLAAGKT	400
Consensus	400
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	YMIFFVLVIF	LGSFYLINLI	LAVVAMAYEE	QIQATLEEAR	QKEAEFQQL	450
Consensus	450
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	EQLKKOQEEA	QAAAAAASAE	SHDFSGAGGI	GVFSESSVA	SKLSKSEKE	500
Consensus	500

Figura 8^a

PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	MARSVLVPPG	PDSFRFFTRE	SLAAIEQRIA	EEKAKRPRQE	REDEDDENGF	50
Consensus	50
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	KFNSDLEAGK	SLPFIYGDIP	PEMVSEPLED	LDPHYINKKI	FIVLNKKGAI	100
Consensus	100
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	SRSATSALY	ILTPFNPIRK	LAIKILVHSL	FNVLIMCTIL	TNCVPMMSN	150
Consensus	150
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	PPDWTQWVEY	TPTGIYTPES	LIKILARGPC	LEDFTFLRMP	WNMLDFTVIT	200
Consensus	200
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	FAYVTEFVHL	GNSALRTRR	VLRALKTISV	IPGLKTTVGA	LIQSVKQLSD	250
Consensus	250
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	VMILTVFCLS	VFALIGLQLF	MGNLNRNCLQ	WPPENSTFEI	NITSFFMNSL	300
Consensus	300
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	DWNGTAFNRT	VNHFWDEYI	EDKSHFYFLE	GONDALLCGN	SSDAGQCPEG	350
Consensus	350
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	YICVKAGENP	NYGTTSPDIF	SWAFSLFEL	MTQDFWENLY	QLTLBAAGKY	400
Consensus	400
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	YNIFFVLVIF	LGSFYLINLI	LAVVAMAYEE	ONQATLEEAE	QKEAEFOONL	450
Consensus	450
PN1 T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	EQLKKQEEA	QAAAAAASAE	SRDFSGAGGI	GVSSESSEVA	SRLSKSEKE	500
Consensus	500

Figura 8B

PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	LKNRRKXKKQ	KEQAGEEKE	DAVRKASAE	SIRKXGFOFS	LEGSRLTYEK	550
Consensus	550
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	RFSSPHQSL	SIRGSLFSP	RNSRASLNF	RGRVKDIGSE	NDFADENST	600
Consensus	600
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	FEDNSRRDS	LPVPRRGER	RPSNVQASR	ASRGIPFLM	NGRMHSAVDC	650
Consensus	650
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	NGVSLVGGP	SALTSPVQL	LPFGTTETE	IRKRSSSYH	VSMLELDP	700
Consensus	700
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	RQRAMMASI	LWTNEELE	ERQKPCPNY	KFANCLLWD	CKKPKLVKH	750
Consensus	750
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	VVNLVMDPF	VDLATTICIV	LNTLFNAHE	YPMTEQSSV	LSVGNLVFTG	800
Consensus	800
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	IPTAEMFLKI	IAMDPTTFO	EGNIFDGI	VLSLMEGL	ANVEGLSVLR	850
Consensus	850
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	SFRLLRVFKL	AKSWPTLML	IKIIGNSVGA	LGNLTLVLA	IVFIFAVGN	900
Consensus	900
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	QLFGKSYKEC	VCKISNDCEL	FRWMSHFFH	SFLIVVLC	GENIETHMDC	950
Consensus	950
PNI T	-----	-----	-----	-----	-----	
RNSCPIIR T	MEVAGQTMCL	TVPMMVNVIG				31
Consensus				1000

Figura 8C

PNI T		81
RNSCPIIR T		1050
Consensus		1050
PNI T		130
RNSCPIIR T		1100
Consensus		1100
PNI T		180
RNSCPIIR T		1150
Consensus		1150
PNI T		229
RNSCPIIR T		1200
Consensus		1200
PNI T		279
RNSCPIIR T		1250
Consensus		1250
PNI T		329
RNSCPIIR T		1300
Consensus		1300
PNI T		379
RNSCPIIR T		1350
Consensus		1350
PNI T		429
RNSCPIIR T		1400
Consensus		1400
PNI T		479
RNSCPIIR T		1450
Consensus		1450
PNI T		529
RNSCPIIR T		1500
Consensus		1500

Figura 8D

PNI T		579
RNSCPIIR T		1550
Consensus		1350
PNI T		629
RNSCPIIR T		1600
Consensus		1600
PNI T		679
RNSCPIIR T		1650
Consensus		1650
PNI T		729
RNSCPIIR T		1700
Consensus		1700
PNI T		779
RNSCPIIR T		1750
Consensus		1750
PNI T		829
RNSCPIIR T		1800
Consensus		1800
PNI T		879
RNSCPIIR T		1850
Consensus		1850
PNI T		929
RNSCPIIR T		1900
Consensus		1900
PNI T		978
RNSCPIIR T		1950
Consensus		1950
PNI T		1011
RNSCPIIR T		2000
Consensus		2000

Figura 8E

EN1 T	*****	1011
RNSCFIR T	RESKK	2005
Consensus	*****	2005

Figura 8F

GTGCGCTCAT	CCTGAGCAGA	CTGGAAACAG	ACTCCGTCBA	GGCCTGGCCC	50
GGGCTCCAST	TGGACTGTA	GGTTTTGAT	TCTGCCCCAC	TGGCGAGACT	100
GGGCTGAGST	AGCCTGGGTA	TCCACGATTC	GCGACTCGTA	GTAAACAGCC	150
CTCTGAGCAA	CAGGATTTCA	GAGAAAGAA	CAGAGGCAAG	AAAGAAGCCT	200
GGGAGAGAG	GAAGACTTTC	CTTGGATCAG	ACTCCGCAAG	TGCACACACC	250
GGGTGGGCAT	GATCCGTTGG	GCCAGGCCCTC	TTAGGTRAGG	ACTCAAGGGG	300
GAATATAAAC	ATACAGGATG	AAAGAATGGC	GATGCTGCTT	CCTCCAGGAC	350
CTCAGAGTTT	CGTTCAGTTC	ACAAACAGST	CCCTTGCCCT	CAITGAAACG	400
CGYATTTCTG	ARGAALAGC	CARGGACAC	AANGACGAA	AGAAAGATGA	450
TGAGGAGAA	GGCCCAAGC	CCACCACTGA	CTTGGAGCT	GGGAACAGC	500
TCCCTTCAT	CTATGGAGAC	ATTCGCCCTG	GAATGGTGT	AGAGCCCTTG	550
GAGGACCTGG	ACCCATACTA	TGCTCACAAA	AAACTTTTA	TAGTATGAA	600
CAAGGGAA	GCATCTTCC	GTTCAGGC	CACCCCTGT	TGTACATGC	650
TGCTCCCTT	CAGTCCCTTA	AGNAGAATAT	CTATTAAGAT	CTTAGTGAC	700
TGCTTATTCA	GCATGCTAAT	CATGTGCACA	ATTCTGAGCA	ACTGCATATT	750
CATGACCTTG	AGCAACCCCTC	CAGAAATGGAC	CAAAAATGTA	GGGTACACTT	800
TTACTGGGAT	ATATACTTTT	GAATCACTCA	TAAAATCCT	TCCAGAGGC	850
TTTTGGGTGG	GAGAAATTCAC	CTTCTCCCT	GACCCCTGGA	ACTGGCTGGA	900
CTTTGTGTGC	ATGTTTTTTC	CGYATTTAAC	AGAATTTGTA	AACCTTAGCCA	950
ATGTTTCAGC	TCTTGGAACT	TTCCAGATCT	TGABASCTTT	GAAAACTATT	1000
TCTGTAATCC	CAGGACTAAA	GACCATGCTG	GGGGCCCTGA	TCCAGTCAAT	1050
GAGAGGCTC	TCTGACGTC	TGATCTCTAC	TGTGTTCTGT	CTCAGTGTGT	1100
TTGCACTAAT	TGACTACAG	CTTTTTATGG	GCAACTTGA	GCATAAATGT	1150
TTCCGGAGGG	AACCTGABGA	GAATGAACA	TGAGAAATGA	TGATGAATAC	1200
TGCTGAGAT	GAGAAAGAT	TGAAAAATA	TTTTTATTAC	TGGAGGGAT	1250
CCAAAGATGC	TCTACTCTGC	GGCTTCAGCA	CAGATTCAGG	GCATGTGCC	1300
GAGGCTTACA	TCTGTGTGAA	GGCTGGCAGA	AACCCGGAT	ATGGCTACAC	1350
GAGCTTTGAC	ACATTCAGCT	GGCCTTCTT	GGCCTTGT	CGCTAATGA	1400
CTCAGGCTA	CTGGGAGAC	CTTTACCAC	AGACTCTGCG	TGCTGCTGGC	1450
AAAGACTACA	TGATTTTCTT	TGTGTGTTT	ATTTTCTGG	GCCTCTTTA	1500
CGTGTAAAC	TTGATCTGCG	CTGTGTGAGC	CATGGCTTAT	GAGGAACAGA	1550
ACCAGGCCAA	CATCGAAGAA	GCTAAACAGA	AGAGTTCAGA	ATTTCCAGCG	1600
ATGTTAGACC	GACTCAAAAA	GGAGCAGGAA	GAGCTGAGG	CGATGCTGTC	1650
AGCTGCTGCT	GAGTTCAAGA	GTATAGGGCG	GAGCGGATC	ATGGACTCT	1700
CTGAGGCTC	TTCAGAAACE	TCCAGGCTGA	GCTCAAGAG	TGCCAAGGG	1750
AGAGAAACC	GAAGAAAGAA	AAAGAAACAG	AGAGTTCGA	GTCGCGAGGA	1800
AAAGGCTGAC	GATGAGAAAG	TGTCAGATC	AGATTCAGG	GAAGACTTCC	1850
GAAGAAAG	CTTCCATCTC	GTGTGGAGG	GGCACCAGC	GACCCGGAA	1900
AAAGGCTGCT	CCACCCCAA	CCATGCGCA	CTCAGCATTC	GGGGTCCCT	1950
GTTTTCTGCC	AGCCGCAACA	GCAGGACAG	TCTCTTCAGT	TTTAAAGGGC	2000
GAGAAAGAA	TCTGGATCT	GAGACGAT	TGCTGATGA	TGAGCATAGC	2050
ATTTTGGAG	ACACAGAGAG	CAGAAAGGCT	TCACTACTCG	TACCCCATAG	2100
ACCCGGGAG	CGCCGCAACA	GTACATGAG	TCAAGCCAGT	AGGTCCCGCC	2150
CAGTCTTACC	GTTGAAAGGG	AGATTCACA	GTCAGTGGG	CTGCATGGA	2200
CTGTGTGTC	TTGTTGATGG	ACCTTCAGCC	CTCATGCTCC	CCATGAGCA	2250
GCTTCTTCCA	GAGTGAATA	TAGATAAGGC	AACCTTCCAG	GACAGCGGCA	2300
CGACTAATCA	GATGCCCAA	AAAGGCTCT	CTAGTTCTTA	CTTCTGTCT	2350
GAGGACATGC	TGATGACCC	GCATCTCAGG	CAAAAGCCCA	TGAGCAGGGC	2400
GAGCATACTG	ACCAACACTG	TGGAAGAACT	TGAAAGAACT	AGACAAAAT	2450
GTACCCAGTT	GTGTACAGA	TTTCTCACA	CATTTTTAAT	CTGGAATTC	2500
TCTCCATATT	GCATAAAAT	CAAAAAGCTC	ATCTATTTA	TTGTAATGA	2550
TGCTTTTGTG	GAICTTSCAA	TTACCATTTG	CATAGTTTA	AACACCTTAT	2600
TTATGGCTAT	GGAGCAGCC	CCAAATGACTG	AAAGATTCAA	AAATGCTCTT	2650
GCAGTGGGA	ACTTGATCTT	TACAGGGATC	TTCCAGCTG	AAATGGTACT	2700
GAAGTAAAT	GCCATGGACC	CCATGAGTA	TTTCCAGTA	GGTGGAAATA	2750
TTTTTGACAG	CCIAATTTG	ACGCTGAGTT	TGATAGAGCT	TTTCTTAGCA	2800
GATGTTGAG	GATTATCACT	TCTGCGTCA	TTCCAGATTC	TCCGACTCTT	2850
CAAGTTGGCA	AAGTCCCTGGC	CCCACTGAA	CATGCTCAT	AAGATCATGG	2900
GCACCTCGGT	GGGCGCTG	GGCAACCTGA	CCCTGCTCT	GGCCTCATC	2950
GTCTTCATTT	TTCCCGTGT	CGCATGCGG	CTGTTTGGAA	AGAGCTACAA	3000
GCAGTGTGTC	TGCAAGATCA	ATGTGGACTG	CAGGCTGCG	CCCTGGCACA	3050
TGAAAGACTT	CTTCCACTCC	TTCTCATCG	TGTTCCAGT	GCTGTTGGG	3100
GAGTGGATAG	AGCCCATGTC	GGACTGCATG	GAGTGCAGG	CCCAAGCCT	3150
GTGCTTATT	GTTFACATGA	TGCTCATGCT	GATTTGGGAC	CTTGTGCTCC	3200
TGAAGCTGTT	TCTGGCTCTT	TGCTGAGTT	CCTTTAGTTC	TGACAACTT	3250
ACAGCAATTC	AGAAAGACAC	CGATGCACAC	AACCTCCAG	TCCAGTGGC	3300
CAGAAATAG	AGGGAAATCA	ATTACCTGAA	ACAGACCTG	CGTGAATTC	3350
TTCAAAATC	ATTTCCAAA	AAGCCAAAGG	GCTCCAGGA	CACAAAACGA	3400

