

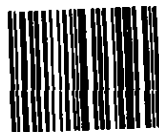
AS: 04.336



REPUBLICA DE COLOMBIA



DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



00 59230

DE
DE
N

Medicacion: 1 COX-2
Fecha (R.D): 2000-08-28 17:19:58
Trasite: CO2 PATENTES D 1 REGISTRO 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

G.D. SEARLE & CO.

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Estados Unidos de América

Departamento o Estado

Illinois

Ciudad

Skokie

Dirección

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

RAMIRO CASTRO DUQUE

Dirección

Cra 7 No. 16-56 Piso 9

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

James K. Gierse

Dirección y Domicilio

St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América

Identificación

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

CICLOOXIGENASA-1(COX-1) CANINA Y CICLOOXIGENASA-2(COX-2)

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

(33) País US

(32) Fecha 99-08-06

(31) No. Solicitud 60/147,601

DE ACUERDO CON EL ARTICULO 4C - LITERAL 3 DEL CONVENIO DE PARIS

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

C12N 9/00 // C12N 15/52 // A61K 38/43

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

2

Se relaciona con genes que codifican proteínas de las enzimas de ciclooxigenasa -1(COX-1) canina y ciclooxigenasa-2(COX-2) canina, las proteínas de COX-1 canina y COX-2 canina, y pruebas para la evaluación de actividades de COX-1 canina y COX-2. La invención se relaciona también con moléculas de ácido nucleico asociadas con estos genes incluyendo sus componentes, homólogos y fragmentos, y con métodos de utilizar estas moléculas de ácido nucleico, las enzimas y fragmentos de cualquiera de las dos.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica

☐

Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C. Protocolo No.226

☒

Recibo de la tasa respectiva \$608.000 (Recibo No.43,081)

☒

Si se reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada)

☐

Traducción oficial

☐

Capítulo descriptivo

☒

Dibujos, planos necesarios

☐

Capítulo reivindicatorio

☒

Tarjeta archivo propietarios según formato

☒

Tarjeta archivo temático según formato

☐

Extracto para resumen o para publicación según formato

☐

Arte final 12 x 12 cms

☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD



FIRMA DEL APODERADO

Agosto 08, 2000
CPB/hsr.

CC.170.322 de Btá TP.No.1003 del C.S.J.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 06059230 06000000

Folios: 143

Fecha (ADD): 2000-08-08 17:19:58

Tramite : C22 PATENTES D I REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 00 - 43,081
FECHA : JULIO 12 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	517690	12/07/2000	9,812.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT./ RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608.000.00
	TOTAL :	\$ 608.000,00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax 281 31 25
Santa Fe de Bogotá D C , Colombia

14

CICLOOXIGENASA - 1 (COX-1) CANINA Y CICLOOXIGENASA -

2 (COX-2)

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con genes que codifican proteínas de enzimas de ciclooxigenasa - 1 (COX-1) canina y ciclooxigenasa - 2 (COX-2) canina, con proteínas de COX-1 canina y COX-2 canina, y con pruebas para la evaluación de actividades de COX-1 canina y COX-2. La invención tiene que ver además con moléculas de ácido nucleico asociadas con estos genes y sus complementos, homólogos y fragmentos, y con métodos de usar estas moléculas de ácido nucleico, las enzimas y fragmentos de cualquiera de las dos.

Antecedentes

Millones de perros se mantienen como mascotas para usos utilitarios (verbigracia, perros para guía de ciegos o perros guardianes (Olson y Moulton, *J Reprod Fertil Suppl* 47: 433-8 (1993)). Es bien sabido que procesos inflamatorios crónicos tales como la enfermedad degenerativa de las articulaciones son comunes en la especie canina, es decir, perros, en especial perros ya entrados en años. Sin embargo, existen pocas drogas que pueden utilizarse exitosamente en medicina veterinaria para el tratamiento de inflamación (*Compendium of Veterinary Products*, Bennett, 2ª edición, 1993). En consecuencia, existe un esfuerzo progresivo por encontrar agentes farmacéuticos que impidan o detengan por completo el avance de dichos procesos de enfermedad inflamatoria en perros, o, por lo menos, mejoren los síntomas de la inflamación tales como dolor y edema.

25

Drogas anti-inflamatorias no esteroideas, o NSAIDs por su sigla en inglés, han sido investigadas extensamente en cuanto a actividad anti-inflamatoria en humanos y, en forma más limitada, en perros. Sólo dos NSAIDs han sido aprobadas para uso en perros por la Administración de Drogas y Alimentos, Comité de Medicina Veterinaria (FDA/CVM), y esto ha tenido como resultado que NSAIDs aprobadas para humanos tengan en los perros un uso importante no autorizado. El uso de NSAIDs en perros ha llevado a daño severo e incluso muerte debida a hemorragia gastrointestinal, perforación y peritonitis, y toxicidad renal y hepática. Aunque las toxicidades NSAID se observan también en humanos, son más pronunciadas en perros debido a dosis inadecuadamente altas derivadas de una falta de información de dosificación, así como al grado inherentemente elevado de susceptibilidad canina a dichas reacciones adversas. Una alternativa a las NSAIDs, corticosteroides, tiene efectos colaterales incluso más drásticos, especialmente cuando se halla implicada una terapia de largo plazo (MacDonald y Langston, Uso de Corticosteroides y Agentes Anti-Inflamatorios no Esteroidales, en: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 284, Ettinger y Feldman, editores (1995)).

La toxicidad de las NSAIDs es un resultado de su falta de especificidad en la inhibición de la prostaglandina. Las prostaglandinas, un grupo de compuestos derivados del ácido araquidónico por la acción de ciclooxigenasa, son conocidas por estar implicadas en el proceso inflamatorio. Algunas de estas prostaglandinas median la inflamación; no obstante, algunas de estas prostaglandinas tienen también un efecto gastrointestinal protector. Se encontró que NSAIDs previas prevenían la

liberación de prostaglandina inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX) (Rubin y Papich, *Curr. Vet. Ther.* X: 47-54 (1989)). El reciente descubrimiento de una enzima ciclooxigenasa inducible asociada con la inflamación (ciclooxigenasa II ó COX-2), proporciona una diana viable de inhibición que puede reducir efectivamente la inflamación y producir efectos colaterales inferiores en número y menos drásticos de lo que ocurre tomando como diana las dos enzimas COX-1 y COX-2. Se ha demostrado que la isozima COX-2 es responsable de la producción de prostaglandinas exclusiva o principalmente en sitios inflamatorios. Drogas que selectivamente inhiben la isozima COX-2 en relación con la isozima humana COX-1 pueden reducir la inflamación sin los efectos colaterales de toxicidad gastrointestinal en humanos.

Durante muchos años, la única ciclooxigenasa conocida fue la isoforma COX-1. Desde su descubrimiento, la forma inducible (COX-2) se ha clonado, secuenciado, y caracterizado a partir de fuentes de pollo, de oveja, murinas, y humanas. Estas enzimas purificadas han suministrado un medio para pruebas y materiales para identificar y evaluar los agentes farmacéuticos humanos que selectivamente inhiben la COX-2 relativa a la COX-1.

Sumario de la Invención

Una forma canina sustancialmente purificada de las enzimas COX-1 y COX-2 proporcionaría un medio para llevar a cabo pruebas y materiales valiosos en la identificación de drogas que puedan reducir la inflamación en perros y que carecen de los efectos tóxicos de las terapias caninas actuales.

Por eso, en el arte existe una necesidad sustancial de COX-1 y COX-2 caninas clonadas, secuenciadas y caracterizadas, y pruebas para tamizar y evaluar inhibidores selectivos de COX-2.

La presente invención provee una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que específicamente se hibridiza a una molécula de ácido nucleico que tiene una ID. SEC. descrita aquí o complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica para una proteína COX-2 canina o fragmento de la misma complemento de cualquiera de los dos. La presente invención proporciona además una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que específicamente se hibridiza con una ID. SEC. descrita aquí o complemento de la misma, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica para una proteína COX-1 canina o fragmento de la misma o complemento de cualquiera de los dos. También se revelan secuencias de proteína sustancialmente purificada de COX-1 y COX-2 caninas. Esta invención provee igualmente pruebas y materiales para identificar y evaluar agentes veterinarios que son inhibidores potentes de COX-2 canina.

En una incorporación la presente invención aporta una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada, seleccionada del grupo de ADN's que comprenden una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, el complemento de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, un fragmento interno de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, y un fragmento interno del complemento de la molécula de ácido nucleico

28

que tiene ID. SEC.: 1, en donde ID. SEC.: 1 codifica una proteína COX-1 canina o fragmento de la misma.

En otra incorporación la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de COX-1 canina sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 20 nucleótidos continuos de ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma.

En otra incorporación la presente invención suministra una proteína COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma codificada por una secuencia de ácido nucleico que específicamente se hibridiza con una ID. SEC.: 1 ó con un complemento de la misma.

En otra incorporación la presente invención provee una proteína COX-1 canina sustancialmente purificada con una ID. SEC.: 2.

En otra incorporación la presente invención proporciona una proteína COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma que comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 2.

En otra incorporación la presente invención aporta un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a una proteína COX-1 canina que tiene ID. SEC.: 2.

En otra incorporación la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada seleccionada del grupo de ADNs que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, una molécula complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, un fragmento interno de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, y un fragmento interno de una molécula complemento de

una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, en donde ID. SEC.: 3 codifica una proteína COX-2 canina o un fragmento de la misma.

En otra incorporación la presente invención suministra una molécula de ácido nucleico de COX-2 canina sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 20 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó su complemento.

En otra incorporación la presente invención aporta una proteína COX-2 canina sustancialmente purificada o fragmento de la misma codificada por una secuencia de ácido nucleico que específicamente se hibridiza que tiene ID. SEC.: 4 ó su complemento.

En otra incorporación la presente invención proporciona una proteína COX-2 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 4.

En otra incorporación la presente invención suministra una proteína COX-2 canina sustancialmente purificada o fragmento de la misma en donde la proteína o el fragmento de la misma comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 4.

En otra incorporación la presente invención aporta un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a una proteína COX-2 canina que tiene ID. SEC.: 4.

En otra incorporación la presente invención proporciona una célula transformada que tiene una molécula de ácido nucleico que comprende una región de promotor exógeno ligada a una secuencia de ácido nucleico estructural, y a una secuencia 3' no trasladada ligada a la secuencia de ácido nucleico estructural, en donde la región de promotor exógeno origina la producción de la molécula del ARNm; la secuencia de ácido nucleico

estructural codifica un gen de COX-1 canina o un fragmento de la misma; y la secuencia 3' no trasladada da lugar a la terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de la molécula de ARNm.

En otra incorporación la presente invención suministra una célula transformada que tiene una molécula de ácido nucleico que comprende una región de promotor exógeno enlazado a una secuencia de ácido nucleico estructural, y una secuencia 3' no trasladada, en donde la región de promotor exógeno origina la producción de una molécula de ARNm; la molécula estructural de ácido nucleico codifica un gen de COX-2 canina o un fragmento de la misma; y la secuencia 3' no trasladada da lugar a la terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de la molécula de ARNm.

En otra incorporación la presente invención aporta un método para probar una proteína de COX-2 canina en una célula, que comprende (A) incubar una molécula de ácido nucleico marcador' con una molécula de ácido nucleico complementario obtenida de la célula, en donde la incubación se lleva a cabo bajo condiciones que permitan la hibridación del ácido nucleico, y la molécula de ácido nucleico marcador' sea capaz de hibridarse específicamente bajo condiciones de alta astringencia a una COX-2 canina que codifica una molécula de ácido nucleico o un complemento de la misma; (B) hibridar la molécula de ácido nucleico marcador' con la molécula de ácido nucleico complementario; y (C) probar el ácido nucleico complementario, en donde la prueba es predictiva del nivel o patrón de la proteína COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención provee un método de diagnóstico o prognosis de una condición asociada con la COX-2 en un perro, en donde el método comprende probar la concentración de una molécula, dependiendo la concentración de la expresión del gen de COX-2 canina, y siendo la molécula susceptible de prueba en una muestra biológica del perro.

En otra incorporación la presente invención aporta un método para diagnosticar una condición asociada con la COX-2 en un perro que incluye los pasos de: (A) incubar bajo condiciones que permitan una hibridación de ácido nucleico [con] una molécula de ácido nucleico marcador con una molécula de ácido nucleico complementario obtenida de una muestra biológica del perro; (B) hibridizar la molécula de ácido nucleico marcador con la molécula de ácido nucleico complementario; y (C) probar la molécula hibridizada de ácido nucleico marcador y la molécula de ácido nucleico complementario en cuanto a polimorfismo; diagnosticando así la condición asociada con la COX-2 en el perro, en donde: la molécula de ácido nucleico marcador comprende una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que específicamente se hibridiza con otro polinucleótido que se liga a un gen de COX-2 canina; y el polimorfismo es predictivo de una mutación que afecta la condición de COX-2 canina en el perro.