Figura 9A

ACCCAGATC	CCACACAAA	GAAGAARAC	TATATTTCAA	ACCTACCTT	3450
TCCCGAGATG	AGCAAGGATC	ACAAATTTCT	CAAAGAAAAG	GATAGGATCA	3500
GTGGTTATGG	CAGCAGTCTA	GACAAAAGCT	TTATGGATGA	AAATGATTAC	3550
CAGTCCTTTA	TCCATAACCC	CAGCCTCACA	GTGACAGTGC	CAATTGCACC	3600
TCCGGAGTCT	GATTTGAGCA	TTATGAACAC	AGAAGAGCTT	AGCAGTGAAT	3650
CAGACAGTGA	CTACAGCAAA	GAGAAACCGA	ACCEATCAAG	CTCTTCTGAG	3700
TGCAGCACTG	TTGACAAACC	TCTGCCAGGA	GAAGAGGAGG	CTGAAGCAGA	3750
GCCCGTAAC	GCAGATGAGC	CTGAAGCCTG	CTTTACAGAT	GGTTGTGTGA	3800
GGAGATTTCC	ATGCTGCCAR	GTTAATGTAG	ACTCTGGGAA	AGGGAAAGTT	3850
TGGTGGACCA	TCAGCAAGAC	GTGCTACAGG	ATATTTGAAC	ACAGCTGGTT	3900
TGAAAGCTTC	ATCCTTCTCA	TGATCCCTCT	CAGCAGTGGG	GCTCTGGCTT	3950
TTGAAGATAT	CTATATTTGA	AAGAAAAGA	CCATTAAGAT	TATCCTGGAG	4000
TATGCTGACA	AGATATTCAC	CTACATCTTC	ATTCTGGAAA	TGCTTCTAAA	4050
ATGGGTCCCA	TATGGGTATA	AAACATATTT	CACTARTGCC	TGGTGTGGC	4100
TGGACTTCTT	AATTTGTTAT	GTGTCTCTAG	TTACTTTAGT	AGCCAACACT	4150
CTTGGCTACT	CAGACCTTGG	CCCCATTAAA	TCTCTACCGA	CACAGAGGCG	4200
CCTAAGACCC	CTAAGAGCCT	TGTCTAGATT	TGAAGGATG	AGGGTATGG	4250
TCAAAGCACT	CATAGGAGCA	ATGCTTTCCA	TCATGAACST	GCTTCTGGTG	4300
TGCCTTATAT	TCTGGCTAAT	ATTTAGCATC	ATGGGATGCA	ATCTGTTTGC	4350
TGGCAAGTTC	TATGAGTGTG	TCAACACCAC	CGATGGCTCA	CGATTTCTTA	4400
CATCTCAAGT	TGCAAACTCT	TCTGAGTGTT	TTGCCCTGAT	GAAGCTTAGT	4450
GGAGATGTGC	GATGGAAAAG	CCTGAAAGTA	AACCTCGACR	ACCTTGGGCT	4500
TGGTTACCTG	TCCCTGCTTC	AAGTTCCAAC	ATTCAGGGCC	TGGATGGATA	4550
TTATGTATGC	AGCAATGAC	TCTGTTAATG	TAAATGACCA	GCCGAATAC	4600
GAATACAGTC	TCTACATGTA	CATTTACTTT	GTCACTTCA	TCACTCTGG	4650
CTCATCTCTC	ACTTTGAACC	TGTTCTTTGG	TGTCATATA	GATATTTTCA	4700
ACCAACAGAA	AAAAAAGCTT	GGAGTCAAG	ATATCTTTAT	GACAGAGAAA	4750
CAGAGAAAT	ACTATAATGC	AATGAAGAG	CTTGGGTCCA	AAAAACACA	4800
AAAGCAAT	CCAGGCCAG	GGAAACAAT	CCAGGATGT	ATATTTACT	4850
TAGTACAAA	CCAGCTTTT	GATATCACA	TCATGGTTCT	TATATGCTC	4900
AACTGGTAA	CCATGATGT	AGAAAAGAG	GGTCAACTG	AGTACATGGA	4950
TTATGTTTTA	CAGTGGATCA	ACATGGTCTT	CATTATCTCG	TTCACTGGGG	5000
AGTGTGTGCT	GAAGCTAATC	TCCCTCGAGC	ATTACTACTT	CAGTGTGGGT	5050
TGGAGATTT	TGTATTTTGT	GGTASTGATC	CTCTCCATG	TAGGAATGTT	5100
TCTGCTGAG	ATGATAGAGA	AGTATTTGCT	GTCCCTACC	CTGTTCCGAG	5150
TCATGCGCT	GGCCAGGAT	GGACCAATCC	TACGCTGAT	CAAGGGCCCT	5200
AGGGGATCC	GCACCTGCT	CTTTGCTTTG	ATGATGCTCC	TTCTGCTCT	5250
TGCAAGATC	GGCCTGCTG	TTTTGCTGGT	CATTTGATC	TAGCCCATCT	5300
TTGGATGTC	CACTTTTGGC	TACGTTAAA	AGGAGGCTGG	AATTAATGAC	5350
ATGTTCAACT	TTGAGACTTT	TGGCACAGC	ATGATCTGCT	TGTTCCAAAT	5400
CACCACTCT	GCCTGCTGG	AGGACTGCT	GGCCCTCATC	CTCACAGCG	5450
CACCTCCGA	CTGTGACCT	AAAAAATTC	ACCCGGAAG	TTCASTGGA	5500
GGGACTGTG	GGAACTCATC	CTTGGGATTT	TTTTACTTTG	TCACCTACAT	5550
CATCATATCC	TTCTGCTGG	TGGTGAACAT	GTACATGCT	GTATCTCTGG	5600
AGACTTTCAG	CTGTGCCACC	GAGAGAGCCA	CTGAGCCTCT	GAGTGAAGAC	5650
GACTTTGAGA	TGTTCTAGCA	GGTCTGGAG	AAGTTGAGCC	CTGACCCAC	5700
TCATTTGATA	GAGTTCTGCA	AGCTCTCTGA	CTTTGCAGCT	GCCTGATC	5750
CTCCCTCTCT	GATGCGAAG	CCAAACAAG	TCCAGCTCAT	TGCCATGGAC	5800
CTGCCATGG	TGASTGGAGA	CCGCATCCAC	TGCCCTGACA	TCTTGTTTGC	5850
TTTTACAAAG	GGGTCTCTGG	GTGAGGTTGG	AGAGATGAT	TCTTCTGTT	5900
CACAGATGGA	AGAAAGTTTC	ATGTCAGCCA	ATCCTTCTAA	AGTGTCTTAT	5950
GACCCCTCA	CAACCAACT	GAGAGAAA	CAGAGGGAG	TGTCCTGGAC	6000
TATCATTCAG	CTTCTTACA	GACGATATCG	CTTCAGACA	CAGCTCAAGA	6050
ATATATGAG	TATATACATA	AAAGATGGAG	ACAGGATGA	TGATTTGCC	6100
AATTAAGAG	ATACAGTTTT	TGATACGTTG	AACCAACT	CAAGTCCGA	6150
AAGACAGAT	GTAATCTCT	CAACCATCTC	GCCACTTCC	TATGACAGTG	6200
TCACAAAGCC	AGATCAAGAG	AAATATGAAA	CAGACAAGC	AGAGAAGGA	6250
GACAAAGGA	AACATTAAG	CAGAAATAG	AGCTTTGTT	TTGATCACT	6300
GTTACAGCC	TGTGAGGTT	GACTCACTG	TGTTAGTAG	ACTCTTTAC	6350
GGAGTCTAT	CCAACTCTT	TTATCAAAA	TTCTGAGCC	AGCACAGCCA	6400
TTAGCTCTGA	TCCACAGAG	CAGAGGCCAG	CATTTACACA	TGCTATGTT	6450
TT					6453

Figura 9B

MNMLPFPQ	SPVNFTEQSL	ALTEQRISEE	KAKEHDEKX	DDEZEGPKS	50
SDLEAGKQLP	FIYGDIPFGM	VSEPLEDLP	YYADKXTFIV	LNRKKAIFRF	100
NATPALYMLS	PFSPLRRISI	KILVHELFSM	LIMCTILTNC	IFWTLNHPPE	150
WTKNVGYTFT	GIYTFESLIK	ILARGFCVGE	PTFLBNPMNN	LDFVVIVFAY	200
LTFEWNLGNV	SALRTPFVLR	ALKTISVIPG	LKTIYVGLIQ	SVKLSLDMVI	250
LTVFCLSVFA	LIGLQLFMGN	LKHKCFRREL	ENETLESIN	NTAESEELK	300
KYFYILEGSK	DALLCGFSTD	SGQCPEGYIC	VKAGRNPQYG	YTSFDTFSNA	350
FLALFRIMTQ	DYWENLYQQT	LRAAGTYMI	FFVVVIFLOS	FYLNLIILAV	400
VAMAYEBCNQ	ANIKKAKQKE	LEPQOMLDRL	KKEGEEAEAI	AAAAAEPTSI	450
GRSRIMGLSE	SSSEYERLSS	MSAKERRNRR	KKQKQKMSGG	EKGDEDEKLS	500
KSGSEESIRK	KSPNLQVEGH	HRTRKRLST	PNQSPLSIRG	SIFSRARSSR	550
TSLPSPFRGK	KDLSQSETEFA	DDENSIPOGN	ESRSGSLFVP	HRFRERSSN	600
ISQASHSPPV	LPVNGKMHSA	VDCNGVSLV	DQFSALMLPN	GQLLFEVID	650
KATSDSGSTT	NQNRKRLSS	SYFLSEDMLN	DPHLRQRAMS	RASILTNTVE	700
ELESERQKCH	QLLYRFANTY	LIWNCSPYMI	KFKLIYFIV	KDFFVOLAIT	750
ICIVLNTLFM	AMEKHHPMTEE	FRNVLAVGNL	IFTGIFAARM	VKLLIAMPFY	800
EYFQGWKIF	DSLIVTLGLI	ELFLAEVDEL	SVLRSFLLR	VFKLAKSWPT	850
LNMLIKIIGW	SVGALGNLTL	VLAITVFIFA	VVGMQLPGKS	YKCVCKIEV	900
UCKLPRWQW	DFPASFIVV	RYLQGEWJET	MNDCHVAGQ	TMCLIVYMW	950
MYIGHLVVLN	LFLALLLSF	SSNLTALIEE	DTANNLQIA	VAHRSRINY	1000
VKQTLREFIL	KSPSKPKRGS	KDKERTADPN	NKENYISNR	TLAEMSKDEN	1050
FLKXKDRISG	YSSSLKSPM	DENDYQSPH	NPSLTVTVPI	APGESDLRIM	1100
NTEELSSSD	SDYSKPKRNR	SSSECSYVD	NPLPQEEAE	AEFVNADEPE	1150
ACFTDQVRR	FPCQVNVDS	GRKVNWTIR	KTCYRIVENS	WFESFIVLMI	1200
LLSSGALAPE	DIYIEKRTI	KIILEYADKI	PTYIFILEML	LKNVAYGYKT	1250
YFTNANCWLD	FLIVDVSIVT	LVANTLGYSD	LGVIKSLRTL	RALRPLRALS	1300
RPEGRVWVN	ALIGAIPIIM	NVLLVCLIPW	LIFSINGVHL	PAGKPYECVN	1350
TTDGRHPTTS	QVNRSECTA	LQVSGNVRW	KHLKVNPNHY	GLGYLLELQV	1400
ATPRGMDIM	YAAVDSVIVH	EQKTEYSLY	MYIYFVIFII	VGSPTLHLF	1450
IGVIEDNPNQ	QKRLGGQDI	FMYERQKYY	NAMKLGSKK	PQKPIRPGK	1500
KFOGCIIDLY	TNDAPRITIM	VLICLAMYTM	MVEKEGQTEY	MHYVLRNIM	1550
VFILFTGRC	VKLKLSLANY	YPTVGNMILY	FWVILSIVG	MFLAEMIEKY	1600
FVSPTLFRVI	RLARIGRIE	LINGARRIET	LLFALMMSLP	ALFNIGLLLF	1650
LVMFIYAIFG	MSNFAYVIGE	AGINRMPNFE	TFGNSMICLF	QITTSAGWDC	1700
LLAPILNSAP	PDCEPKVHE	GSSEVEGCGN	PSWGIFYPVS	YIIISPLVVV	1750
HKYIIVILEN	PSVATEESTE	PLSEDDFEMP	YEVWEKFDPD	ATGFIEFCKL	1800
SDFAALDPP	LLIAKPNKVO	LIAMDLPMVS	GDRINCLDIL	PAFTKRVIGE	1850
GOEMDSLRSQ	MEERFMSANF	SEVSYEPITT	TLKRRQREVS	ATIIGHAYRR	1900
YRLRQHVNI	SSIYKGDGR	DDDLPHKEDT	VFDNVHRSR	PKTDVYAST	1950
ISFSPYDSVT	KPQEKYETD	KTEKEDKED	ESRK		1984

Figura 10

RATPN1 1 MAMLPFI JSFVHFTKQSLALIEQRISEKAKKHKDKKDDDEESGPKF .OLEAGNQLPF
 HUMFN1A MAMLPFPQPOSFVHFTKQSLALIEQRIKELCKCKENKKEKKDDKKEENPKPSSOLEAGNQLPF
 HUMFN1B MAMLPFPQPOSFVHFTKQSLALIEQRIAEKRSKEPKKKEKKDDKKEAPKPSDDLEAGNQLPF
 HUMFN1C MAMLPFPQPOSFVHFTKQSLALIEQRI-E-K-KE-K-EKEDD-EE-FKPSDDLEAGNQLPF
 HUMFN1D MAMLPFPQPOSFVHFTKQSLALIEQRISEKAKKHKDKKDDDEREDPKPSSDLEAGNQLPF

RATPN1 62 IYGDIFPGWVEEFLDLDPPYADKRTFIVLKKGKAI FRFNATPALYMLSPFSPLRRISIKI
 HUMFN1A IYGDIFPGWVEEFLDLDPPYADKRTFIVLKKGKAI FRFNATPALYMLSPFSPLRRISIKI
 HUMFN1B IYGDIFPGWVEEFLDLDPPYADKRTFIVLKKGKAI FRFNATPALYMLSPFSPLRRISIKI
 HUMFN1C IYGDIFPGWVEEFLDLDPPYADKRTFIVLKKGKAI FRFNATPALYMLSPFSPLRRISIKI
 HUMFN1D IYGDIFPGWVEEFLDLDPPYADKRTFIVLKKGKAI FRFNATPALYMLSPFSPLRRISIKI

RATPN1 122 LVHSLFSMLIMCTILTRCIPNTELSNPPFWTKWVGYTTFGIYTFESLKIILARGFCVGEFTF
 HUMFN1A LVHSLFSMLIMCTILTRCIPNTELSNPPFWTKWVGYTTFGIYTFESLKEIILARGFCVGEFTF
 HUMFN1B LVHSLFSMLIMCTILTRCIPNTELSNPPFWTKWVGYTTFGIYTFESLKEIILARGFCVGEFTF
 HUMFN1C LVHSLFSMLIMCTILTRCIPNTELSNPPFWTKWVGYTTFGIYTFESL-ILARGFCVGEFTF
 HUMFN1D LVHSLFSMLIMCTILTRCIPNTELSNPPFWTKWVGYTTFGIYTFESLKIILARGFCVGEFTF

RATPN1 184 LADFNWLDPVVIVFAYLTFVNLGNVSALETFVLAALKTISVIFGLKTIIVGALIQSVKK
 HUMFN1A LADFNWLDPVVIVFAYLTFVNLGNVSALETFVLAALKTISVIFGLKTIIVGALIQSVKK
 HUMFN1B LADFNWLDPVVIVFAYLTFVNLGNVSALETFVLAALKTISVIFGLKTIIVGALIQSVKK
 HUMFN1C LADFNWLDPVVIVFAYLTFVNLGNVSALETFVLAALKTISVIFGLKTIIVGALIQSVKK
 HUMFN1D LADFNWLDPVVIVFAYLTFVNLGNVSALETFVLAALKTISVIFGLKTIIVGALIQSVKK

RATPN1 245 LSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFNGLNKHKCFRKELEENETLESIMNTAESSEELKPYFY
 HUMFN1A LSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFNGLNKHKCFRKELEENETLESIMNTAESSEELKPYFY
 HUMFN1B LSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFNGLNKHKCFRKELEENETLESIMNTAESSEELKPYFY
 HUMFN1C LSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFNGLNKHKCFR--LE-RELESIMNT-AESE--KYFFY
 HUMFN1D LSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFNGLNKHKCFRKELEENETLESIMNTAESSEELKPYFY

RATPN1 306 LEGSKDALLCGFSTDSGQCPEGYICVKAQRNFDVGYTTFDTPSWAFALFRLMTQDYWENL
 HUMFN1A LEGSKDALLCGFSTDSGQCPEGYICVKAQRNFDVGYTTFDTPSWAFALFRLMTQDYWENL
 HUMFN1B LEGSKDALLCGFSTDSGQCPEGYICVKAQRNFDVGYTTFDTPSWAFALFRLMTQDYWENL
 HUMFN1C LEGSKDALLCGFSTDSGQCPEGY-CVK-GRNFDVGYTTFDTPSWAFALFRLMTQDYWENL
 HUMFN1D LEGSKDALLCGFSTDSGQCPEGYICVKAQRNFDVGYTTFDTPSWAFALFRLMTQDYWENL

RATPN1 367 YQOTLRAAGKTYNIFPVVVFILGSPYLINLILAVVMAYEENQDANIEEAKQKELFPQOML
 HUMFN1A YQOTLRAAGKTYNIFPVVVFILGSPYLINLILAVVMAYEENQDANIEEAKQKELFPQOML
 HUMFN1B YQOTLRAAGKTYNIFPVVVFILGSPYLINLILAVVMAYEENQDANIEEAKQKELFPQOML
 HUMFN1C YQOTLRAAGKTYNIFPVVVFILGSPYLINLILAVVMAYEENQDANIEEAKQKELFPQOML
 HUMFN1D YQOTLRAAGKTYNIFPVVVFILGSPYLINLILAVVMAYEENQDANIEEAKQKELFPQOML