En otra incorporación la presente invención provee un método de determinar una asociación entre un polimorfismo y un rasgo expresado por un perro, en donde el método comprende: (A) hibridizar una molécula de ácido nucleico, específica por polimorfismo, con un gen en la célula, en donde la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácido nucleico

de ID. SEC.: 3 ó un complemento del mismo; y (B) determinar el grado de asociación entre el polimorfismo y el rasgo.

En otra incorporación la presente invención brinda un método de producir una célula que contiene una proteína COX-2 canina expresada que comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo así la célula que contiene la proteína COX-2 canina expresada, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural, la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3, la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para producir la terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm; y la molécula de ácido nucleico funcional resulta en la expresión de la proteína COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método de producir una célula que exhibe co-supresión de una proteína COX-2 canina que incluye: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo así la célula que exhiba co-supresión de la proteína COX-2 canina, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural, la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3, la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para originar la terminación de transcripción y adición de

ribonucleótidos poliadenilados al extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión de la proteína COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención brinda un método par producir co-supresión de una proteína COX-2 canina en una célula transformada, que comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico para producir una célula transformada; y (B) cultivar la célula transformada; causando así co-supresión de la proteína COX-2 canina en la célula transformada; en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor; la región de promotor está ligada a una región estructural, la región estructural comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3, la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para dar lugar a terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión de la proteína COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención aporta un método de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína COX-2 canina o un fragmento de la misma, que comprende: (A) incubar bajo condiciones, que permitan hibridación del ácido nucleico, una primera molécula de ácido nucleico que incluye ID. SEC.: 3 ó el complemento de la misma con una segunda molécula de ácido nucleico complementario obtenida de una célula; (B) hibridizar la primera molécula de ácido nucleico

con la segunda molécula de ácido nucleico; y (C) aislar la segunda molécula de ácido nucleico.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método de producir una célula que contiene un gen expresado de COX-2 canina que comprende (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo así la célula que contiene el gen expresado de COX-2 canina, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural en donde la región estructural comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma; la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para dar lugar a la terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico funcional resulta en sobre-expresión de la proteína del gen de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención aporta un método de producir una célula que exhibe supresión de un gen de COX-2 canina que comprende (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo así una co-supresión de célula de un gen de COX-2 canina, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural en donde la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo conformado por ID. SEC.: 3 o complementos del mismo; la región

16/15

estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión del gen de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención brinda un método de producir co-supresión de un gen de COX-2 canina en una célula, que comprende (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico; y (B) cultivar la célula transformada; reduciendo así la expresión del gen de COX-2 canina en una célula, en donde la molécula de ácido nucleico tiene una región de promotor exógeno que causa la producción de una molécula de ARNm, la región de promotor exógeno está ligada a una molécula de ácido nucleico transcrita que tiene una hebra transcrita y una hebra no transcrita, la hebra transcrita es complementaria con la molécula de ácido nucleico que tiene un ácido nucleico seleccionado del grupo conformado por ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma, y la hebra transcrita es complementaria con una molécula de ARNm endógeno, y la molécula de ácido nucleico transcrita está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para ocasionar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm.

En otra incorporación la presente invención provee una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que comprende una secuencia que codifica una proteína de COX-2 canina de mamífero.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener la actividad de COX-2 canina, en donde el método comprende (A) poner en contacto con el material de prueba una célula transformada de prueba, en donde la célula transformada expresa un gen que codifica la COX-2 canina, y en donde el contacto se realiza en presencia de una cantidad de prueba de precursor de prostaglandina; (B) medir la conversión del precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina mediante las células transformadas de prueba; (C) poner en contacto una célula transformada de control con una cantidad de control de precursor de prostaglandina, en donde la célula transformada de control expresa un gen que codifica una COX-2 canina, y en donde el contacto se lleva a cabo sustancialmente en ausencia del material de prueba; (D) medir la conversión de prostaglandina en producto de prostaglandina mediante células transformadas de control; y (E) comparar la cantidad de precursor de prostaglandina, convertido en producto de prostaglandina mediante las células transformadas de prueba, con la cantidad de precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina mediante las células transformadas de control. En una incorporación preferida, el precursor de prostaglandina es ácido araquidónico.

Breve Descripción de los Dibujos

Fig. 1 establece mediante un diagrama una comparación entre la secuencia de aminoácido que codifica para la COX-1 canina y la secuencia de aminoácido que codifica para la COX-1 humana.

17

Fig. 2 establece mediante un diagrama una comparación entre las secuencias de aminoácido de COX-2 canina y la COX-2 humana.

Fig. 3 establece mediante un diagrama una comparación entre las secuencias de ácido nucleico que codifican para la COX-2 canina y humana, y la secuencia de consenso de ambas.

Fig. 4 establece mediante un diagrama una comparación entre las secuencias de aminoácido de COX-2 de ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, caballo, perro, oveja, humano y pollo.

NO. SEC.: 1 – secuencia de ácido nucleico de COX-1 canina (*Canis familiaris*)

NO. SEC.: 2 – secuencia de aminoácido de COX-1 canina (*Canis familiaris*)

NO. SEC.: 3 – secuencia de ácido nucleico de COX-2 canina (*Canis familiaris*)

NO. SEC.: 4 – secuencia de aminoácido de COX-2 canina (*Canis familiaris*)

NO. SEC.: 5 – secuencia de ácido nucleico de COX-1 humana (*Homo sapiens*)

NO. SEC.: 6 – secuencia de aminoácido de COX-1 humana (*Homo sapiens*)

NO. SEC.: 7 – secuencia de ácido nucleico de COX-2 humana (*Homo sapiens*)

NO. SEC.: 8 – secuencia de aminoácido de COX-2 humana (*Homo sapiens*)

18
H

NO. SEC.: 9 – secuencia de aminoácido de COX-2 de ratón
(*Mus muscus*)

NO. SEC.: 10 – secuencia de aminoácido de COX-2 de rata
(*Rattus norvegicus*)

NO. SEC.: 11 – secuencia de aminoácido de COX-2 de
conejo de Indias (*Cavia porcellus*)

NO. SEC.: 12 – secuencia de aminoácido de COX-2 de
conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

NO. SEC.: 13 – secuencia de aminoácido de COX-2 de
caballo (*Equus caballus*)

NO. SEC.: 14 – secuencia de aminoácido de COX-2 de
oveja (*Ovis aries*)

NO. SEC.: 15 – secuencia de aminoácido de COX-2 de
pollo (*Gallus gallus*)

Estas descripciones detalladas se presentan para efectos de ilustración únicamente y pretenden ser una restricción de la órbita de la invención. Más bien, ellas son tan sólo algunas de las incorporaciones que entendería una persona con habilidades en el arte, dado el contenido total de esta revelación. Todas las partes son en peso y las temperaturas son en grados centígrados, a menos que se indique lo contrario.

La siguiente es una lista de abreviaturas y los significados correspondientes como se emplean aquí de modo intercambiable:

20/19

IMDM = Medios de Dulbecco modificados de Iscove

mg = miligramo

ml = mililitro

mL = mililitro

µg = microgramo

µl = microlitro

ODNs = Oligonucleótidos

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

RP-HPLC = Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa

ug = microgramo

ul = microlitro

La siguiente es una lista de definiciones de varios términos empleados aquí:

El término “alterado” significa que la expresión difiere de la respuesta de expresión de células o tejidos que no exhiben el fenotipo.

El término “aminoácido(s)” significa todos los L-aminoácidos de ocurrencia natural.

El término “desplazamiento cromosómico” significa un proceso de extender un mapa genético por medio de pasos sucesivos de hibridación.

El término “complementariedad completa” significa que cada nucleótido de una molécula es complementario con un nucleótido de otra molécula.

El término “degenerado” significa que dos moléculas de ácido nucleico codifican para las secuencias del mismo aminoácido pero comprenden secuencias de nucleótido diferente.

El término “material genético exógeno” significa cualquier material genético, bien sea de ocurrencia natural o de otra clase, de cualquier fuente que sea capaz de ser insertado en cualquier organismo.

El término “respuesta de expresión” significa la mutación que afecta el nivel o patrón de la expresión codificada en todo o en parte por una o más moléculas de ácido nucleico.

El término “fragmento” significa una molécula de ácido nucleico cuya secuencia es más corta que la diana o molécula de ácido nucleico identificada y que tiene el complemento idéntico, sustancial, o el homólogo sustancial de por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la diana o molécula de ácido nucleico identificada.

El término “molécula de fusión” significa una molécula codificadora de proteína o fragmento que, al expresarse, produce una proteína de fusión.

El término “proteína de fusión” significa una proteína o fragmento de la misma que comprende una o más regiones de péptido adicional no derivadas de esa proteína.

El término “ácido nucleico marcador” significa una molécula de ácido nucleico que se utiliza para determinar un atributo o característica (*verbigracia*, presencia o ausencia, ubicación, correlación, etc.) de una molécula, célula o tejido.

22

El término “mimético” se refiere a un compuesto que tiene propiedades funcionales y/o estructurales similares a otro compuesto conocido o un fragmento particular de ese compuesto conocido.

El término “fenotipo” significa una o más características cualesquiera de un organismo, tejido o célula.

El término “sonda” significa un agente que se utiliza para determinar un atributo o característica (verbigracia, presencia o ausencia, ubicación, correlación, etc.) de una molécula, célula, tejido, u organismo.

El término “promotor” se emplea en un sentido amplio para referirse a la(s) secuencia(s) reguladora(s) que controlan la producción del ARNm.

El término “fragmento de proteína” significa una molécula de péptido o de polipéptido cuya secuencia de aminoácido comprende un subconjunto de la secuencia de aminoácido de esa proteína.

El término “molécula de proteína” o “molécula de péptido” significa cualquier molécula que comprende cinco o más aminoácidos.

El término “recombinante” significa cualquier agente (verbigracia, ADN, péptido, etc.) que es, o resulta de, aunque en forma indirecta, manipulación humana de una molécula de ácido nucleico.

El término “genes marcadores seleccionables o tamizables” significa genes cuya expresión puede detectarse mediante una sonda como medio de identificar o seleccionar células transformadas.

El término “ligar sistemáticamente” significa que el ligamiento de un anticuerpo o péptido no se inhibe competitivamente por la presencia de moléculas no relacionadas.

El término “específicamente hibridizante” significa la cualidad de tener un nivel muy alto de afinidad por otro material, por ejemplo, de una hebra de ácido nucleico por una hebra complementaria que tiene un grado alto de homología.

El término “secuencia de ácido nucleico estructural” significa una secuencia de ácido nucleico que porta la codificación para la secuencia de aminoácido de una proteína específica.

El término “complemento sustancial” significa que una secuencia de ácido nucleico comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia con el complemento.

El término “fragmento sustancial” significa un fragmento que comprende por lo menos 100 nucleótidos.

El término “homólogo sustancial” significa que una molécula de ácido nucleico comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia con otra.

El término “sustancialmente hibridizante” significa que dos moléculas de ácido nucleico pueden formar una estructura de ácido nucleico anti-paralela, de doble hebra, bajo condiciones (verbigracia, sal y temperatura) que permitan la hibridación de secuencias que presenten 90% de identidad de secuencia, o mayor, entre sí y que exhiban esta identidad para por lo menos 50 nucleótidos contiguos de las moléculas de ácido nucleico.

El término “sustancialmente purificado” significa que una o más moléculas que están o pueden estar presentes en una preparación de

ocurrencia natural que contiene la molécula diana se habrá retirado o reducido en concentración.

El término “rasgo” significa cualquier condición o estado determinado genéticamente que incluye una condición sana, una condición de enfermedad, o una condición pasiva.

Descripción Detallada de la Invención

I. Síntesis

La presente invención se deriva parcialmente del aislamiento de moléculas de ADNc que codifican COX-1 canina y COX-2 canina. ID. SEC.: 1 establece la secuencia de ácido nucleico de COX-1 canina e ID. SEC.: 2 establece la secuencia de aminoácido de COX-2 canina. ID. SEC.: 3 establece la secuencia de ácido nucleico de COX-2 canina e ID. SEC.: 4 establece la secuencia de aminoácido de COX-2 canina. Figura 1 establece mediante un diagrama una comparación entre las secuencias de aminoácido de COX-1 humana y la COX-1 canina: Figura 2 establece mediante un diagrama una comparación entre la secuencia de aminoácido que codifica para la COX-2 humana y la secuencia de aminoácido que codifica para la COX-2 canina. Figura 3 establece mediante un diagrama una comparación entre las secuencias de ácido nucleico de COX-2 humana y canina, y su secuencia de consenso. Figura 4 establece un alineamiento de secuencia múltiple de las isozimas de la ciclooxigenasa-2 de ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, caballo, perro, oveja, humano, y pollo.