RATPN1 428 DRLKKRQEAEALAAAAEFTSIRSRIMOLSESSETSKLSKSAKERNRNRKCKKCK M
 HUMFN1A DRLKKRQEAEALAAAAEFTSIRSRIMOLSESSETSKLSKSAKERNRNRKCKKCKKCK
 HUMFN1B DRLKKRQEAEALAAAAEFTSIRSRIMOLSESSETSKLSKSAKERNRNRKCKKCKKCK
 HUMFN1C DRLKKRQEAEALAAAAE-TSI-RSRIMOLSESSETS-LSKSAKERNRNRKCK-CKK-
 HUMFN1D DRLKKRQEAEALAAAAEFTSIRSRIMOLSESSETSKLSKSAKERNRNRKCKKCKKCK

RATPN1 498 SSGEEKDDEKLSKSGSEESIRKKS FHLGVEGHRKTRERKLSLTPNQSPLS IRGSLFSARRS
 HUMFN1A SSGEEKDDEKLSKSGSEESIRKKS FHLGVEGHRKTRERKLSLTPNQSPLS IRGSLFSARRS
 HUMFN1B SSGEEKDDEKLSKSGSEESIRKKS FHLGVEGHRKTRERKLSLTPNQSPLS IRGSLFSARRS
 HUMFN1C SSGEEKD-ELKSKS-SE-SIR-KEFHLGVECH-R--SRKLSLTPNQSPLS IRGSLFSARRS
 HUMFN1D SSGEEKDDEKLSKSGSEESIRKKS FHLGVEGHRKTRERKLSLTPNQSPLS IRGSLFSARRS

RATPN1 549 SRTSLFSPFGWRDLGSETEFADDEHSIFGDNESRAGSLVPHRFRERASNNISQASRSPF
 HUMFN1A SRTSLFSPFGWRDLGSETEFADDEHSIFGDNESRAGSLVPHRFRERASNNISQASRSPF
 HUMFN1B SRTSLFSPFGWRDLGSETEFADDEHSIFGDNESRAGSLVPHRFRERASNNISQASRSPF
 HUMFN1C SRTSLFSPFGWRDLGSETEFADDEHSIFGDNESRAGSLVPHRFRERASNNISQASRSPF
 HUMFN1D SRTSLFSPFGWRDLGSETEFADDEHSIFGDNESRAGSLVPHRFRERASNNISQASRSPF

Figura 11A


```

RATPNI 1158 VRRFFP--VNSDGRKRVWNTIRKTCYRIVHSWPFSPVLMKILLSGG AFEDIYIERKK
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A VRRFCCQVNVKSGRKGKXWNIIRKTCYRIVHSWPFSPVLMKILLSGGALAFEDIYIERKK
RUMFN1B VRRFCCQVNVIESGRGKINWNIIRKTCYRIVHSWPFSPVLMKILLSGGALAFEDIYIERKK
RUMFN1C VRRF-CCQVN--SGRKG-KW-IRKTCY-IVHSWPFSPVLMKILLSGGALAFEDIYIE-KK
RUMFN1D VRRFPCQVNVDSGRKRVWNTIRKTCYRIVHSWPFSPVLMKILLSGGALAFEDIYIERKK

RATPNI 1219 TIKIILEYADKIPTYIFILEMLLKWVAYGYKTYPTHAWCWLDFLIVDVS LVTLVANTLGYS
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A TIKIILEYADKIPTYIFILEMLLKWVAYGYKTYPTHAWCWLDFLIVDVS LVTLVANTLGYS
RUMFN1B TIKIILEYADKIPTYIFILEMLLKWVAYGYKTYPTHAWCWLDFLIVDVS LVTLVANTLGYS
RUMFN1C TIKIILEYADKIPTYIFILEMLLKWVAYGYKTYPTHAWCWLDFLIVDVS LVTLVANTLGYS
RUMFN1D TIKIILEYADKIPTYIFILEMLLKWVAYGYKTYPTHAWCWLDFLIVDVS LVTLVANTLGYS

RATPNI 1280 DLGPIKSLRTLALRPLRALSRFSGMRVVVNALIGAI PSIMNVLLVCLIFWLIFSINGVNL
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A DLGPIKSLRTLALRPLRALSRFSGMRVVVNALIGAI PSIMNVLLVCLIFWLIFSINGVNL
RUMFN1B DLGPIKSLRTLALRPLRALSRFSGMRVVVNALIGAI PSIMNVLLVCLIFWLIFSINGVNL
RUMFN1C DLGPIKSLRTLALRPLRALSRFSGMRVVVNALIGAI PSIMNVLLVCLIFWLIFSINGVNL
RUMFN1D DLGPIKSLRTLALRPLRALSRFSGMRVVVNALIGAI PSIMNVLLVCLIFWLIFSINGVNL

RATPNI 1341 FAGKPYECVNTDGRFPPTSQVANRSECFALMVSQVYRWNKLVNFDVGLGYLSLLQVA
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A FAGKPYECVNTDGRFPPTSQVXNRESECFALMVSXNVRWNKLVNFDVGLGYLSLLQVA
RUMFN1B FAGKPYECVNTDGRFPPTSQVXNRESECFALMVSXNVRWNKLVNFDVGLGYLSLLQVA
RUMFN1C FAGKPYEC-VNTDGRFP- SQV-NRESECFALMVS-NVRWNKLVNFDVGLGYLSLLQVA
RUMFN1D FAGKPYECVNTDGRFPPTSQVANRSECFALMVSQVYRWNKLVNFDVGLGYLSLLQVA

RATPNI 1402 TFRGMDIMYAAVDSVNVNSEQPYEYSLMYIYFVFIIFGSPFTLNLFIGVIIDNFRQOK
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A TFRGMDIMYAAVDSVNVKQKPYEYSLMYIYFVFIIFGSPFTLNLFIGVIIDNFRQOK
RUMFN1B TFRONTIMYAAVDSVNVDRQPYEYSLMYIYFVFIIFGSPFTLNLFIGVIIDNFRQOK
RUMFN1C TFRGMDIMYAAVDSVNV--QPYEYSLMYIYFVFIIFGSPFTLNLFIGVIIDNFRQOK
RUMFN1D TFRGMDIMYAAVDSVNVNSEQPYEYSLMYIYFVFIIFGSPFTLNLFIGVIIDNFRQOK

RATPNI 1463 EKLOGQDIPMTEEQKYYNANKLGSKKPKPIPRGKXQCCI FDLVTNQAFDITIMVLI
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A EKLOGQDIPMTEEQKYYNANKLGSKKPKPIPRGKXQCCI FDLVTNQAFDITIMVLI
RUMFN1B EKLOGQDIPMTEEQKYYNANKLGSKKPKPIPRGKXQCCI FDLVTNQAFDITIMVLI
RUMFN1C EKLOGQDIPMTEEQKYYNANKLGSKKPKPIPRGKX- QCCI FDLVTNQAFDI-IMVLI
RUMFN1D EKLOGQDIPMTEEQKYYNANKLGSKKPKPIPRGKXQCCI FDLVTNQAFDITIMVLI

RATPNI 1524 CLSNVTHMVEREGQTEFYNDYLVNIMVFIILFTGECVLELISLHNYTPTVGNHILFVWV
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A CLSNVTHMVEREGQCKXKXVLIWIKVFIILFTGECVLELISLHNYTPTVGNHILFVWV
RUMFN1B CLSNVTHMVEREGQSDHTEVLYNIVVFIILFTGECVLELISLHNYTPTVGNHILFVWV
RUMFN1C CLSNVTHMVEREGQ---W--VL-NIN-VFIILFTGECVLELISLHNYTPTVGNHILFVWV
RUMFN1D CLSNVTHMVEREGQTEFYNDYLVNIMVFIILFTGECVLELISLHNYTPTVGNHILFVWV

RATPNI 1585 ILSIVGNFLAEMIERKYPVSPFLFRVIRLARIGRILALINGARGINTLLFALMNSLPALFNI
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A ILSIVGNFLAKKIERKYPVSPFLFRVIRLARIGRILALXKRGANGINTLLFALMNSLPALFNI
RUMFN1B ILSIVGNFLADLIETYPVSPFLFRVIRLARIGRILELVNARGINTLLFALMNSLPALFNI
RUMFN1C ILSIVGNFLA--IE-YFVSPFLFRVIRLARIGRILAL-NGARGINTLLFALMNSLPALFNI
RUMFN1D ILSIVGNFLAEMIERKYPVSPFLFRVIRLARIGRILALINGARGINTLLFALMNSLPALFNI

RATPNI 1648 GLLFLVMFYIYALFGMSNFAYVKEKAGINDMFWPETFGNSMICLPQITTSAGWDGLLAFIL
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A GLLFLVMFYIYALFGMSNFAYVKEKAGINDMFWPETFGNSMICLPQITTSAGWDGLLAFIL
RUMFN1B GLLFLVMFYIYALFGMSNFAYVKEKAGINDMFWPETFGNSMICLPQITTSAGWDGLLAFIL
RUMFN1C GLLFLVMFYIYALFGMSNFAYVKE-KINDMFWPETFGNSMICLPQITTSAGWDGLLAFIL
RUMFN1D GLLFLVMFYIYALFGMSNFAYVKEKAGINDMFWPETFGNSMICLPQITTSAGWDGLLAFIL

RATPNI 1707 NSAFPDCDFKRVKPGSSVEGDCNFSVGIFFVSYIIISFLVWVMYIAVILENFSVATEE
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
RUMFN1A NSAFPDCDFKRVKPGSSVEGDCNFSVGIFFVSYIIISFLVWVMYIAVILENFSVATEE
RUMFN1B NSAFPDCDFKRVKPGSSVEGDCNFSVGIFFVSYIIISFLVWVMYIAVILENFSVATEE
RUMFN1C NS-PPDCDFKRVKPGSSVEGDCNFSVGIFFVSYIIISFLVWVMYIAVILENFSVATEE
RUMFN1D NSAFPDCDFKRVKPGSSVEGDCNFSVGIFFVSYIIISFLVWVMYIAVILENFSVATEE

```

Figura 11C

```

RATPN1 1768 STEPL: DFEMFYEWKFDPPDATQFIEFKLSDFAAALDPFLLIAA .AVQLIAMDLPM
|||||
HUMPN1A STEPLSEDFEMFYEWKFDPPDATQFIEFKLSDFAAALDPFLLIAKPNKVQLIAMDLPM
HUMPN1B STEPLSEDFEMFYEWKFDPPDATQFIEFKLSDFAAALDPFLLIAKPNKVQLIAMDLPM
HUMPN1C STEPLSEDFEMFYEWKFDPPDATQFIEF--KLSDFAAALDPFLLIAKPNKVQLIAMDLPM
HUMPN1D STEPLSEDFEMFYEWKFDPPDATQFIEFKLSDFAAALDPFLLIAKPNKVQLIAMDLPM

RATPN1 1829 VSGDRINCLDILFAPTKRVLGEGGEMDSLRSQMEERFMSANPSKVSYPEPITTTLKRKQEV
|||||
HUMPN1A VSGDRINCLDILFAPTKRVLGEXGEMDSLRSQMEERFMSANPSKVSYPEPITTTLKRKQEV
HUMPN1B VSGDRINCLDILFAPTKRVLGESGEMDSLRSQMEERFMSANPSKVSYPEPITTTLKRKQEV
HUMPN1C VSGDRINCLDILFAPTKRVLGE-GEMDSLRSQMEERFMSANPSKVSYPEPITTTLKRKQEV
HUMPN1D VSGDRINCLDILFAPTKRVLGEGGEMDSLRSQMEERFMSANPSKVSYPEPITTTLKRKQEV

RATPN1 1890 SATIIQRAYRRYRLRQHVKNISSIYIKDGRDDDLNKKEDTVFQNVNENSSPERTDVTAST
|||||
HUMPN1A SATXIQRAYRRYRLRQXVKNISSIYIKDGRDDDLNKKDXKXFDNVNENSSPERTDXTAST
HUMPN1B SATVIQRAYRRYRLRQNVKNISSIYIKDGRDDDLNKKEDMVFNVNENSSPERTDATST
HUMPN1C SAT-IQRAYRRYRLRQ-VKNISSIYIKDGRDDDL-NK-D--FDNVNENSSPERTD-T-ST
HUMPN1D SATIIQRAYRRYRLRQHVKNISSIYIKDGRDDDLNKKEDTVFQNVNENSSPERTDVTAST

RATPN1 1951 ISPPSYDSVTKPDQEKYETDKTEKEDKERD ESRK- 1985
|||||
HUMPN1A XSPPSYDSVTKPDKXKYEKDKTEKEDKLEKSKKXK
HUMPN1B TSPPSYDSVTKPDKXKYEQDKTEKEDKXKSKKXK-
HUMPN1C -SPPSYDSVTKPD-EKYE-D-TEKEDK-KSKKX-K-
HUMPN1D ISPPSYDSVTKPDQEKYETDKTEKEDKERDKKXKSRK