II. Moléculas de la presente invención

Los métodos de la presente invención son particularmente útiles en el monitoreo de la expresión de COX-2 canina. Los métodos de la presente invención son útiles además en el tamizado de materiales, compuestos o composiciones que inhiban selectivamente la COX-2 canina. Los métodos de la presente invención son asimismo relevantes en el monitoreo de la expresión de COX-2 canina en caninos con condiciones relacionadas con la COX-2, especialmente enfermedad inflamatoria de las articulaciones y cáncer. Las moléculas de la presente invención están en capacidad de ser usadas para diagnosticar la expresión anormal de COX-2 canina. Adicionalmente, las moléculas de la presente invención pueden emplearse como agentes terapéuticos. Las moléculas de la presente invención pueden ser de ocurrencia natural o de ocurrencia no natural (es decir, preparadas sintéticamente). Tal como se emplea aquí, una molécula de ocurrencia natural puede ser "sustancialmente purificada", si se desea, de manera que una o más impurezas que están o puedan estar presentes en una preparación de ocurrencia natural que contiene a la molécula habrán sido retiradas estarán presentes en una menor concentración que aquella en la cual se encontrarían normalmente.

Las moléculas de la presente invención serán preferiblemente "biológicamente activas" con respecto bien sea a un atributo estructural, tal como la capacidad de una molécula de ácido nucleico de hibridarse con otra molécula de ácido nucleico, o la capacidad de una molécula de proteína de ser ligada por una molécula de anticuerpo (o de competir con otra molécula para dicho ligamiento). Alternativamente, dicho atributo puede

25

ser catalítico, y de ese modo implicar la capacidad del agente de mediar una reacción o respuesta química.

Las moléculas de la presente invención comprenden moléculas de ácido nucleico, proteínas, y pequeños compuestos orgánicos (es decir, que tienen un peso molecular de menos de alrededor de 2.000).

A. Moléculas de Ácido Nucleico

Una clase preferida de agentes de la presente invención comprende moléculas de ácido nucleico de COX-2 canina. Dichas moléculas pueden ser de ADN o ARN.

En una incorporación, dichas moléculas de ácido nucleico codificarán todas o un fragmento de la proteína de COX-2 canina, su "promotor", o sus secuencias flanqueantes de gen. El término "promotor" se usa aquí en un sentido amplio para referirse a la(s) secuencia(s) reguladora(s) que controlan la producción de ARNm. Dichas secuencias incluyen sitios de enlace de ARN polimerasa, reforzadores, etc. La totalidad de dichas moléculas de COX-2 canina pueden usarse en un contexto diagnóstico o terapéutico.

Las moléculas fragmentarias de ácido nucleico de COX-2 canina pueden codificar una porción(es) significativa(s) de, o ciertamente la mayoría de, la proteína de COX-2 canina. Preferiblemente, una molécula fragmentaria de ácido nucleico de COX-2 canina es idéntica complementaria con por lo menos 20 nucleótidos contiguos en ID. SEC.: 3. Más preferiblemente, ella comprende por lo menos 25 nucleótidos en ID. SEC.: 3. Aún más preferiblemente, ella comprende por lo menos 50

26

nucleótidos en ID. SEC.: 3. Todavía más preferiblemente, ella comprende por lo menos 1005 nucleótidos en ID. SEC.: 3. En una incorporación preferida, una molécula fragmentaria de ácido nucleico de COX-2 canina comprende por lo menos un nucleótido que no se encuentra en una posición correspondiente en la COX-2 canina.

Las moléculas de ácido nucleico de COX-2 canina y las moléculas fragmentarias de ácido nucleico de COX-2 canina pueden hibridizarse en forma específica o selectiva con otras moléculas de ácido nucleico. Tal como se emplea aquí, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridizarse específicamente entre sí cuando tienen un nivel muy alto de afinidad mutua, tal como cuando una hebra de ácido nucleico tiene un alto grado de homología con una hebra complementaria. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si ambas presentan complementariedad total. Tal como se emplea aquí, las moléculas deben exhibir "complementariedad total" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "complementarias en mínima medida" si pueden hibridizarse entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer fusionadas unas con otras bajo por lo menos condiciones convencionales de "baja astringencia". Análogamente, las moléculas deben ser "complementarias". Condiciones convencionales de astringencia se describen por Sambrook, y colegas, *Molecular Cloning, Un Manual de Laboratorio*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Condiciones convencionales de astringencia se describen además por Haymes, y colegas, *Nucleic Acid Hybridization, A*

27

Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). En consecuencia son permitidas desviaciones de la complementariedad total, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura de doble cadena.

En otra incorporación preferida, la molécula fragmentaria de COX-2 canina exhibe actividad enzimática de COX-2 canina.

En una incorporación la presente invención provee una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada seleccionada del grupo de ADN's conformado por una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, el complemento de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, un fragmento interno de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, y un fragmento interno del complemento de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, en donde ID. SEC.: 1 codifica una proteína de COX-1 canina o un fragmento de la misma. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica una proteína de COX-1 canina. También preferiblemente, la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada tiene una ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma. En otra incorporación de la presente invención, la cual se hibridiza con otra la molécula de ácido nucleico que codifica la COX-1 canina o un complemento de la misma y falla en hibridizarse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una COX-1 no-canina o un complemento de la misma. En todavía otra incorporación, la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la molécula de ácido nucleico se hibridiza específicamente con

otra molécula de ácido nucleico que codifica COX-1 canina o un complemento de la misma bajo condiciones de alta astringencia y falla en hibridizarse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica COX-1 no-canina o el complemento de la misma bajo condiciones de alta astringencia. En una incorporación preferida, el fragmento interno de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1 contiene por lo menos 50 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente, por lo menos 100 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente aún, por lo menos 200 residuos de ácido nucleico y, todavía más preferiblemente, por lo menos 500 residuos de ácido nucleico. En otra incorporación preferida, el fragmento interno del complemento de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1 contiene por lo menos 50 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente, por lo menos 100 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente aún, por lo menos 200 residuos de ácido nucleico y, todavía más preferiblemente, por lo menos 500 residuos de ácido nucleico.

En otra incorporación, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de COX-1 canina sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 20 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 1 ó el complemento de ID. SEC.: 1. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 50 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 100 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma.

5829

La presente invención provee además una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada seleccionada del grupo de ADN conformado por una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, una molécula complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, un fragmento interno de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, y un fragmento interno de una molécula complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, en donde ID. SEC.: 3 codifica una proteína de COX-2 canina o un fragmento de la misma. Preferiblemente la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica la proteína de COX-2 canina. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada tiene la secuencia descrita por ID. SEC.: 3 ó un complemento de la misma. En otra incorporación la presente invención suministra una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que se hibridiza específicamente con otra molécula de ácido nucleico que codifica la COX-2 ó un complemento de la misma y falla en hibridizarse específicamente con una molécula de ácido nucleico que codifica la COX-2 no-canina o un complemento de la misma. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada se hibridiza específicamente con otra molécula de ácido nucleico que codifica la COX-2 canina o un complemento de la misma bajo condiciones de alta astringencia y falla en hibridizarse específicamente con la molécula de ácido nucleico que codifica la COX-2 no-canina o un complemento de la misma bajo altas condiciones de astringencia. En una incorporación preferida, el fragmento interno de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3 contiene por lo menos 50 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente, por lo menos 100 residuos

9x30

de ácido nucleico, más preferiblemente aún, por lo menos 200 residuos de ácido nucleico y, todavía más preferiblemente, por lo menos 500 residuos de ácido nucleico. En otra incorporación preferida, el fragmento interno del complemento de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3 contiene por lo menos 50 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente, por lo menos 100 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente aún, por lo menos 200 residuos de ácido nucleico y, todavía más preferiblemente, por lo menos 500 residuos de ácido nucleico.

La presente invención provee asimismo una molécula de ácido nucleico de COX-2 no-canina sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 20 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó un complemento de la misma. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 50 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó a un complemento de la misma. Más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 100 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó su complemento. En términos generales condiciones de astringencia que promueven la hibridación del ADN son, por ejemplo, 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguidas por un lavado de 2.0 x SSC a 50°C, son conocidas por aquellas personas con habilidades en el arte o pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de la sal en el paso de lavado puede seleccionarse desde una astringencia baja de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C hasta astringencia alta de

2231

aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en el paso de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja astringencia a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65°C. Pueden variarse tanto la temperatura como la sal, o la temperatura o la concentración de la sal pueden mantenerse constantes mientras se modifica la otra variable.

En una incorporación preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridizará específicamente con una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3 ó su complemento bajo condiciones moderadamente astringentes, por ejemplo, a aproximadamente 2.0 x SSC y aproximadamente 40°C.

En una incorporación particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridizará específicamente con ID. SEC.: 3 ó su complemento bajo condiciones de alta astringencia. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comprenderá ID. SEC.: 3 ó su complemento.

Moléculas fragmentarias de ácido nucleico pueden determinarse y seleccionarse de tal manera que bajo condiciones especificadas, como alta astringencia, las moléculas fragmentarias de ácido nucleico puedan usarse para hibridizarse específicamente a la COX-2 canina en relación, por ejemplo, con la COX-1 canina.

En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y el 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico estipulada en ID. SEC.: 3 ó su complemento. En un aspecto preferido de la presente

2732

invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico estipulada en ID. SEC.: 3 ó su complemento. En un aspecto más preferido de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y el 98% de identidad de secuencia con ID. SEC.: 3 ó su complemento. En el aspecto más preferido de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y el 99% de la identidad de secuencia con ID. SEC.: 3 ó su complemento.

La degeneración del código genético, que permite diferentes secuencias de ácido nucleico para codificar para la misma proteína o péptido, es conocida en la literatura (Patente de los Estados Unidos N . 4,757,006). Tal como se emplea aquí, una molécula de ácido nucleico es un degenerado de otra molécula de ácido nucleico cuando las moléculas de ácido nucleico codifican para las mismas secuencias de aminoácidos, pero comprenden diferentes secuencias de nucleótidos. Un aspecto de la presente invención es que las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico que son un degenerado de ID. SEC.: 3 y su complemento.

Aparte de sus usos tales como los descritos más adelante, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden emplearse para obtener otras moléculas de COX-2 canina. Moléculas de ácido nucleico y fragmentos de las mismas de la presente invención pueden emplearse para obtener otras moléculas de ácido nucleico de perros. Dichas

33
2/4

moléculas de ácido nucleico incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia codificadora completa de una proteína y promotores y secuencias flanqueantes de dichas moléculas. Adicionalmente, dichas moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican para otras isozimas o miembros de familia de genes. Dichas moléculas pueden obtenerse fácilmente empleando las moléculas de ácido nucleico descritas arriba, o fragmentos de las mismas, para tamizar ADNc o bibliotecas genómicas obtenidas de la especie. Son bien conocidos en el arte los métodos para formar dichas bibliotecas.

Las moléculas de ácido nucleico y fragmentos de las mismas de la presente invención pueden emplearse igualmente para obtener homólogos de ácido nucleico. Dichos homólogos incluyen la molécula de ácido nucleico de otros organismos (*verbigrata*, mono, vaca, gato) incluyendo las moléculas de ácido nucleico que codifican, en todo o en parte, homólogos de proteína de especies vegetales u otros organismos, secuencias de elementos genéticos tales como promotores y elementos transcripcionales reguladores. Los métodos para formar dichas bibliotecas son bien conocidos en el arte. Dichas moléculas de homólogo pueden diferir en sus secuencias de nucleótidos de aquellas encontradas en ID. SEC.: 3 ó complemento de la misma. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen asimismo moléculas que, aunque capaces de hibridarse específicamente con las moléculas de ácido nucleico las moléculas de ácido nucleico pueden carecer de "complementariedad total".

En una incorporación, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen moléculas que codifican la proteína de la proteína COX-1, su promotor, o secuencias flanqueantes de gen. En una incorporación preferida, un ácido nucleico canino de la presente invención se hibridizará específicamente a una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1 ó sus complementos. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico canino de la presente invención comprenderá ID. SEC.: 1 ó su complemento.

Moléculas fragmentarias de ácido nucleico de COX-1 canina pueden codificar una porción(es) significativa(s) de, o ciertamente la mayoría de, la proteína COX-1 canina. Preferiblemente, una molécula fragmentaria de ácido nucleico de COX-1 canina es idéntica o complementaria con por lo menos 20 nucleótidos continuos en ID. SEC.: 1. Más preferiblemente, comprende por lo menos 25 nucleótidos en ID. SEC.: 1. Aún mas preferiblemente, comprende por lo menos 50 nucleótidos en ID. SEC.: 1. Muy preferiblemente, comprende por lo menos 100 nucleótidos en ID. SEC.: 1. En una incorporación preferida, una molécula fragmentaria de ácido nucleico de COX-1 canina comprende por lo menos un nucleótido que no se encuentra en una posición correspondiente en la COX-1 canina. En otra incorporación preferida, la molécula fragmentaria de COX-1 canina presenta actividad enzimática de COX-1 canina.

En otra incorporación de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre

35
X
7

el 100% y el 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de COX-1 canina estipulada en ID. SEC.: 1 ó su complemento. En un aspecto adicional de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y 95% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de COX-1 canina estipulada en ID. SEC.: 1 ó su complemento. En un aspecto más preferido de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y el 98% de identidad de secuencia con ID. SEC.: 1 ó su complemento. En el aspecto más preferido de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 100% y el 99% de la identidad de secuencia con ID. SEC.: 1 ó su complemento.