```

Figura 11D

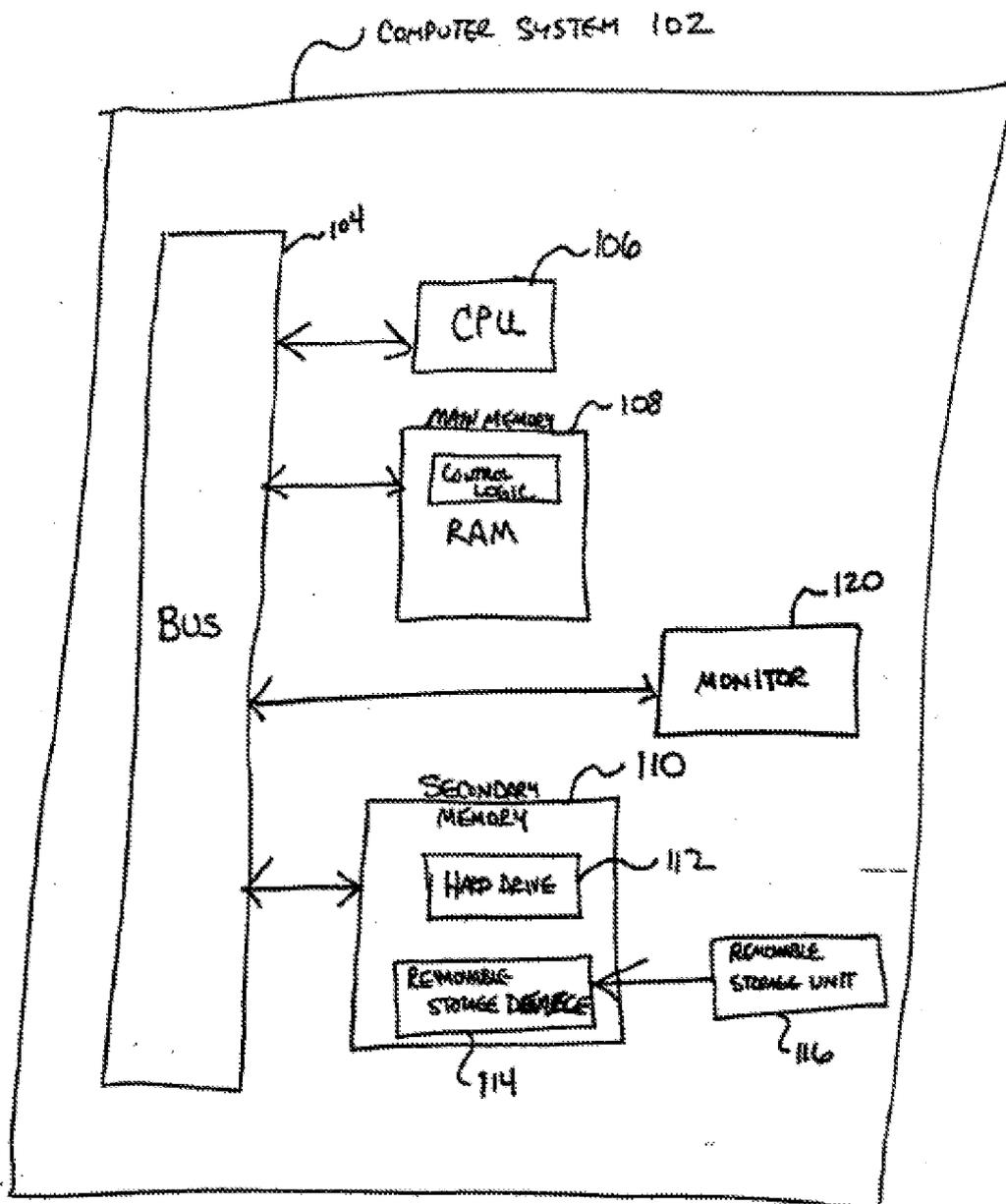


Figura 12

CTCTATGTTG	AGGAGI	AA	GAGGAATTA	AATATACGG	ATGAAAAGAT	50
GGCRAATGTTG	CCTCCCCCG	GACCTCAGAG	CTTGTCCAT	TTCCAAAAC		100
AGTCTCTTGC	CCTCATTGAA	CAACGCATTG	CTGAAGAAA	ATCAAAGGA		150
CCCAAGAAAG	AAAAGAAAAG	TGATGATGAA	GAGCCCCAA	AGCCAAGCAG		200
TGACTTGGAA	GCTGGCAAAC	AACCGCCCTT	CATCTATGGG	GACATTCCTC		250
CCSCCATGGT	GTCAGAGCCC	CTGGAGGACT	TGGACCCCTA	CTATGCAGAC		300
AAAAGACTT	TCATAGTATT	GAACAAGGG	AAAACANTCT	TCCGTTTCA		350
TGCCACACTT	GCTTTATATA	TGCTTTCTCC	TTTCAGTCTT	CTAAGAAGAA		400
TATCTATTAA	GATTTTAGTA	CACTCCTTAT	TCAGCATGCT	CATCATGTGC		450
ACTATTCTGA	CAAACTGCAT	ATTTATGACC	ATGAATAACC	GGCCGGACTG		500
GACCAAAAT	GTCAGATACA	CTTTTACTGG	AAATATACT	TTTGAATCAC		550
TTTAAAAAT	CCTTGCAGA	GCCTTCTGTG	TAGGAGAAAT	CACTTTTCTT		600
CTGACCCCTT	GGAACTGGCT	GGATTTGTC	GTCAATGTTT	TTGCTATTT		650
AACGAAATTT	GTAACCTAG	GCAATGTTTC	AGCTCTTGA	ACTTTCAGAG		700
TATTTGAGAG	TTTGAARACT	ATTTCTGTAA	TCCCAGGCTT	GAGACAAAT		750
GTAGGGGCTT	TGATCCATTC	AGTGAAGAG	CTTCTGATG	TCATGATCCT		800
GACTGTGTTT	TGCTGAGTG	TGTTTGCCT	AATTCAGCTA	CAGCTGTTCA		850
TGGAAACCTT	GAAGCATAAA	TGTTTTGAA	ATTCACTTGA	AAATAATGAA		900
ACATTTAGAA	GCATAATGAA	TACCTTAGAG	AGTGAAGAG	ACTTTAGAAA		950
ATATTTTTAT	TACTTGGAG	GATCCAAGA	TGCTCTCCTT	TGTGTTTCA		1000
GCATGATTC	AGGTCACTGT	CCAGAGGGT	ACACCTGTGT	GAAATTTGGC		1050
AGAAACCTTG	ATTATGGCTA	CACGAGCTTT	GACACTTCA	GCTGGGCTTT		1100
CTTAGCTTGG	TTTAGGCTAA	TGACCCAABA	TACTGGAAA	AACCTTACC		1150
AACGACCTT	GCCTGCTGCT	GGCAAACTT	ACATGATCTT	CTTGTGCTA		1200
GTCATTTTCC	TGGCTCCTT	TTATCTAATA	AACCTGATCC	TGGCTGTGGT		1250
TGCCATGGCA	TATGAAGAAC	AGAACCAAGC	AAACTTGA	GAAGCTAACC		1300
AGAAAGAAAT	AGAAATTTCA	CAGATGTTAG	ACCTCTTAA	AAAGAGCRA		1350
GAGAGAGCTG	AGGCAATGTC	AGCCGAGGG	GCTGAATATA	CAATATTAG		1400
GAGAGAGCTG	ATTATGGGCT	TCTCAGAGAG	TTCTTCTGAA	ACATCCAAAC		1450
TGAGCTCTAA	AAGTCTTAAA	GAAGAGAGAA	ACAGAGAGAA	GAAAGAAAT		1500
CAAAAGAGAC	TCTCCAGTGG	AGAGGAAAG	GGAGATGCTG	AGAAATGTC		1550
GAATAGAGAA	TCAGAGGACA	GCATCAGAG	AAAAGTTTTC	CACCTTGGTG		1600
TCGAAGGGCA	TAGGGGAGCA	CATGAAGAA	GTTTGTCTAC	CCCCAATCAG		1650
TCCACTCTCA	GCATTCCTGG	CTCCTTGTTT	TCTGCAAGGC	GAAGCAGCAG		1700
AACAGTCTTT	TTTAGTTCFA	AGGGCAGAG	AGAGATATA	GAATCTGAGA		1750
CTGAATTTGC	GCATGATGAG	CACAGCATTT	TTGAGAGCAA	TGAGAGCAGA		1800
AGGGCTCAC	TGTTTGTGCC	CCACAGACCT	CAGGAGGCAC	GCAGCATTA		1850
CATCAGCCAA	CCCAATGAGT	CCCCACCAAT	GCTGCCGCTG	AACGGGAAA		1900
TGCACACTGC	TGTCGACTGC	AACGCTGTGG	TCTCCCTGCT	TGATGGACCC		1950
TCAGCCCTCA	TGCTCCCCAA	TGACAGCTTT	CTGCCAGAG	GCAGGACCAA		2000
TCMAATACAC	AGAAAGAGGC	GTTTATGTTT	CTATCTCCTT	TCAGAGGATA		2050
TGCTGATGA	TCCCAACTTC	AGACAGAGAG	CAATGATGAT	AGCAAGCATA		2100
TTACAAACA	CTGTGGAGAA	ACTTGAAGAG	TCCAGACAAA	ATGTTCCACC		2150
TTGGTGGTAC	AGATTTGCAC	ACMAATCTTT	GAATCGGAAT	TGCTCTCCAT		2200
ATTGGATAAA	ATTCAAAAG	TGATCTATTT	TTATTTGAA	GAATCTTTT		2250
GTAGATCTTG	CATTAACAT	TTGCATGAT	TTAAACACAT	TATTTATGGC		2300
TATGAAACAC	CAOCCAAAGA	CTGAGGATTT	CAAAATGTA	CTTCTATAG		2350
GAAATTTGGT	CTTACTGGA	ATCTTTGCAG	CTGAATGAT	ATTAAGACTG		2400
ATTGCCATGG	ATCCATATGA	GTATTTCCAA	GTAGGCTGGA	ATATTTTGA		2450
CAGCCTTATT	GTCACTTFA	GTTTATGGA	GCTCTTCTA	GCAGATGTTG		2500
AAGATTTGTC	AGTTCTGGGA	TCATTCAGAC	TGCTCCGAGT	CTTCAAGTTG		2550
GCAAAATCCT	GGCAACATT	GAACATGCTG	ATTAAGATCA	TTGTTACTTC		2600
AGTAGGGGCT	CTAGGTAACC	TCACTTATG	GTTGGGCTC	ATGCTCTTCA		2650
TTTTTGTGTT	GGTGGGCTG	CAGCTCTTGG	GTAGAGCTA	CAAGAAATGT		2700
GCTGCAAAA	TCATGATGA	CTGACGCTC	CCAGGCTGAC	ACATGAACCA		2750
CTTCTTCCAC	TGCTTCTGAA	TTGTTTCCG	CTTCTGTTG	GAAGATGGA		2800
TAGAGACCAT	GTCGACTGTT	ATGAGGTTG	CTGCTCAGC	TATGTGCTTT		2850
ATTGTTTACA	TGATGTCAT	GTCATTTGGA	AACCTGTTGG	TCCTAACCCT		2900
ATTCTGCCCC	TATTTATGAA	GCTCATTTAG	TTCAACCAAT	CTTACAGCAA		2950
TTGAGAGAGA	CCCTGATGCA	AACACCTTCC	AGATTTGAGT	GACTAGAAAT		3000
AAAAGGGA	TAAATTTGTT	GAACCAACC	TTACTGAAAT	TTATTTTAAA		3050
AGCTTTTCC	AAAAGCCAA	AGATTTCCAG	GGAGATAGA	CAAGCAGAG		3100
ATCTGATAC	TAAAGAGGAA	AACATATATT	CTAACCAAC	ACTTCTGAA		3150
ATGACCAAG	GTCACAAAT	CCTCAGGAA	AAGATAAA	TCAGTGTGTT		3200
TGAAAGCAGC	GTCACAAAC	ACTTGAATGA	AGACATGAT	GCTCAATCAT		3250
TTATTCACAA	TCCGACCTTC	ACAGTACAG	TCCCAATTC	ACCTGGGAAA		3300
TCTATTTGG	AAATATGAA	TGCTGAGGAA	CTTACGCTG	ATTGGATAG		3350
TGATACAGC	AAAGTGGAT	TAAACGGTC	AAGCTCTCA	GATGCAAGCA		3400

Figura 13A

CAGTTGATAA	CCCTTTACT	GGAGAAGGAG	AASAAAGCGA	GGCTGACCT	3450
ATGAATTCG	ATGAGCCAGA	GGCTGTTTC	ACAGATGGT	GTGTACGGAG	3500
GTTCCTATG	TGCCAAGTTA	ACATAGASTC	AGGAAAGGA	AAAATCTGGT	3550
GGAAACATCAG	GAAAACCTGC	TACAAGATTS	TTGAACACAG	TTGGTTTGBA	3600
AGCTTCATG	TCCCTCATAT	CCTGCTCAGC	AGTGGTSCCC	TGGCTTTTGA	3650
AGATATTTAT	ATTGAAGGA	AAAAGACCAT	TAAGATTATC	CTGGASTATG	3700
CAGACAGAT	CTTCACTTAC	ATCTTCATTC	TGGAAATGCT	TCTAAAATGG	3750
ATAGCATATG	GTATATAAAC	ATATTTACCC	AATGCTGGT	GTGGCTTGA	3800
TTTCTTAATT	GTGATGTTT	CTTTGGTTAC	TTTAGTGGCA	AACACTCTTG	3850
GCTACTCAGA	TCTTGGCCCC	ATTAATCCC	TTCGGACACT	GAGAGCTTIA	3900
AGACTCTAA	GAGCCTTATC	TAGATTTGAA	GGAAATGAGG	TCGTTGTGAA	3950
TGCACCTATA	GGAGCAATTC	CTTCCATCAT	GAATGTCTA	CTTGTGTGTC	4000
TTATATTCTG	GCTGATATTC	AGCATCATGG	GAGTAAATTT	GTTTGCTGGC	4050
AASTTCTATG	AGTGTATTA	CACCACAGAT	GGTCAAGGT	TTCTGCAAG	4100
TCAAGTTCCA	AATGTTCCG	AATGTTTTC	CCITATGAAT	GTTAGTCAA	4150
ATGTGCGATG	GAAAAACCTG	AAAGTGAAT	TTGATAATGT	CGACTTGGT	4200
TACCTATCTC	TGCTTCAGT	TGCAACTTTT	AAAGGATGGA	CGATTATTAT	4250
GTATGCGACA	GTGGATCTG	TTAATGTAGA	CANGCAGCC	AAATATGAAT	4300
ATAGCCTCTA	CATGTATATT	TATTTGTGG	TCTTATCAT	CTTTGGGTCA	4350
TTCTTCACTT	TGAACTTGTT	CATTTGGTGC	ATCATAGATA	ATTTCAACCA	4400
ACAGAAAAG	AAGCTTGGAG	GTCAAGACAT	CTTTATGACA	GAGACACAGA	4450
ASAAATCTA	TAATGCAATG	AAAAAGCTGG	GGTCCAGAA	GCCACAAG	4500
CCAAATCTTC	GACCAGGGA	CAAAATCCAA	GGATGTATAT	TTGACCTAGT	4550
GACAAATCAA	GCCTTTGATA	TTAGTATCAT	GGTCTTATC	TGTCTCACA	4600
TGTAACCAT	GATGCTAGAA	AAGGAGGTC	AAAGTCAACA	TATGACTGAA	4650
GTTTTATATT	GGATAAATGT	GGTTTTTATA	ATCCTTTTCA	CTGGAGAATG	4700
TGTGCTAAA	CTGATCTCCC	TCAGACTA	CTACTTCACT	GTAGGATGGA	4750
ATATTTTGA	TTTTGTGGTT	TGATTTATCT	CCATGTAGG	TATGTTTCTA	4800
GCTGATTTGA	TYGAAACGTA	TTTTGTGTCC	CCTACCCTGT	TCCAGTGTAT	4850
CGTCTTGGC	AGGATGGCC	GAATCCTAGC	TCTAGTCAA	GGAGCAAAGG	4900
GGATCCGAC	GCTGCTCTTT	GCTTTGATGA	TGTCCTTCC	TGCGTTGTTT	4950
AACATGGCC	TCTGCTCTT	CCTGCTCATG	TTCACTAGC	CCATCTTTGG	5000
NATGTCAC	TTTGCCTATG	TTAAAAGGA	AGATGGAAT	AATGACATGT	5050
TCRATTTTGA	GACCTTGGC	AACAGTATGA	TTTTCCCTGT	CCAAATTACA	5100
AGCTCTGCTG	GCTGGATGG	ATTGCTAGCA	CCATTTCTTA	ACAGTAAGCC	5150
ACCCGACTGT	GACCCAAAA	AAATTCATCC	TGGAAATTC	GTGAAAGAG	5200
ACTGTGATA	CCCATCTGTT	GGAATATTCT	ACTTTGTTAG	TTATATCATC	5250
ATATCTTCC	TGGTGTGGT	GAACATGTAC	ATTGCACTCA	TACTGGAGAA	5300
TTTTAGTGT	GCCACTGAAG	AAAGTACTGA	ACCTCTGAGT	GAGGATGACT	5350
TTGATGATTT	CTATGAGGTT	TGGAGAGAT	TTGATCCCA	TGCGACCCAG	5400
TTTATAGAT	TCTCTAAACT	CTCTGATTTT	GCGCTGCC	TGGATCCTCC	5450
TCTTCTATA	GCAAAACCCA	ACAAAGTCCA	GCTCATTTGCC	ATGGATCTGC	5500
CCATGSTTAG	TGGTGAACGG	ATCCATTTGC	TTGACATCTT	ATTGCTTTT	5550
ACAAAGCGTG	TTTTGGGTGA	GAGTGGGGAG	ATGGATTTCT	TTCTTACA	5600
GATGGAAGAA	AGTTTCAATG	CTGCAATCC	TTCCAAAGTG	TCCTATGAAC	5650
CCATCACAC	CACACTAAA	CGAAACAAG	AGGATGTGTC	TGCTACTGTC	5700
ATTCAGCGTG	CTTATAGACC	TTACCCCTTA	AGGCMAATG	TCAAAAATAT	5750
ATCAAGTATA	TACATAAAG	ATGGAGACAG	AGATGATGAT	TTACTCAATA	5800
AAAAAGATAT	GCCTTTTGAAT	AATGTTAATG	AGAACTCAAG	TCCGAAAAAA	5850
ACAGATDCCA	CTTCACTCCAC	CACTCTCCA	CCTTCATATG	ATAGTGTAAAC	5900
AAAGCCAGAC	AAAGAGAAAT	ATGAACAGA	CAGAACAGAA	AAGGAGACA	5950
AAGGAAAGA	CAGCAAGGAA	AGCAAAAAT	AGAGCTTCAT	TTTTGATATA	6000
TTGTTTACAG	CCTGTGAAAG	TGATTTATTT	GTGTTAATA	AACTCTTTTG	6050
AGGAGTCTA	TGCCAAATC	CTTTTTATCA	AAATATTCTC	GAAGCCAGTG	6100
CAGTCACTAA	CTCTGATTTT	CTAGAAAGG	TGGCAGCAT	TAGCAGATGG	6150
TTATTTTTC	ACTGATGATT	CTTAAGAAAT	CGTAAGAGAA	CTCTGTAGGA	6200
ATTATTGATT	ATAGCATACA	AAAGTGATTG	ATTCAGTTT	TTGGTTTTTA	6250
ATAANTCAGA	AGACCATGTA	GAAAACTTTT	ACATCTGCT	TGTCATCTTT	6300
TCACAGGAT	GTAATTAGTC	TTGTTTTCCA	TGTAATATA	CAACACAGC	6350
ATACGAAAA	AAAAAATA	A			6371