La presente invención provee también una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma codificado por una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a ID. SEC.: 4 ó su complemento.

La presente invención aporta igualmente una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 2.

La presente invención proporciona asimismo una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o fragmento de la misma que comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 4.

Del mismo modo, la presente invención suministra un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a la proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o fragmento de la misma que comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 4.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse para encontrar cualquier homólogo de ácido nucleico de COX-2 canina. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden emplearse además para obtener cualquier homólogo de COX-2 de mamífero.

Cualquiera de una variedad de métodos puede utilizarse para obtener una o más de las moléculas de ácido nucleico ya descritas. Las siguientes referencias individuales (cada una de las cuales se incorpora aquí de manera individual por referencia) describen cada una un método útil de obtener moléculas de ácido nucleico.

Zamechik y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83: 4143-4146 (1986).

Goodchild y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5507-5511 (1988).

Wickstrom y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 1028-1032 (1988).

Holt y colegas, Molec. Cell. Biol. 8: 963-973 (1988).

Gerwitz y colegas, Science 242: 1303-1306 (1988).

Anfossi y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 3379-3383 (1989).

Becker y colegas, EMBO J. 8: 3685-3691 (1989).

Pueden emplearse sintetizadores automatizados de ácido nucleico para este fin. En vez de dicha síntesis, las moléculas reveladas de ácido

2837

nucleico pueden utilizarse para definir una pareja de cebadores que puedan usarse con la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar y obtener cualquier molécula de ácido nucleico deseada o fragmento. Cada una de las siguientes referencias (cada una de las cuales se incorpora aquí de manera individual por referencia) describen individualmente métodos útiles para definir cebadores que pueden utilizarse con la reacción en cadena de la polimerasa.

Mullis y colegas, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273 (1986).

Erich y colegas, Patente Europea 50,424.

Patente Europea 84,796.

Patente Europea 258,017.

Patente Europea 237,362.

Mullis, Patente Europea 201,184.

Mullis y colegas, Patente de los Estados Unidos 4,683,202.

Erich, Patente de los Estados Unidos 4,582,788.

Saiki, R. y colegas, Patente de los Estados Unidos 4,683,194.

La(s) secuencia(s) de promotor de COX-2 canina y las secuencias flanqueantes de COX-2 canina pueden obtenerse también utilizando ID. SEC.: 3 provista aquí. En una incorporación, dichas secuencias se obtienen incubando sondas de oligonucleótido de oligonucleótidos de COX-2 canina con miembros de bibliotecas genómicas caninas y recuperando clones que se hibridizan a las sondas. En una segunda incorporación pueden utilizarse

2938

métodos de “desplazamiento cromosómico” ó 3’ ó 5’ RACE para obtener dichas secuencias. Cada una de las siguientes referencias contiene descripciones útiles de “desplazamiento cromosómico” ó 3’ ó 5’ RACE.

Frohman, M.A. y colegas, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 8998-9002 (1988)

Ohara, O. y colegas, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 5673-5677 (1989)

B. Proteínas y Péptidos

Una segunda clase de agentes preferidos comprende las proteínas de COX-1 canina y COX-2 canina, y sus fragmentos de péptido, proteínas de fusión, y análogos. Las proteínas de COX-1 y COX-2 canina pueden producirse por medio de síntesis química o, más preferiblemente, expresando el ADNc codificador de COX-1 canina o la COX-2 en un anfitrión bacterial o eucariótico adecuado. Muy preferiblemente, la subsecuencia de dicho ADNc que codifica la COX-1 canina o COX-2 puede utilizarse para este propósito (ID. SEC.: 1 ó 3). Métodos apropiados de expresión se describen por Sambrook, J., y colegas (*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2^a edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989)), o textos similares.

Un “fragmento de COX-2 canina” es un péptido o polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende un subconjunto de la secuencia de aminoácidos de la proteína de COX-2 canina. Preferiblemente, una molécula de fragmento de COX-2 canina es idéntica o complementaria con por lo menos una región que corresponde a una secuencia contigua de 10

39
48

aminoácidos de ID. SEC.: 4. Más preferiblemente, el fragmento de COX-2 canina es idéntico o complementario con por lo menos una región que corresponde a 50 aminoácidos contiguos de ID. SEC.: 4. Aún más preferiblemente, el fragmento de COX-2 canina es idéntico o complementario con por lo menos una región que corresponde a 100 aminoácidos contiguos de ID. SEC.: 4. Una proteína de COX-2 canina o fragmento de la misma que comprende una o más regiones de péptido de COX-2 adicional no-canina es una proteína de "fusión de COX-2 canina". Dichas moléculas pueden derivarse para contener carbohidrato u otras mitades (por ejemplo, hemocianina de lapa). Como en el caso de la proteína de COX-2 canina, los fragmentos y fusiones de la presente invención se producen preferiblemente vía medios recombinantes.

Los análogos de las moléculas de proteína de COX-2 canina comprenden proteínas de COX-2 canina, fragmentos o fusiones en los cuales se han añadido, reemplazado o eliminado residuos de aminoácidos no esenciales ni relevantes. En otras palabras, en análogos de proteína de COX-2 canina, no se han agregado, reemplazado o eliminado aminoácidos que pudieran afectar la actividad de la proteína del análogo relacionada con la COX-2 canina original. Un ejemplo de dicho análogo es la proteína de COX-2 de una especie no-canina, como un primate, una vaca, un gato, y similares. Dichos análogos pueden obtenerse fácilmente mediante cualquiera de una variedad de métodos. Muy preferiblemente, como ya se indicó, ID. SEC.: 3 se utilizará para definir una pareja de cebadores que pueden usarse para aislar las moléculas de ácido nucleico que codifican la COX-2 a partir de cualquier especie deseada. Dichas moléculas pueden

4/10

expresarse para producir análogos de COX-2 canina por medios recombinantes.

De acuerdo con ello, en una incorporación la presente invención provee una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma, en donde la proteína de COX-2 canina o su complemento es codificada por una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a ID. SEC.: 1 ó un complemento de ID. SEC.: 1.

En otra incorporación, la presente invención proporciona una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 2.

En todavía otra incorporación, la presente invención aporta una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma que comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 2. Preferiblemente, la proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma es una proteína de fusión.

La presente invención proporciona además una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma codificada por una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a ID. SEC.: 4 ó su complemento. Preferiblemente, la proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o fragmento se hibridiza específicamente a ID. SEC.: 4. Alternativamente, la proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o fragmento de la misma puede hibridizarse específicamente al complemento de ID. SEC.: 4.

La presente invención aporta asimismo una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 4. La presente invención proporciona igualmente una proteína de COX-2 canina

42/1

sustancialmente purificada fragmento de la misma, en donde la proteína o el fragmento de la misma comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 4. En una incorporación la proteína de COX-2 canina o fragmento de la misma es una proteína de fusión.

C. Anticuerpos Reactivos contra la COX-1 canina o la COX-2 canina

Un aspecto de la presente invención concierne a anticuerpos, moléculas que ligan antígeno de cadena única, u otras proteínas que se ligan específicamente a la proteína de COX-2 canina y sus análogos, fusiones o fragmentos. Dichos anticuerpos son "anticuerpos de COX-2 anti-canina" y pueden utilizarse, por ejemplo, para medir la proteína de COX-1 canina o COX-2 canina. Tal como se emplea aquí, se dice que un anticuerpo o péptido "se liga específicamente" a COX-1 canina o COX-2 canina si dicho ligamiento no se inhibe competitivamente por la presencia de moléculas de COX-2 no-canina.

Moléculas de ácido nucleico que codifican para la totalidad o una parte de la proteína de COX-2 canina pueden expresarse, por medios recombinantes, para producir proteína de COX-2 canina o péptidos que pueden a su vez ser usados para estimular la aparición de anticuerpos que son capaces de ligar COX-2 canina. Dichos anticuerpos pueden emplearse en pruebas de diagnóstico inmune. Dichas moléculas codificadoras de COX-2 canina, o sus fragmentos pueden ser una molécula de "fusión" (es decir, una parte de una molécula de ácido nucleico más grande) tal que, en la expresión, se produzca una proteína de fusión.

42
✓

Los anticuerpos que ligan específicamente las proteínas de COX-2 canina y fragmentos de proteína pueden ser policlonales o monoclonales, y pueden incluir inmunoglobulinas intactas, de porciones que ligan antígeno de inmunoglobulinas (tales como fragmentos $(F(ab'))$, $F(ab')_2$), o inmunoglobulinas de cadena única producibles, por ejemplo, vía medios recombinantes. Se entiende que los practicantes están familiarizados con los materiales de recursos estándar que describen condiciones y procedimientos específicos para la construcción, manipulación y aislamiento de anticuerpos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *in Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988)).

Anticuerpos monoclonales murinos son particularmente preferidos. Ratones BALB/c son preferidos para este fin; sin embargo, también pueden emplearse cepas equivalentes. Los animales se inmunizan preferentemente con alrededor de 25 μ g de proteína de COX-2 canina purificada (o fragmento de la misma) que se ha emulsificado con un adyuvante apropiado (tal como el adyuvante TiterMax (Vaxcel, Norcross, GA)). Preferiblemente, la inmunización se lleva a cabo en dos sitios intramusculares, un sitio intraperitoneal y un sitio subcutáneo en la base de la cola. Preferiblemente se administra una inyección adicional de alrededor de 25 μ g de antígeno, tres semanas después, en solución salina normal. Luego de aproximadamente 11 días después de la segunda inyección los ratones pueden sangrarse y la sangre tamizada para detectar la presencia anticuerpos de COX-2 canina. Preferiblemente, para este fin se emplea un ELISA de ligamiento directo.

Muy preferiblemente, al ratón que tiene la titulación más alta de anticuerpos se le aplica una tercera inyección de alrededor de 25 µg de proteína de COX-2 canina, fragmento, o fusión. Los leucocitos esplénicos de este animal pueden recuperarse tres días después, y se les permite entonces fusionarse, muy preferiblemente, utilizando polietilenglicol, con células de una línea adecuada de célula de mieloma (tal como, por ejemplo, la línea de célula de mieloma P3X63Ag8.653). Se seleccionan células de hibridoma cultivando las células bajo selección HAT (hipoxantina-aminopterina-timina) durante cerca de una semana). Los clones resultantes pueden entonces tamizarse en cuanto a su capacidad de producir anticuerpos monoclonales ("mAbs") a la proteína COX-2 canina, preferiblemente por medio de un ELISA directo.

En una incorporación, anticuerpos monoclonales de COX-2 anti-canina se aíslan utilizando fusiones de COX-2 canina, o conjugados, como inmunógenos. De ese modo, por ejemplo, un grupo de ratones puede inmunizarse empleando una proteína de fusión de COX-2 canina emulsionada en adyuvante completo de Freund (aproximadamente 50 µg de antígeno por inmunización). En intervalos de tres semanas, se emulsiona una cantidad idéntica de antígeno en adyuvante incompleto de Freund y se emplea para inmunizar los animales. Diez días después de la tercera inmunización, se toman muestras de suero y se evalúan en cuanto a la presencia de anticuerpo. Si las titulaciones de anticuerpo son demasiado bajas, puede emplearse un cuarto reforzador. Polisueros capaces de ligar COX-2 canina en dilución de 1:5.000 pueden obtenerse también utilizando este método.

44/5
X

En un procedimiento preferido para obtener anticuerpos monoclonales, los vasos de los ratones inmunizados ya mencionados se retiran, se rompen, y se aíslan esplenocitos inmunes sobre un gradiente de ficol. Los esplenocitos aislados se fusionan, empleando polietilenglicol con células de plasmacitoma P3x63xAg8.653 deficiente HGPRT (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa) derivada de BALB/c. Las células fusionadas se ponen en placas de microtitulación de 96 alvéolos y se seleccionan en cuanto a células de fusión de hibridoma por su capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina durante aproximadamente 2-3 semanas. En promedio, cada 10^6 células del bazo sometidas a fusión producen un hibridoma variable. Un bazo típico produce $5-10 \times 10^7$ células de bazo.

Las células de hibridoma que surgen de dicha incubación se seleccionan preferiblemente en cuanto a su capacidad de producir una inmunoglobulina que se ligue a la COX-2 canina. Puede emplearse un ELISA indirecto para este fin. En resumen, los sobrenadantes de hibridoma se incuban en alvéolos de microtitulación que contienen proteína de COX-2 canina inmovilizada.

Luego de lavar, la titulación de la inmunoglobulina ligada puede determinarse utilizando, por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón cabra conjugado con peroxidasa de rábano. Después de un lavado adicional, se determina la cantidad de enzima inmovilizada (por ejemplo, mediante el uso de un sustrato cromogénico). Dicho tamizado se lleva a cabo tan rápido como sea posible luego de la identificación del hibridoma con el fin de garantizar que el clon deseado no se cultive en exceso por vecinos no-

45
40

secretores. Preferiblemente, las placas de fusión se tamizan varias veces puesto que las tasas de crecimiento de hibridoma varían. En una incorporación preferida, una forma antigénica diferente de COX-2 canina puede emplearse para seleccionar el hibridoma. De ese modo, por ejemplo, los esplenocitos pueden inmunizarse con un inmunógeno de COX-2 canina, pero los hibridomas resultantes pueden seleccionarse empleando un inmunógeno diferente de COX-2 canina.

Como se discute más adelante, dichas moléculas de anticuerpo o sus fragmentos pueden utilizarse para fines de diagnóstico. Donde los anticuerpos están previstos para fines de diagnóstico, puede ser deseable derivarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (tal como biotina) o un grupo marcador detectable (tal como un grupo fluorescente, un radioisótopo o una enzima).

La capacidad de producir anticuerpos que ligan las moléculas de COX-2 canina permite la identificación de compuestos miméticos de COX-2 canina. Un "compuesto mimético" de COX-2 canina es un compuesto que no es COX-2 canina, o un fragmento de COX-2 canina, pero que sin embargo exhibe una capacidad de ligarse específicamente a anticuerpos de COX-2 anti-canina. Dichas moléculas pueden usarse para estimular la aparición de anticuerpos de COX-2 anti-canina y, de este modo, pueden utilizarse para ayudar en el diagnóstico de desórdenes relacionados con COX-2 canina.

De acuerdo con ello, en una incorporación la presente invención aporta un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a una proteína de

46
21

COX-1 canina que tiene ID. SEC.: 2; preferiblemente el anticuerpo está marcado en forma detectable.

En otra incorporación, la presente invención provee un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a la proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 4. Preferiblemente el anticuerpo está marcado en forma detectable.

III. Usos de la Molécula de la Invención

En otra incorporación la presente invención provee vectores de ADN de plásmido para uso en la expresión de las proteínas de COX-1 canina o COX-2 canina. Estos vectores contienen las secuencias de ADN ya descritas que codifican para los polipéptidos de la invención. Vectores apropiados que pueden transformar células eucarióticas, incluyendo células de mamífero y microorganismos capaces de expresar las proteínas de COX-1 o COX-2 caninas, incluyen vectores de expresión que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas de COX-1 canina o COX-2 unidas a secuencias reguladoras de traducción y transcripción que se seleccionan de acuerdo con las células anfitrionas usadas.

Vectores que incorporan secuencias modificadas según descripción anterior están incluidos en la presente invención y son útiles en la producción de los polipéptidos de COX-1 ó COX-2 caninas. El vector empleado en el método contienen además secuencias reguladoras seleccionadas en asociación operativa con las secuencias codificadoras de

47

ADN de la invención, las cuales son capaces de dirigir la replicación y expresión de las mismas en células anfitrionas seleccionadas.

La transferencia de un ácido nucleico que codifica para una proteína puede resultar en la expresión o sobre-expresión de esa proteína en una célula transformada. Una o más de las proteínas o fragmentos de los mismos codificadas por las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden expresarse o sobre-expresarse en una célula transformada. Particularmente, cualquiera de las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de las mismas pueden expresarse o sobre-expresarse en una célula transformada. Dicha expresión o sobre-expresión puede ser el resultado de una transferencia transitoria o estable del material genético exógeno. “Material genético exógeno” es cualquier material genético, sea de ocurrencia natural o de otra clase, de cualquier fuente, capaz de ser insertado en un organismo.

Un constructo o vector puede incluir un promotor para expresar la proteína o fragmento de proteína de elección. Preferiblemente, el promotor de la presente invención es un promotor específico de COX. Promotores que pueden emplearse en la presente invención incluyen:

promotor glucosa-6 fosfatasa	Yoshiuchi y colegas, <i>J. Clin. Endocrin. Metab.</i> 83: 1016-1019 (1998)
promotor de interleucina-1 alfa	Mori y Prager, <i>Leuk. Lymphoma</i> 26: 421-433 (1997)

48

promotor CMV	Tong y colegas, <i>Anticancer Res.</i> 18: 719-725 (1998); Norman y colegas, <i>Vaccine</i> 15: 801-803 (1997)
promotor RSV	Elshami y colegas, <i>Cancer Gene Ther.</i> 4: 213-221 (1997); Baldwin y colegas, <i>Gene Ther.</i> 4: 1142-1149 (1997)
promotor SV40	Harms y Splitter, <i>Hum. Gene Ther.</i> 6: 1291-1297 (1995)
promotor del gen de integrina CD11c	Corbi y López-Rodríguez, <i>Leuk. Lymphoma</i> 25: 415-425 (1997)
promotor GM-CSF	Shannon y colegas, <i>Crit. Rev. Immunol.</i> 17: 301-323 (1997)
promotor de interleucina-5R alfa	Sun y colegas, <i>Curr. Top. Microbiol. Immunol.</i> 211: 173-187 (1996)
promotor de interleucina-2	Serfing y colegas, <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1263: 181-200 (1995) O'Neill y colegas, <i>Transplant. Proc.</i> 23: 2862-2866 (1991)
promotor de c-fos	Janknecht, <i>Immunobiology</i> 193: 137-142 (1995) Janknecht y colegas, <i>Carcinogenesis</i> 16: 443-450 (1995) Takai y colegas, <i>Princess Takamatsu Symp.</i> 22: 197-204 (1991)

12849

promotor h-ras	Rachal y colegas, <i>EXS</i> 64: 330-342 (1993)
promotor del gen DMD	Ray y colegas, <i>Adv. Exp. Med. Biol.</i> 280: 107-111 (1990)

Promotores apropiados para expresión de las proteínas COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos de la presente invención en bacterias han sido descritos por Hawley y McClure, *Nucleic Acids Res.* 11: 2237-2255 (1983), Harley y Reynolds, *Nucleic Acids Res.* 15: 2343-2361 (1987) han descrito también propomotores adecuados para expresión de las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos de la presente invención en bacterias. Dichos promotores incluyen, por ejemplo:

el promotor <i>recA</i>	Fernández de Henestrosa, y colegas, <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 147: 209-213 (1997) Nussbaumer y colegas, <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 118: 57-63 (1994) Weisemann y colegas, <i>Biochimie</i> 73: 457-470 (1991)
el promotor <i>Ptac</i>	Hasan y colegas, <i>Gene</i> 56: 141-151 (1987); Marsh, <i>Nucleic Acids Res.</i> 14: 3603 (1986)

150

promotor híbrido P _{tac} - <i>recA</i>	
--	--

Se prefiere que el promotor particular seleccionado es capaz de causar suficiente expresión para resultar en la producción de una cantidad efectiva de las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos para originar el fenotipo deseado.

Constructos o vectores pueden incluir también con la región codificadora de interés una secuencia de ácido nucleico que actúe, en todo o en parte, para terminar la transcripción de dicha región.

Asimismo se pueden incorporar intensificadores de traducción como parte del ADN vector. Constructos de ADN podrían contener una o más secuencias líder 5' no trasladadas que pueden servir para intensificar la expresión de los productos del gen de los transcritos de ARNm resultantes. Dichas secuencias pueden derivarse del promotor seleccionado para expresar el gen o pueden modificarse específicamente para aumentar la traducción del ARNm. Dichas regiones pueden obtenerse además a partir de ARNs virales, de genes eucarióticos adecuados, o se una secuencia genética sintética.

Un vector o constructo puede incluir igualmente un marcador tamizable. Pueden emplearse marcadores tamizables para monitorear la expresión. Marcadores tamizables ejemplares incluyen:

1251

β-glucuronidasa codificada por el gen <i>uidA</i> (GUS)	Jefferson, <i>Plant Mol. Bio. Rep.</i> 5: 387-405 (1987) Jefferson y colegas, <i>EMBO J.</i> 6: 3901-3907 (1987)
β-lactamasa	Sutcliffe, y colegas, <i>Proc. Natl.</i> <i>Acad. Sci. (U.S.A.)</i> 75: 3737-3741 (1978)
luciferasa	Clontech, Palo Alto, CA, USA Ow y colegas, <i>Science</i> 234: 656-859 (1986)
β-galactosidasa	Clontech, Palo Alto, CA, USA
GST	(Stratagene)
Proteína A	Calbiochem
Proteína fluorescente azul	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Proteína verde fluorescente	Clontech, Palo Alto, CA, USA

Incluidos dentro de los términos “genes marcadores seleccionables determinables” se encuentran también genes que codifican un marcador secretable cuya secreción puede detectarse como un medio de identificar o seleccionar las células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores

752

que codifican un antígeno secretable que puede ser identificado por interacción de anticuerpos, o incluso enzimas secretables que pueden detectarse por reacciones catalíticas. Las proteínas secretables caen dentro de un número de clases, incluyendo proteínas pequeñas, difusibles, que son detectables (*verbigracia*, por ELISA), enzimas activas pequeñas que son detectables en solución extracelular (*verbigracia*, α -amilasa, β -lactamasa, fosfotricina transferasa), o proteínas que se insertan o atrapan en la membrana de la célula (tales como las proteínas que incluyen una secuencia líder). Otros posibles genes marcadores seleccionables y/o tamizables son evidentes a aquellas personas con habilidades en el arte.

Como otro aspecto de la presente invención, se provee un método para producir las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas. Células apropiadas o líneas de células pueden ser células de mamífero, insecto o de levadura. Por ejemplo las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de ellas de la presente invención se expresan en una célula de levadura, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*. Las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos de la presente invención pueden expresarse en *S. Cerevisiae* fusionándola al término N de los genes URA3, CYC1 ó ARG3 (Guarente y Ptashne, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78: 2199-2203 (1981); Rose y colegas, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78: 2469-2464 (1981); y Crabeel y colegas, *EMBO J.* 2: 205-212 (1983)). Alternativamente las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos de la presente invención pueden fusionarse a genes PGK TRP1 (Tuite y colegas, *EMBO J.* 1: 603-608 (1982); y Dobson y colegas, *Nucleic Acids*

53
1/2

Res. 11: 2287-2302 (1983)). Más preferiblemente, las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos de la presente invención se expresan como una proteína madura (Hitzeman, y colegas, *Nature 293: 717-722 (1981)*; Valenzuela y colegas, *Nature 298: 347-350 (1982)*; y Derynck y colegas, *Nucleic Acids Res. 11: 1819-1837 (1983)*).

Promotores de levadura nativos y fabricados apropiados para uso en la presente invención han sido estudiados por Romanos y colegas, *Yeast 8: 423-488 (1992)*. Muy preferiblemente, las proteínas de COX-1 ó COX-2 caninas o fragmentos de cualquiera de las dos de la presente invención son secretadas por la célula de levadura (Blobel y Dobberstein, *J. Cell Biol. 67: 835-851 (1975)*; Kurjan y Herskowitz, *Cell 30: 933-943 (1982)*; Bostian y colegas, *Cell 36: 741-751 (1984)*; Rothman y Orci, *Nature 355: 409-415 (1992)*; Julius y colegas, *Cell 32: 839-852 (1983)*; y Julius y colegas, *Cell 36: 309-318 (1984)*).

Donde se desee, se pueden utilizar células de insecto como células anfitrionas en el método de la presente invención. Véase, verbigracia, V. A. Luckow, *Protein Eng. J. L. Cleland, Wiley-Liss, Nueva York, NY: 183-2180 (1996)* y referencias citadas allí. Adicionalmente, métodos para la expresión de genes exógenos en células de insecto utilizando vectores de baculovirus se describen en: O'Reilly y colegas, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Nueva York, W. H. Freeman & Company (1992), y King y Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Londres, Chapman & Hall. Se construye un vector de expresión que comprende un vector de transferencia baculovirus, en el cual un fuerte promotor de baculovirus (tal como el promotor de polihedrina) conduce la

✓ Sg

transcripción de una región codificadora de péptido de señal de secreción eucariótica, la cual se une por traslación a la región codificadora para la proteína multi-funcional. Por ejemplo, puede usarse el plásmido PVL1393 (Invitrogen Corp., San Diego, California, U.S.A.). Luego de la construcción del vector transportador del gen que codifica la proteína multi-funcional, dos microgramos de este ADN se co-transfectan con un microgramo de ADN baculovirus en las células del insecto *Spodoptera frugiperla*, cepa Sf9. Alternativamente, baculovirus de recombinante pueden tratarse usando un sistema baculovirus de vector de lanzadera (Luckow y colegas, *J. Virol.* 67: 4566-4579 (1993)), comercializado actualmente como el Sistema de Expresión Bac-To-Bac™ (Life Technologies, Inc. Rockville, MD). Baculovirus de recombinante puro que porta la proteína multi-funcional se utiliza para infectar células cultivadas, por ejemplo, en medio libre de suero Excell 401 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) o Sf9900-II (Life Technologies, Inc.). La proteína multi-funcional secretada en el medio puede recuperarse por procedimientos bioquímicos estándar. Sobrenadantes de células de mamífero o insecto que expresen las proteínas multi-funcionales pueden concentrarse primero empleando cualquiera de un número de unidades de concentración comerciales.