Figura 13B

CTCTTATGTC	AGGAGCAGAA	GAGGAATTAA	AATATACAGG	ATGAAAAGAT	50
GGCAATGTTG	CCTCCCCGAG	GACCTCAGAG	CTTTGTCCAT	FTCAGAAAAC	100
AGTCTCTTGC	CCTCATTGAA	CAAGSCATTC	CTGAAAGAAA	ATCAAAGGAA	150
CCCAAGAAAG	AAAAGAAAGA	TGATGATGAA	GAAGCCCCAA	AGCCAGSCAG	200
TGACTTGGAA	GCTGGCAAAC	AACTGCCCTT	CATCTATGGG	GACATTGCTC	250
CCGGCATGGT	GTCAGAGCCC	CTGGAGGACT	TGGACCCCTA	CTATCCAGAC	300
AAAAAGACTT	TCATAGTATY	GAACAAGAGG	AAAACAATCT	TCGGTTTCAA	350
TGCCACACCT	GCTTTATATA	TGCTTTCTCC	TTTCACTCCT	CTAAGAAGAA	400
TATCTATTAA	GAFTTTAGTA	CACCTCCTAT	TCAGCATGCT	CATCATGTGC	450
ACTATTCTGA	CAACTGCAAT	ATTTATGACC	ATGAATAACC	CCCGGACTG	500
GAACAAAAT	GTCGAGTACA	CTTTACTGCG	AATATATACT	TTTGAATCAC	550
TTCTAAAAT	CCTTCCAAAG	GGCTTCTGTG	TAGGAGAAAT	CACCTTTCTT	600
CTGACCCGCT	GGAAGCTGGT	GGATTTGTTC	GTCATTTGTT	TTGCGTATTT	650
AACAGAAATY	GTAAGCCTAG	GCAATGTTTC	AGCTCTTCCA	ACTTTCAGAG	700
TATTCAGAGC	TTTGAAACT	ATTTCTGTAA	TCCCAGCCCT	GAAGACAATT	750
GTAGGGGCTT	TGATCCAGTC	AGTGAAGAGG	CTTTCGATG	TCATGATCCT	800
GACTGTGCTC	TGCTGAGTGC	TGTTTGCACT	AATGGACTA	CAGCTGTTCA	850
TGGAAAGCCT	GAAGCATAAA	TGTTTTCSAA	ATTCACTTGA	AAATAAGTAA	900
ACATTAGAAA	GCTAATGAA	TACCCYAGAG	ASTGAAGAG	ACTTTAGAAA	950
ATATTTTAT	TACTTGGAG	GATCCAAAGA	TGCTCTCCTT	TGTTGTTTCA	1000
GCACAGATTC	AGGTCAGTCT	CCAGAGGGGT	ACACCTGTGT	GAAAATTGTC	1050
AGAAACCCCTG	ATTATGGCTA	CACGAGCTTY	GACACTTTCA	GCTGGGCTTT	1100
CTTAGCCCTG	TTTAGGCTAA	TGACCCAGAG	TTACTGGGAA	AACCTTTACC	1150
AACAGAGCTC	GGTGTCTGCT	GGCAAACTCT	ACATGATCTT	CTTGTCTCTA	1200
GTGATTTTCC	TGGGCTCCTT	TATCTAATA	AACCTGATCC	TGGCTGTGGT	1250
TGCCATGCA	TATGAGAAC	AGAACCAGGC	AAACTTGA	GAGCTTAAC	1300
AGAAAGAAATY	AGATTTTCA	GAGATGTTAG	ACCGTCTTAA	AAAAGAGCAA	1350
GAAGAGCTG	AGGCAATTGC	AGCGGAGGCG	GCTGAATATA	CAAGTATTAG	1400
GGAGAGCAGA	ATTATGGGCC	TCTCAGAGAG	TTCTTCTGAA	ACATCCAAAC	1450
TGAGCTCTAA	AGTGTCTAAA	GAAGAGAGAA	ACAGAGAGAA	GAAAAGAAAT	1500
CAAAAGAGC	TCTCCAGTGG	AGAGGAAAAG	GGAGATCTG	AGAAATGTC	1550
.....GAAATGAA	TGAGAGGACA	GCTGAGAG	AAAAGTTTC	CACCTTGGTG	1600
TCAGAGGGCA	TAGGCGAGCA	CATGAAAGAA	GGTTGTCTAC	CCCCAATCAG	1650
TCACCACTTC	GCATTCGTGG	CTCCTTGTTY	TCTGCCAAGGC	GAAGCAGCAG	1700
AACAGTCTTT	TTTAGTTTCA	AAGGCAGAGG	AGAGATATA	GCAATCTGAA	1750
CTGATTTTGC	CGATGATGAG	CACAGCATTY	TTGGAGACAA	TGAGAGCAGA	1800
AGGGGCTCAC	TGTTTGTGCC	CCACAGACCC	CAGGAGGGAC	GCAGCAATTA	1850
CTACAGCCAA	GGCAGTAGGT	CCCCAGCAAT	GCTTCCGGTG	AACGGGAAAA	1900
TCCACAGTGC	TGTGGACTGC	AAGCGTGTGG	TCTGCCCTGGT	TGATGAGGCG	1950
TCAGCCCTCA	TGCTCCCDAA	TGACAGCTY	CTGCCAGAGG	TGATAATGAA	2000
TAGACAGACT	TCTGATGACA	GGCCACAGAC	CAATCAATA	CACAGAGAAA	2050
GGCGTGTAG	TTCTATCTC	CTTTCAGAGG	ATATGCTGAA	TGATCCCAAC	2100
CTCAGACAGA	GAGCAATGAG	TAGAGCAAGC	ATATTAACAA	ACACTGTGGA	2150
AGAACTTGAA	GAGTCCAGAC	AAAATGTCTC	ACCTTGGTGG	TACAGATTTC	2200
CACACAATY	CTTGATCTGG	AATGCTCTC	CATATTGAGY	AAAATTCAAA	2250
AGTGTATCT	ATTTATTTGT	AATGATCTCT	TTGTGATGC	TTGCCAATTAC	2300
CATTTGCATA	GTTTAAACA	CATTATTTAT	GGCTATGGA	CACCAACCAA	2350
TGATGAGGA	ATTCAAAAT	GTAATTTCTA	TAGGAAATTT	GCTCTTTACT	2400
GGATCTTTC	CAGCTGAAAT	GGATTTAAA	CTGATTTCCA	TGATCCATA	2450
TGATGATTTG	CAAGTAGGCT	GGAAATTTT	TGACAGCTTT	ATTGTGACTT	2500
TGATTTTAGT	GGAGCTCTTT	CTAGCAGATG	TGGAAGGATY	GTCAGTTCTG	2550
CGATCACTCA	GACTGCTCGG	AGTCTTCAAG	TTGGCAAAT	CCTGGCCAAC	2600
ATTGAACATG	CTGATTAGAA	TGTTTGGTAA	CTCAGTAGGG	GCTCTAGGTA	2650
ACCTCACCTY	AGTGTGGCC	ATCATCTCT	TCATTTTGGC	TGTTGCTGGC	2700
ATGACGCTCT	TTGGTAAGAG	CTACAAAGAA	TGTGTCTGCA	AGATCAATGA	2750
TGACTGTAGG	CTCCACGGT	GGCAGTGA	CGACTCTCTC	CACTGCTTCC	2800
TGATTTGTTT	CCCGGTGCTG	TGTGGAGAGT	GGNTAGAGAC	CATGTGGGAC	2850
TGATGAGGG	TGCTGTGCA	AGCTATGTC	CTTATTTGTT	ACATGATGGT	2900
CTGTGCTATT	GGAAAGCTGG	TGCTCTTAA	CCTATTCTG	GCCTTATTAT	2950
TGAGCTGATT	TAGTTCAGAC	AATCTTACAG	CAATTGAGAA	AGACCTGAT	3000
GCAGAGAAC	TCCAGATTGC	AGTGTCTAGA	ATTAAAGAG	GATTAATTA	3050
TGTGAACAA	ACCTTAGTGG	AATTTATCT	AAAGGCAATY	TCCAAAAGC	3100
CAAGATTTTC	CAGGAGATA	AGACAGCAG	AGATCTGAA	TACTAGAGAG	3150
GAAGACTATA	TTTCTAAGCA	TACACTTCT	GAATGAGCA	AGGTGACAA	3200
TTTCTCAAG	GAAGAGATA	AATCAAGTGC	TTTTGAAAGC	AGCGTGACA	3250
AACACTTGAAT	GGAGAGAGT	GATGCTCAAT	CATTTATTCA	CAATCCAGC	3300
CTCACAGTGA	CAGTCCCAAT	TGCACCTGGG	GAATCCGATY	TGAAAATAT	3350
GAATGCTGAG	GAATTTAGCA	GTAATTCGGA	TAGTGAATAC	AGCAAAGTGA	3400