Muy preferiblemente, las células de mamíferos pueden utilizarse para expresar las moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se clonan en una vector retroviral apropiado (véase, *verbigracia*, Dunbar y colegas, *Blood* 85: 3048-3057 (1995); Baum y colegas, *J. Hematother.* 5: 323-329 (1996); Bregni y colegas, *Blood* 80: 1418-1422 (1992); Boris-

SS
12

Lawrie y Temin, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 102-109 (1993); Boris-Lawrie y Temin, *Annal. New York Acad. Sci.* 716: 59-71 (1994); Miller, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 1-24 (1992)), vector de adenovirus (Berkner, *BioTechniques* 6: 616-629 (1988); Berkner, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 39-66 (1992); Brody y Cristal, *Annal. New York Acad. Sci.* 716: 90-103 (1994); Baldwin y colegas, *Gene Ther.* 4: 1142-1149 (1997)), RSV, MuSV, SSV, MuLV (Baum y colegas, *J. Hematother.* 5: 323-329 (1996)), AVV (Chen y colegas, *Gene Ther.* 5: 50-58 (1998); Halek y colegas, *Cytokines Mol. Ther.* 2: 69-79 (1996)), AEV, AMV, o CMV (Griffiths y colegas, *Biochem. J.* 241: 313-324 (1987)).

Métodos generales y composiciones para transformar una célula eucariótica, bacterias y otros microorganismos son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Sambrook y colegas, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)).

La tecnología para la introducción de ADN en células es bien conocida por aquellas personas con habilidades en el arte. Se han descrito cuatro métodos generales para llevar un gen dentro de células: (1) métodos químicos (Graham y van der Eb, *Virology* 54: 536-539 (1973)); (2) métodos físicos tales como microinyección (Capecchi, *Cell* 22: 479-488 (1980)), (3) electroporación (Wong y Neumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 584-578 (1982); Fromm y colegas, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82: 5824-5828 (1985); Patente de los Estados Unidos No. 5,384,253); y la pistola de genes (Johnston y Tang, *Methods Cell Biol.* 43: 353-365 (1994)); (3) vectores virales (Clapp, *Clin. Perinatol.* 20: 155-168 (1993); Lu y colegas,

1756

J. Exp. Med. 178: 2089-2096 (1993); Eglitis y Anderson, *Biotechniques*, 6: 608-614 (1988)); y (4) mecanimos mediados por receptor (Curiel y colegas, *Hum. Gen. Ther.* 3: 147-154 (1992), Wagner y colegas, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89: 6099-6103 (1992)).

La transformación puede lograrse utilizando métodos basados en precipitación de fosfato de calcio, tratamiento con polietilenglicol, electroporación, y combinaciones de estos tratamientos (véase, por ejemplo, Potrykus y colegas, *Mol. Gen. Genet.* 205: 193-200 (1986); Lorz y colegas, *Mol. Gen. Genet.* 199: 178 (1985); Fromm y colegas, *Nature* 319: 791 (1986); Uchimiya y colegas, *Mol. Gen. Genet.* 204: 204 (1986); Marcotte y colegas, *Nature* 355: 454-457 (1988)).

Pruebas para expresión genética basadas en expresión transitoria de constructos clonados de ácido nucleico han sido desarrolladas introduciendo las moléculas de ácido nucleico en las células mediante tratamiento con polietilenglicol, electroporación, o bombardeo de partículas (Marcotte y colegas, *Nature* 335: 454-457 (1988); McCaty y colegas, *Cell* 66: 895-905 (1991); Hattori y colegas, *Genes Dev.* 6: 609-618 (1992); Goff y colehas, *EMBO J.* 9: 2517-2522 (1990)). Sistemas transitorios de expresión pueden usarse para diseccionar funcionalmente constructos genéticos.

En una incorporación, las moléculas de COX-2 canina de la presente invención se usan para determinar si un individuo tiene o no una mutación que afecte el nivel (es decir, la concentración de ARNm de COX-2 canina o proteína en una muestra, etc.) o patrón (es decir, la cinética de la expresión, velocidad de descomposición, perfil de estabilidad, etc.) de la expresión de COX-2 canina (colectivamente, la "respuesta de COX-2 canina" de una

57

célula o fluido corporal) (por ejemplo, una mutación en el gen de COX-2 canina, o en una región(es) reguladora(s) de otro(s) gen(es) que controla afecta la expresión de COX-2 canina), y siendo predictiva de perros que tendrían predisposición a, por ejemplo, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, y otros desórdenes. Tales desórdenes relacionados con COX-2 incluyen, pero no se limitan a, artritis, artritis reumatoide, espondiloartropatías, artritis gotosa, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico y artritis juvenil, enfermedad autoinmune, rechazo de aloimplante, asma, bronquitis, tendinitis, bursitis, y condiciones relacionadas con la piel tales como psoriasis, eczema, quemaduras, y dermatitis, inflamación pos-operatoria incluyendo desde cirugía oftálmica tal como cirugía de cataratas y cirugía refractiva, condiciones gastrointestinales tales como síndrome inflamatorio del intestino, y colitis ulcerativa, neoplasia, tal como cáncer colorrectal, y cáncer del seno, pulmón, próstata, cerviz, y piel, enfermedades vasculares, dolores de cabeza con migraña, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, esclerodoma, fiebre reumática, diabetes tipo I, enfermedad de unión neuromuscular incluyendo esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behçet, polimiositis, gingivitis, nefritis, hipersensibilidad, conjuntivitis, hinchazón que ocurre después de una lesión, isquemia del miocardio, infarto del miocardio, enfermedades oftálmicas, tales como retinitis, retinopatías, uveítis, fotofobia ocular, y de lesión aguda al tejido ocular, rinitis alérgica, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de choque de endotoxinas, aterosclerosis, inflamación pulmonar tal como la proveniente de infecciones bacteriales y

SS
K

virales y de fibrosis quística, desórdenes del sistema nervioso central, tales como demencias corticales incluyendo el mal de Alzheimer, y daño del sistema nervioso central resultante de ataque, isquemia y trauma.

Tal como se emplea aquí, se dice que la respuesta de COX-2 canina manifestada por una célula o fluido corporal está "alterada" si difiere de la respuesta de COX-2 canina de células o de fluidos corporales de individuos normales. Dicha alteración puede manifestarse por una respuesta de COX-2 canina anormalmente aumentada o anormalmente disminuida. Para determinar si una respuesta de COX-2 canina está alterada, la respuesta de COX-2 canina manifestada por la célula o fluido corporal del canino se compara con la de una muestra de célula similar (o muestra de fluido corporal) de individuos normales. Como se apreciará, no es necesario volver a determinar la respuesta de la COX-2 canina de la muestra de célula (o muestra de líquido corporal) de perros normales cada vez que se hace dicha comparación; más bien, la respuesta de COX-2 canina de un canino particular puede compararse con valores de perros normales obtenidos previamente.

En una sub-incorporación, una análisis similar se lleva a cabo determinando la presencia y/o identidad de polimorfismo(s) en el gen de COX-2 canina o sus regiones flanqueantes, las cuales están asociadas con un desorden.

Cualquiera de una variedad de moléculas pueden utilizarse para identificar dicho polimorfismo(s). En una incorporación, la secuencia de ADNc de COX-2 canina (o una sub-secuencia de la misma) puede emplearse como una molécula de ácido nucleico marcador para identificar

6859

dicho polimorfismo(s). Alternativamente, dichos polimorfismos pueden detectarse mediante el uso de una molécula de ácido nucleico marcador o una proteína marcadora que se liga genéticamente (es decir, un polinucleótido que co-segrega con) dicho polimorfismo(s). En un aspecto preferido de esta incorporación, dichas moléculas de ácido nucleico marcador tendrán la secuencia de nucleótido de un polinucleótido que genéticamente se liga de manera estrecha a dicho polimorfismo(s). Marcadores de polinucleótido que mapean dichas localizaciones son bien conocidos y pueden emplearse para identificar dicho polimorfismo(s).

En una incorporación alternativa, dichos polimorfismos pueden detectarse mediante el uso de una molécula de ácido nucleico marcador que se liga físicamente a dicho polimorfismo(s). Para este fin pueden emplearse moléculas de ácido nucleico marcador que comprenden una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido localizado dentro de 1 mb del polimorfismo(s), y, más preferiblemente, dentro de 100 kb del polimorfismo(s), y, muy preferiblemente, dentro de 10 kb del polimorfismo(s).

Los genomas de animales y plantas sufren en forma natural una mutación espontánea en el curso de su continua evolución (Gusella, *Ann. Rev. Biochem.* 55: 831-854 (1986)).

Un "polimorfismo" en el gen de COX-2 canina o sus regiones flanqueantes es una variación o diferencia en la secuencia del gen de COX-2 canina o sus regiones flanqueantes que surge en alguno de los miembros de una especie. La secuencia variante y la secuencia "original" coexisten

6/60

en la población de la especie. En algunos casos, dicha coexistencia se encuentra en equilibrio estable o quasi estable.

Por eso se dice que un polimorfismo es "alélico" si, debido a la existencia del polimorfismo, algunos miembros de una especie pueden tener la secuencia original (es decir, el "alelo" original), mientras que otros miembros pueden tener la secuencia variante (es decir, el "alelo" variante). En el caso más simple, sólo puede existir una variante, y se dice por ello que el polimorfismo es di-alélico. En otros casos, la población de la especie puede contener múltiples alelos, y el polimorfismo se denomina tri-alélico, etc. un gen único puede tener múltiples polimorfismos diferentes no relacionados. Por ejemplo, puede tener un polimorfismo di-alélico en un sitio, y un polimorfismo multi-alélico en otro sitio.

La variación que define el polimorfismo puede variar desde una simple variación de nucleótidos hasta la inserción o delección de regiones extendidas dentro de un gen. En algunos casos, las variaciones de la secuencia del ADN se encuentran en regiones del genoma que se caracterizan por repeticiones cortas en tándem (STRs) que incluyen motivos repetidos de di- o tri-nucleótidos en tándem. Polimorfismos caracterizados por dichas repeticiones en tándem se denominan polimorfismos de "repetición en tándem de número variable" ("VNTR"). Los VNTRs han sido utilizados en análisis de identidad y paternidad (Weber, Patente de los Estados Unidos 5,075,217); Armour, y colegas, *FEBS Lett.* 307: 113-115 (1992); Jones, y colegas, *Eur. J. Haematol.* 39: 144-147 (1987); Horn, y colegas, Solicitud PTC WO 91/14003; Jeffreys, Solicitud de Patente Europea 370,719; Jeffreys, Patente de los Estados Unidos 5,175,082);

261

Jeffreys, y colegas, *AMER. J. Hum. Genet.* 39: 11-24 (1986); Jeffreys, y colegas, *Nature* 316: 76-79 (1985); Gray, y colegas, *Proc. R. Acad. Soc. Lond.* 243: 241-253 (1991); Moore, y colegas, *Genomics* 10: 654-660 (1991); Jeffreys, y colegas, *Anim. Genet.* 18: 1-15 (1987); Hillel, y colegas, *Anim. Genet.* 20: 145-155 (1989); Hillel, y colegas, *Genet.* 124: 783-789 (1990)).

La detección de sitios polimórficos en una muestra de ADN puede facilitarse mediante el uso de métodos de amplificación de ácido nucleico. Dichos métodos aumentan específicamente la concentración de polinucleótidos que abarcan el sitio polimórfico, o incluyen ese sitio y secuencias localizadas ya sea en forma distal o proximal a él. Dichas moléculas amplificadas pueden detectarse fácilmente mediante electroforesis en gel u otro medio.

El método más preferido de lograr dicha amplificación emplea la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (Mullis, y colegas, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273 (1986); Erlich, y colegas, Solicitud de Patente Europea 50,424, Solicitud de Patente Europea 84,796, Solicitud de Patente Europea 258,017, Solicitud de Patente Europea 237,362; Mullis, Solicitud de Patente Europea 201,184; Mullis, y colegas, Patente de los Estados Unidos No. 4,683,202; Erlich, Patente de los Estados Unidos No. 4,582,788; y Saiki, y colegas, Patente de los Estados Unidos No. 4,683,194), utilizando parejas de cebadores que son capaces de hibridizarse a las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma de doble cadena.

62
✓

En vez de la PCR, pueden usarse métodos alternativos, tales como la "Reacción en Cadena de la Ligasa" ("LCR") (Barany, *proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88: 189-193 (1991). La LCR emplea dos parejas de sondas de oligonucleótidos para amplificar exponencialmente una diana objetiva. Las secuencias de cada pareja de oligonucleótidos se selecciona para permitirle a la pareja hibridarse a secuencias colindantes de la misma hebra de la diana. Dicha hibridación forma un sustrato para una ligasa dependiente de plantilla. Al igual que con la PCR, los productos resultantes sirven así como plantilla en ciclos subsiguientes y se obtiene una amplificación exponencial de la secuencia deseada.

LCR puede llevarse a cabo con oligonucleótidos que tienen secuencias proximales y distales de la misma hebra de un sitio polimérico. En una incorporación, cualquiera de los dos oligonucleótidos se designará para incluir el sitio polimórfico actual del polimorfismo. En dicha incorporación, las condiciones de reacción se seleccionan de tal modo que los oligonucleótidos puedan ligarse conjuntamente sólo si la molécula diana contiene o carece del nucleótido específico que es complementario con el lado polimórfico presente en el oligonucleótido. Alternativamente los oligonucleótidos pueden seleccionarse en tal forma que no incluyan el sitio polimórfico (véase, Segev, Solicitud PCT WO 90/01069).

Alternativamente puede emplearse la "Prueba de Ligación de Oligonucleótidos" ("OLA") (Landgren, y colegas, *Science* 241: 1077-1080 (1988)). El protocolo de OLA utiliza dos oligonucleótidos que se designan por ser capaces de hibridarse a secuencias colindantes de una hebra única de una diana. OLA, al igual que LCR, es particularmente apropiado para la

63
detección de mutaciones de punto. A diferencia de LCR, sin embargo, OLA resulta en amplificación "lineal" más que exponencial de la secuencia diana.

Nickerson, y *colegas*, han descrito una prueba para la detección de ácido nucleico que combina atributos de la PCR y el OLA (Nickerson, y *colegas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 87: 8923-8927 (1990)). En este método, la PCR se utiliza para conseguir la amplificación exponencial del ADN diana, el cual se detecta entonces usando el OLA. Además de requerir pasos de procesamiento múltiples, y separados, un problema asociado con dichas combinaciones es que heredan la totalidad de los problemas asociados con la PCR y el OLA.

Son también conocidos esquemas (Wu, y *colegas*, *Genomics* 4: 560 (1989)) basados en la ligación de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que tiene la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, y pueden adaptarse con facilidad a los fines de la presente invención.

Otros procedimientos conocidos de amplificación de ácido nucleico, tales como oligómeros específicos de alelos, tecnología de ADN ramificado, sistemas de amplificación basados en transcripción, o métodos de amplificación isotérmica pueden emplearse también para amplificar y analizar dichos polimorfismos (Malec, y *colegas*, Patente de los Estados Unidos No. 5,130,238; Davey, y *colegas*, Solicitud de Patente Europea 329,822; Schuster, y *colegas*, Patente de los Estados Unidos No. 5,169,766; Miller, y *colegas*, Solicitud PCT WO 89/06700; Kwoh, y *colegas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 1173 (1989); Gingeras, y *colegas*, Solicitud PCT WO 88/10315; Walker, y *colegas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:

64

392-396 (1992)). Todos los métodos anteriores de amplificación de ácido nucleico podrían emplearse.

La identificación de un polimorfismo en el gen de COX-2 canina puede determinarse en una variedad de modos. Correlacionando la presencia o ausencia la enfermedad inflamatoria de las articulaciones en un perro con la presencia o ausencia de un polimorfismo en el gen de COX-2 canina o sus regiones flanqueantes, es posible diagnosticar la predisposición de un perro asintomático a la enfermedad inflamatoria de las articulaciones u otras enfermedades. Si un polimorfismo crea o destruye un sitio de escisión de endonucleasa de restricción, o si resulta en la pérdida inserción de ADN (verbigracia, un polimorfismo de VNTR), alterará el tamaño o el perfil de los fragmentos de ADN que se generan mediante digestión con la endonucleasa de restricción. Como tal, los perros que posean una secuencia variante pueden distinguirse de aquellos que tienen la secuencia original mediante análisis de fragmento de restricción. Los polimorfismos que pueden identificarse de esta manera se denominan "polimorfismos de longitud de fragmento de restricción" ("RFLPs"). Los RFLPs se han utilizado ampliamente en análisis genéticos humanos y animales (Glassberg, Solicitud de Patente del Reino Unido 2135774; Skolnick, M. H., y colegas, *Cytogen. Cell Genet.* 32: 58-67 (1982); Botstein, y colegas, *Ann. J. Hum. Genet.* 32:314-331 (1980); Fischer, y colegas, (Solicitud PCT WO 90/13668); Uhlen, Solicitud PCT WO 90/11369).

De acuerdo con esta incorporación de la invención, se obtiene una muestra de ADN de las células de un perro. En una incorporación

65

preferida, la muestra de ADN se obtiene de la sangre del perro. No obstante, puede utilizarse cualquier fuente de ADN. El ADN se somete a digestión de endonucleasa de restricción. La COX-2 canina se usa como sonda de acuerdo con los métodos RFLP ya descritos.

El polimorfismo obtenido en este procedimiento puede clonarse entonces para identificar la mutación en la región codificadora que altera la estructura de la proteína, o en la región reguladora del gen que afecta su nivel de expresión. Los cambios que impliquen interacciones del promotor con otras proteínas reguladoras pueden identificarse mediante, por ejemplo, desplazamiento en gel.

Mediante dichos métodos pueden identificarse varias clases diferentes de polimorfismos. Ejemplos de dichas clases incluyen: (1) polimorfismos presentes en el ADNc de COX-2 canina de diferentes perros; (2) polimorfismos en secuencias genéticas de COX-2 canina no trasladada, incluyendo el promotor u otras regiones reguladoras del gen de COX-2 canina; (3) polimorfismos en genes cuyos productos interactúan con secuencias reguladoras de COX-2 canina; (4) polimorfismos en secuencias genéticas cuyos productos interactúan con la proteína de COX-2 canina, o a los cuales se liga la proteína de COX-2 canina.

En una su-incorporación alterna, la evaluación se efectúa utilizando "sondas" de oligonucleótidos cuya secuencia es complementaria con la de la porción de ARNm de COX-2 canina. Dichas moléculas se incuban entonces con extractos de células de un paciente bajo condiciones suficientes para permitir la hibridación del ácido nucleico. Para esta sub-incorporación, se prefieren células de las reticulaciones trabeculares. La

67/66

detección de moléculas híbridas del ARNm sonda de doble cadena es indicativa de la presencia de ARNm de COX-2 canina; la cantidad de dicho híbrido formado es proporcional a la cantidad de ARNm de COX-2 canina. Por ello, dichas sondas pueden emplearse para verificar el nivel y extensión de la producción de ARNm de COX-2 canina en las células de un paciente. Dicha hibridación de ácido nucleico puede realizarse bajo condiciones cuantitativas (proveyendo así un valor numérico de la cantidad presente de ARNm de COX-2 canina). Alternativamente, la prueba puede conducirse como una prueba cualitativa que indica si el ARNm de COX-2 canina está presente, o si su nivel excede un valor de usuario predefinido y fijado.

En una segunda incorporación, los “anticuerpos de COX-2 anti-canina” descritos anteriormente se emplean en una prueba de inmunodiagnóstico.

En una sub-incorporación de este aspecto de la presente invención, uno puede verificar la respuesta de COX-2 canina en una biopsia (o un macrófago u otra muestra de células sanguínea), u otra muestra de células, o, más preferiblemente, en una muestra de fluido corporal (especialmente, sangre, suero, plasma, lágrimas, etc.).

Los anticuerpos de COX-2 anti-canina de la presente invención pueden usarse de este modo en una prueba inmunológica para evaluar la presencia de COX-2 canina. Cualquiera de un amplio arreglo de formatos de prueba inmunológica pueden emplearse para este fin (Fackrell, *Clin. Immunoassay* 8: 213-219 (1985)); Yolken, *Rev. Infect. Dis.* 4: 35 (1982); Collins, En: *Alternative Immunoassays*, John Wiley & Sons, NY (1985);

67

Ngo, y colegas, En: *Enzyme Mediated Immunoassay*, Plenum Press, NY (1985)).

La prueba inmunológica más sencilla implica simplemente incubar un anticuerpo que es capaz de ligarse a una molécula diana predeterminada con una muestra sospechosa de contener la molécula diana. La presencia de la molécula diana se determina por la presencia, y proporcional a la concentración, de cualquier anticuerpo unido a la molécula diana. Con el fin de facilitar la separación del anticuerpo unido a la diana del anticuerpo no unido inicialmente presente, se emplea típicamente una fase sólida. Así, por ejemplo, la muestra puede unirse pasivamente a un soporte sólido y, luego de la incubación con el anticuerpo, el soporte puede lavarse para retirar cualquier anticuerpo no ligado.

En pruebas inmunológicas más sofisticadas, la concentración de la molécula diana se determina ligando el anticuerpo a un soporte y, luego, permitiéndole al soporte estar en contacto con una muestra sospechosa de contener la molécula diana. Moléculas diana que se han unido al anticuerpo inmovilizado pueden detectarse en cualquiera de una variedad de formas. Por ejemplo, el soporte puede incubarse en presencia de un segundo anticuerpo, marcado, que sea capaz de ligarse a un segundo epítipo de la molécula diana. La inmovilización del anticuerpo marcado sobre el soporte requiere por ello la presencia de la diana, y es proporcional a la concentración de la diana en la muestra. En una prueba alternativa, la diana se incuba con la muestra y con una cantidad conocida de diana marcada. La presencia de la molécula diana en la muestra compite con las moléculas diana marcadas por sitios de enlace del anticuerpo. De este modo, la

6/68

cantidad de moléculas diana marcadas que son capaces de ligar el anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de la molécula diana en la muestra.

En general, los formatos de prueba inmunológica emplean bien sea marcas radioactivas ("RIAs") o bien marcas enzimáticas ("ELISAs"). Las RIAs tienen las ventajas de simplicidad, sensibilidad y facilidad de uso. Las marcas radioactivas son de dimensión atómica relativamente pequeña, y normalmente no afectan la cinética de la reacción. Dichas pruebas adolecen, sin embargo, de las desventajas que, debido a desintegración radio-isotópica, los reactivos tienen una corta vida en estante, requieren manejo y disposición especiales, e incluyen el uso de un equipo analítico complejo y costoso. RIAs se describen en *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, por Work, y colegas, North Holland Publishing Company, NY (1978), con referencia particular al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assays and Related Techniques", por Chard. ELISAs tienen la ventaja que pueden realizarse empleando equipo no costoso, y con una miríada de diferentes enzimas, de manera que puede utilizarse un gran número de estrategias de detección — colorimétricas, pH, evolución de gas, etc. — para cuantificar la prueba. Además, los reactivos enzimáticos tienen vidas en estante relativamente largas, y carecen del riesgo de contaminación por radiación que acompaña al uso de RIA. Las ELISAs se describen en *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays* (Kemeny, y colegas, Eds.), John Wiley & Sons, NY (1988).

Los anticuerpos de COX-2 anti-canina o las moléculas que ligan COX-2 canina pueden administrarse a un perro, y su capacidad de unirse a COX-2 canina *in vivo* puede determinarse mediante inspección ocular. Significativamente, puesto que dicha prueba de diagnóstico es relativamente rápida, las respuestas inmunes que requieren tiempo considerable, tal como la estimulación potencial de anticuerpos anti-[COX-2 anti-canina], o el acomplejamiento de dichos anticuerpos con anticuerpos de COX-2 anti-canina, no es importante. En una incorporación preferida, el anticuerpo se marcará en forma fluorescente, y se le administrará a un perro mediante inyección en el sistema circulatorio del perro.

En otro aspecto de la presente invención, una proteína de COX-2 canina o fragmento de la misma puede utilizarse en pruebas para tamizar sustancias de prueba en cuanto a la capacidad de modular o mantener actividad de COX-2 canina. En una sub-incorporación, la sustancia de prueba es un agonista, antagonista, o inhibidor de moléculas pequeñas de la proteína de COX-2 canina. En otra sub-incorporación, la sustancia de prueba puede unirse a un sustrato de COX-2 canina. La sustancia de prueba puede ser también un agonista, antagonista, o inhibidor de moléculas pequeñas de COX-1.

Pruebas para tamizar actividad de COX-2 canina incluyen, por ejemplo, una prueba colorimétrica (Kaufman, y colegas, *Enzyme* 12: 537 (1971), Richards y Greengard, *Biochimica et Biophysica Acta* 304: 842-850 (1973), McKnight, y colegas, *J. Biochem.* 267: 25208-25212 (1992)) y técnica de separación a base de HPLC (Buse, y colegas, *Am. J. Physiol.*

272: E1080-1088 (1977), Nelson, y colegas, *Am J. Physiol.* 272: E848-855 (1997)).

De acuerdo con ello, la presente invención provee una célula transformada que tiene una molécula de ácido nucleico la cual comprende una región de promotor exógeno ligada con una secuencia de ácido nucleico estructural, y una secuencia 3' no trasladada ligada a la secuencia de ácido nucleico estructural, en donde la región de promotor exógeno ocasiona la producción de una molécula de ARNm; la secuencia de ácido nucleico estructural codifica un gen de COX-1 canina o un fragmento del mismo; y la secuencia 3' no trasladada da lugar a la terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de la molécula de ARNm. En una incorporación, la secuencia de ácido nucleico estructural está en la orientación de sentido. En una incorporación alternativa, la molécula estructural de ácido nucleico está en la orientación de anti-sentido.