Figura 14A

GATTAACCG	GTCAAG..CC	TCAGACTGCA	GCACACTGCA	TAACCCCTTG	3450
CCTGGGGAAG	GAGAAGAAG	AGAGGCTGGA	CCTATGAATT	CCCATGAGCC	3500
AGAGGCTGT	TTACAGATG	GTTGTGTACG	GAGGTTTCNA	TGCTGCCAAG	3550
TTACATAGA	GTCAAGGAAA	GGAAAATCT	GGTGGACAT	CAGGAAAACC	3600
TGCTACAGA	TTGTTGACA	CAGTTGGTTT	GAAAGCTTCA	TTCTCCTCAT	3650
GATCCTGCTC	AGCASTGGTG	CCCTGGCTTT	TGAAGATATT	TATATTGAAA	3700
GGAAAAGAC	CATTAAGATT	ATCCTGGAST	ATCCAGACNA	GATCTTCACT	3750
TACATCTTCA	TTCTGGAAT	GCTTCTAAA	TGGATAGCAT	ATGTTTATAA	3800
AACATATTC	ACCAATGCTT	GGTGTGGCT	GGATTTCCTA	ATTGTTGATG	3850
TTCTTTGGT	TACTTTAGTG	GCAACACTC	TTGGCTACTC	AGATCTTGGC	3900
CCCATTAAAT	CCCTTGGAC	ACTGAGAGCT	TTAAGACTC	TAAGAGCTTT	3950
ATCTAGATT	GAAGGAATG	GGTTCGTTGT	GAATGCCTC	ATGGAGCAA	4000
TTCTTTCCAT	CATGAATGTG	CTACTTCTGT	GTCTTATATT	CTGGCTGATA	4050
TTCAAGATCA	TGGAGTAAA	TTGTTTGGT	GGCAAGTCTT	ATGAGTGTAT	4100
TACACCCACA	GATGGGTGAC	GTTTCTCTGC	AAGTCAASTT	CCAAATCGTT	4150
CCGATGTGTT	TGCCCTTATG	AATGTTAGTC	AAAATGTGCG	ATGGAAAAC	4200
CTGAAGTGA	ACTTTGATA	TGTCGGACTT	GTTTACCIAT	CTCTGCTTCA	4250
AGTTGCCACT	TTAAGGGAT	GGACGATTAT	TATGTATGCA	GCAGTGGATT	4300
CTGTTAATGT	AGACAAGCAG	CCCMAATATG	AATATAGCCT	CTACTGTAT	4350
ATTTATTTTG	TGCTCTTAT	CATCTTTGGG	TGATTTCTCA	CTTTGAAGTT	4400
GTTCTATGGT	GTCACTATAG	ATAATTTCAA	CCAACAGAAA	AGAAGCTTG	4450
GAGGTCAGGA	CATCTTTATG	ACAGAAGAAC	AGAGAANA	CTATAATGCA	4500
ATGAAAAGC	TGGGTCCAA	GGAGCCACA	AAGCCATTC	CTCCAGCCGG	4550
GAACAAATC	CAAGGATGA	TATTTGACTT	AGTGACAAT	CAAGCCTTTG	4600
ATATTAGTAT	CATGGTCTT	ATCTGTCTCA	ACATGGTAC	CATGATGGTA	4650
GAAGAAGAGG	GTCAAGTCA	ACATATGACT	GAATTTTAT	ATTGGATAAA	4700
TGTTGTTTTT	ATAATCTTT	TCCTGGAGA	ATGTTGCTA	AACTGTACT	4750
CCCTCAGACA	CTACTACTTC	ACTGTAGGAT	GGATATTTT	TGATTTTGTG	4800
GTTTGTGATTA	TCTCCATTT	AGGTATGTTT	CTAGCTGAT	TGATTTGAAC	4850
GTATTTTGTG	TCCCCTACCC	TGTTCCGAGT	GATCCGCTT	GCCAGGATTG	4900
GCCGAATCCT	AGTCTAGTC	AAAGGAGCAA	AGGGATCCG	CAGCCTGCTC	4950
TTGCTTTGCA	TGATGTCCTT	TCCCTGGTGG	TTAACAATCC	GCCTCTCTCT	5000
CTTCTCTGTC	AGTTTCACT	AGCCCATCTT	TGGAATGTC	AAGTTTGCCT	5050
ATGTTAAAAA	GGAAGATGGA	ATTAATGACA	TGTTCAATTT	TGAGACCTTT	5100
GGCAACAGTA	TGATTTGCTT	GTTCCAAAT	ACAACCTCTG	CTGGCTGGGA	5150
TGATTTCTTA	GCACCTATTC	TTAACAGTAA	GGCAACCAGC	TGTGACCCAA	5200
AAAAAGTTCA	TCTTGGAGTT	CAGTTGAAG	GAGACTGTG	GTAACCCATCT	5250
GTTGGAATAT	TCTACTTTGT	TGTTTATATC	ATCATATCTT	TCTGGTTTGT	5300
GTTGAAATG	TACATTCAG	TCATCTGGA	GAATTTTGT	GTTGCCACTG	5350
AGAAAGTAC	TGAACCTCTG	AGTGGAGATG	ACTTTGAGAT	GTTCTATGAG	5400
GTTTGGGAGA	AGTTTGAATC	CGATGCAAC	CGATTTATAG	AGTTCTCTAA	5450
ACTCTCTGAT	TTTGCAGCTG	CCCTGGATCC	TCTCTCTCTC	ATAGCAAAAC	5500
CCACAAAGT	CCACTCTATT	CCCATGGATC	TCCCATGCT	TAGTGGTAC	5550
CGATTTCAAT	GTCTTGCAT	CTTATTTGCT	TTTACAAGC	GTCTTTTGGG	5600
TGAGATGGG	GAGATGGATT	CTCTTCTTTC	ACGATGCA	GAAGGTTCA	5650
TGCTTGCAAA	TCTTTCAAA	GTGTCCTATG	AACCCCTCAE	AAGCACACTA	5700
AAACCGAAAC	AAGAGATGT	GTCTCTACT	GTCTTCAAGC	GTGCTTATAG	5750
ACGTTACCOC	TTAAGCCAAA	ATGTCAAAA	TATATCAAGT	ATATACATA	5800
AGATGGAGA	CAGAGATGAT	GATTEACTCA	ATAAAGAGA	TATGCTTTT	5850
GATAATGTTA	ATGAGAATC	AGTCCAGAA	AAAACAGATG	CCACTTCAATC	5900
CACCCCTCT	CCACCTTCAT	ATGATAATGT	AACAAAGCCA	GACAAAGAGA	5950
AATATGAACT	AGACAGACA	GAAAGGAG	ACAAAGGAA	AGACAGCAG	6000
GAAGCAAAA	AATAGAGCTT	CATTTTGTAT	ATATTTGTTA	CAGCCTTGA	6050
AGTGTATTA	TTGTOTTTA	TAAACTCTT	TTGAGGAGT	CTATGCCAAA	6100
ATCTTTTAA	TCAAAATATT	CTGAAAGCA	GTGCACTCAC	TAACCTGTAT	6150
TTCTTAAGAA	AGTGGGCAG	CATTAAGCAG	TGTTATTTT	TGCACTGATG	6200
ATTCTTTAG	AATGTTAAG	GACTCTGTA	GGATTTATG	ATTATAGCAT	6250
ACAAAAGTA	TTGATTCAGT	TTTTTGGTTT	TTATTAATC	AAAGACCAT	6300
GTGAAAAC	TTTACATCTG	CCTTCTCATC	TTTTTCAAGG	ATTGTAATTA	6350
GTCTTGTTC	CCATGTAAT	AAACAACACA	CGCTACAG	AAAAAASAA	6400
AAAA					6400

Figura 14B



European Patent Office
Postbus 5818
2280 HV RIJSWIJK
NETHERLANDS
Tel. +31 (0)70 340-2040
Fax +31 (0)70 340-3016



Naylor, Kathryn May
Mathys & Squire LLP
120 Holborn
London
EC1N 2SQ
GRANDE BRETAGNE

**For any questions about
this communication:**
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
07.08.08

Reference P19793EP-PCTKMN	Application No./Patent No. 95939723.3 - 1212 / 0789575
Applicant/Proprietor TROPHIX PHARMACEUTICALS, INC., et al	

Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 95939723.3 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 18.02.08 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

The request for amendments received at the EPO on 30.06.08 and any subsequent modifications agreed with the applicant have been taken into account.

Patent No. : 0789575
Date of filing : 02.11.95
Priority claimed : 02.11.94/USA 334029
07.06.95/USA 482401

Designated Contracting States
and Proprietor(s) : AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
TROPHIX PHARMACEUTICALS, INC.
40 Cragwood Road
South Plainfield, NJ 07080/US

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
THE RESEARCH FOUNDATION OF
STATE UNIVERSITY OF NEW YORK
State University of New York at Stony Brook,
Stony Brook, NY 11794-3366/US

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 08/36 of 03.09.08.



European Patent Office
Postbus 5818
2280 HV RIJSWIJK
NETHERLANDS
Tel. +31 (0)70 340-2040
Fax +31 (0)70 340-3016



Naylor, Kathryn May
Mathys & Squire LLP
120 Holborn
London
EC1N 2SQ
GRANDE BRETAGNE

**For any questions about
this communication:**
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
07.11.08

Reference P19793EP-PCTKMN	Application No./Patent No. 95939723.3 - 1212 / 0789575
Applicant/Proprietor NPS PHARMACEUTICALS, INC., et al	

Communication

concerning the registration of amendments relating to

- a transfer (R. 22 and 85 EPC)
 entries pertaining to the applicant / the proprietor (R. 143(1)(f) EPC)

As requested, the entries pertaining to the applicant of the above-mentioned European patent application / to the proprietor of the above-mentioned European patent have been amended to the following:

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
NPS PHARMACEUTICALS, INC.
550 Hills Drive, 3rd Floor
Bedminster, NJ 07921/US

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
THE RESEARCH FOUNDATION OF
STATE UNIVERSITY OF NEW YORK
State University of New York at Stony Brook,
Stony Brook, NY 11794-3366/US

The registration of the changes has taken effect on 29.08.08.

In the case of a published application / a patent, the change will be recorded in the Register of European Patents and published in the European Patent Bulletin (Section I.12 / II.12).

Your attention is drawn to the fact that, in the case of the registration of a transfer, any automatic debit order only ceases to be effective from the date of its express revocation (cf. point 14(c) of the Arrangements for the automatic debiting procedure, Supplement to OJ EPO 10/2007).