En otra incorporación la presente invención suministra una célula transformada que tiene una molécula de ácido nucleico que comprende una región de promotor exógeno ligada a una secuencia de ácido nucleico estructural, y una secuencia 3' no trasladada, en donde la región de promotor exógeno ocasiona la producción de una molécula de ARNm; la molécula estructural de ácido nucleico codifica un gen de COX-2 canina o un fragmento del mismo, y la secuencia 3' no trasladada da lugar a la terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de la molécula de ARNm. En una incorporación, la secuencia de ácido nucleico estructural está en la orientación de sentido. En

una incorporación alternativa, la secuencia de ácido nucleico estructural está en la orientación de anti-sentido.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método para probar una proteína de COX-2 canina en una célula, que comprende (A) incubar una molécula de ácido nucleico marcador con una molécula de ácido nucleico complementario obtenida de la célula, en donde la incubación se efectúa bajo condiciones que permitan la hibridación del ácido nucleico, y la molécula de ácido nucleico marcador es capaz de hibridarse específicamente bajo condiciones de alta astringencia a una molécula de ácido nucleico que codifica la COX-2 canina o un complemento de la misma; (B) hibridar la molécula de ácido nucleico marcador con la molécula de ácido nucleico complementario; y (C) probar el ácido nucleico complementario, en donde la prueba es predictiva del nivel o patrón de la proteína de COX-2 canina. En una incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 canina. En otra incorporación, la prueba es predictiva del patrón de la proteína de COX-2 canina. La prueba puede llevarse a cabo, por ejemplo, por hibridación *in situ*.

En otra incorporación la presente invención aporta un método para el diagnóstico o la prognosis de una condición asociada con incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 en un perro, el cual comprende probar la concentración de una molécula, concentración que depende de la expresión de un gen de incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 canina, y probándose la molécula en una muestra biológica del perro. Prácticamente

la muestra biológica puede ser cualquier muestra biológica del animal, por ejemplo, tejido esquelético, sangre, linfa, o suero. La molécula probada puede ser, por ejemplo, una molécula de proteína expresada por el gen de incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 canina. Alternativamente, la molécula probada puede ser una molécula de ácido nucleico tal como una molécula de ARNm codificada por el gen de incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 canina, o una molécula de ADNc codificada por el gen de incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 canina. En una incorporación, la concentración de la molécula de ARNm se prueba incubando la muestra biológica en presencia de una molécula de ácido nucleico que se hibridiza a la molécula de ARNm para producir una molécula hibridizada de ARNm, y detectando la molécula hibridizada de ARNm.

En otra incorporación la presente invención provee un método para diagnosticar una condición asociada con incorporación, la prueba es predictiva de la concentración de la proteína de COX-2 en un perro, el cual comprende los pasos de (A) incubar bajo condiciones que permitan hibridizar una molécula de ácido nucleico marcador con una célula de ácido nucleico complementaria obtenida de una muestra biológica del perro; (B) hibridizar la molécula de ácido nucleico marcador con la molécula de ácido nucleico complementario; y (C) probar la molécula de ácido nucleico marcador hibridizada y la molécula de ácido nucleico complementario en cuanto a polimorfismo; diagnosticando mediante ello la condición asociada con COX-2 en el perro, en donde: la molécula de ácido nucleico

73
X

complementario comprende una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se hibridiza específicamente a otro polinucleótido que se liga al gen de COX-2 canina; y el polimorfismo es predictivo de una mutación que afecta la condición de COX-2 canina en el perro. Preferiblemente, la prueba detecta la concentración de la molécula de ácido nucleico marcador hibridizado y la molécula de ácido nucleico complementario. Alternativamente, la prueba puede detectar el patrón de la molécula de ácido nucleico marcador hibridizado y la molécula de ácido nucleico complementario. En una incorporación, la molécula de ácido nucleico marcador es una molécula de ARNm codificada por el gen o una molécula de ADNc codificada por el gen. La condición asociada con COX-2 puede ser cualquier condición en la cual la proteína de COX-2 canina se expresa en el animal. Por ejemplo, la condición asociada con COX-2 puede ser inflamación, artritis, cáncer, neoplasia, un desorden del sistema nervioso central ("CNS"), un desorden oftalmológico, bronquitis, tendinitis, bursitis, condiciones relacionadas con la piel (tales como psoriasis, eczema, quemaduras, y dermatitis), enfermedad inflamatoria del intestino, gastritis, síndrome irritable del intestino, enfermedad de Chron, colitis ulcerativa, enfermedades vasculares, dolores de cabeza con migraña, periateritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, pancreatitis, enfermedad de Hodgkin, esclerodoma, fiebre reumática, diabetes, miastenia gravis, sarcoidosis, síndrome nefrótico, hipersensibilidad, conjuntivitis, gingivitis, hinchazón después de una cirugía, isquemia del miocardio, y similares.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método de determinar una asociación entre un polimorfismo y un rasgo expresado

por un perro, en donde el método comprende: (A) hibridizar una molécula de ácido nucleico específica por el polimorfismo a un gen en una célula, en donde la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3 ó un complemento del mismo; y (B) determinar el grado de asociación entre el polimorfismo y el rasgo. La molécula de ácido nucleico marcador puede comprender, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se liga físicamente dentro de 1 mb de una secuencia que específicamente se hibridiza al gen. Si se desea, la molécula de ácido nucleico de marcador puede comprender una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se liga físicamente dentro de 100 kb a una secuencia que específicamente se hibridiza al gen. Alternativamente, la molécula de marcador puede comprender una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se liga físicamente dentro de 10 kb a una secuencia que específicamente se hibridiza al gen.

En otra incorporación la presente invención aporta un método de producir una célula que contiene una proteína de COX-2 canina expresada, el cual comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo así la célula que contiene la proteína de COX-2 canina expresada, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural, la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3, la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados al extremo 3' de una molécula de ARNm; y la molécula de

ácido nucleico funcional resulta en expresión de la proteína de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método de producir una célula que exhibe co-supresión de una proteína de COX-2 canina, que comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo mediante ello la célula que exhibe co-supresión de la proteína de COX-2 canina, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural, la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3, la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados al extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico resulta en co-supresión de la proteína de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención provee un método para causar co-supresión de una proteína de COX-2 canina en una célula transformada, el cual comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico para producir una célula transformada; y (B) cultivar la célula transformada; causando mediante ello co-supresión de la proteína de COX-2 canina en la célula transformada, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural, la región estructural comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3, la región estructural está ligada a una

76
X
X

secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos al extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico resulta en co-supresión de la proteína de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención provee un método de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de COX-2 canina o fragmento de la misma, el cual comprende: (A) incubar bajo condiciones que permiten hibridizar una primera molécula de ácido nucleico que comprende ID. SEC.: 3 ó el complemento de la misma con una segunda molécula de ácido nucleico complementario obtenido de una célula; (B) hibridizar la primera molécula de ácido nucleico con la segunda molécula de ácido nucleico; y (C) aislar la segunda molécula de ácido nucleico.

En otra incorporación la presente invención aporta un método de producir una célula que contiene un gen de COX-2 canina expresado, el cual comprende (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo mediante ello la célula que contiene el gen de COX-2 canina expresado, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural en donde la región estructural comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma, la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos al extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de

77
7

ácido nucleico funcional resulta en sobre-expresión de la proteína del gen de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención provee un método de producir una célula que exhibe co-supresión de un gen de COX-2 canina, el cual comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y (B) cultivar la célula transformada; produciendo mediante ello co-supresión de la célula de un gen de COX-2 canina, en donde: la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor, la región de promotor está ligada a una región estructural en donde la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo conformado por ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma; la región estructural está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados al extremo 3' de una molécula de ARNm, y la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión del gen de COX-2 canina.

En otra incorporación la presente invención proporciona un método de causar co-supresión de un gen de COX-2 canina en una célula, el cual comprende: (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico; y (B) cultivar la célula transformada; reduciendo mediante ello expresión del gen de COX-2 canina en una célula, en donde: la molécula de ácido nucleico tiene una región de promotor exógeno que ocasiona la producción de una molécula de ARNm, la región de promotor exógeno está ligada a una molécula de ácido nucleico transcrito que tiene una cadena transcrita y



una cadena no transcrita, la cadena transcrita es complementaria con una molécula de ácido nucleico que tiene un ácido nucleico seleccionado del grupo conformado por ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma y la cadena transcrita es complementaria con una molécula de ARNm endógeno, y la molécula de ácido nucleico transcrito está ligada a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm.

En otra incorporación la presente invención suministra una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que comprende una secuencia que codifica una proteína de COX-2 canina de mamífero. Preferiblemente la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica una secuencia seleccionada del grupo conformado por proteína de COX-2 canina de humano, de rata, o ratón. Más preferiblemente, ella codifica una proteína de COX-2 canina de humano. Más preferiblemente aún, ella codifica una COX-2 canina de ratón.

En otra incorporación la presente invención aporta un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener actividad de COX-2 canina, en donde el método comprende (A) contactar una célula de prueba transformada con el material de prueba, en donde la célula transformada expresa un gen que codifica COX-2 canina, y en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de una cantidad de prueba de ácido aracadónico; (B) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por las células de prueba transformadas; (C) contactar una célula transformada de control

2229

con una cantidad de control de precursor de prostaglandina, en donde la célula transformada de control expresa un gen que codifica COX-2 canina, y en donde el contacto se efectúa sustancialmente en ausencia del material de prueba; (D) medir la conversión de prostaglandina en producto de prostaglandina por las células transformadas de control; y (E) comparar la cantidad de precursor de prostaglandina convertida en producto de prostaglandina por las células transformadas de prueba con la cantidad de precursor de prostaglandina convertida en producto de prostaglandina por las células transformadas de control.

En otra incorporación la presente invención provee un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener actividad de COX-2 canina, en donde el método comprende (A) contactar una proteína de prueba de COX-2 canina con el material de prueba, en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de una cantidad de prueba de precursor de prostaglandina; (B) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por las células de prueba transformadas; (C) contactar una proteína de COX-2 canina de control con una cantidad de control de precursor de prostaglandina, en donde el contacto se efectúa sustancialmente en ausencia del material de prueba; (D) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por proteína de COX-2 canina; y (E) comparar la cantidad de precursor de prostaglandina convertida en producto de prostaglandina por la proteína de COX-2 canina de prueba con la cantidad de precursor de prostaglandina convertida en producto de prostaglandina por la proteína de COX-2 canina de control.

80

En otra incorporación la presente invención aporta un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener actividad de COX-2 canina, en donde el método comprende (A) contactar un fragmento de COX-2 canina de prueba con el material de prueba, en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de una cantidad de prueba de precursor de prostaglandina; (B) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por las células de prueba transformadas; (C) contactar un fragmento de aminoácido de COX-2 canina de control con una cantidad de control de precursor de prostaglandina, en donde el contacto se efectúa sustancialmente en ausencia del material de prueba; (D) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por el fragmento de aminoácido de COX-2 canina; y (E) comparar la cantidad de precursor de prostaglandina convertida en producto de prostaglandina por el fragmento de COX-2 canina de prueba con la cantidad de precursor de prostaglandina convertida en producto de prostaglandina por el fragmento de aminoácido de COX-2 canina de control.

En una incorporación preferida, el precursor de prostaglandina es ácido aracadónico.

Habiendo ahora descrito en términos generales la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que se dan a modo de ilustración, y no tienen como finalidad ser limitantes de la presente invención, a menos que se indique.

81
21

Ejemplo 1

Aislamiento de ADNc

Para la construcción de bibliotecas de ADNc para clonar la COX-1 y la COX-2 caninas, se preparó ARNm a partir de papilas caninas de riñón y células caninas mononucleares estimuladas con lipopolisacárido (LPS).

Para la construcción de la biblioteca de ADNc de riñón, el ARN total se aisló de 200 microgramos (ug) de tejido renal empleando 12 ml de reactivo TRIzol (Life Technologies). El ARN se preparó utilizando el protocolo estándar suministrado por el fabricante (Life Technologies). El protocolo arrojó alrededor de 200 ug de ARN total. El ARNm se aisló entonces usando un estuche de Columna de Espín de Celulosa Mini Oligo(dT) (5 prima-3 prima). El rendimiento fue de alrededor de 7 ug luego de una sola purificación en la columna oligo(dT).

Para la construcción de una biblioteca de ADNc de células mononucleares, se aisló ARNm directamente de alrededor de 10^7 células utilizando el estuche de Purificación de ARNm puro Poly(A) (Ambion). Después de un solo paso de purificación oligo(dT), se aislaron 2 ug de ARNm.

Ejemplo 2

Expresión del Gen

La COX-1 canina se expresó empleando un ADNc de COX-1 de longitud total que contenía la región codificadora completa, la cual se digirió con Sall y NotI para generar un fragmento de alrededor de 2.600 pares de bases para ligación en un vector de expresión de células de insecto,

2/82

pFastBac 1 (Invitrogen), el cual se había digerido con SalI y NotI. El plásmido resultante, Pmon37775, se secuenció para confirmar la clonación.

Se creó un plásmido de expresión de células de insecto para COX-1 canina ligando un fragmento de COX-2 generado por un fragmento de PCR a un ADNc de COX-2 parcial. El extremo 5' de COX-2 se clonó a partir de ADNc de doble cadena de riñón utilizando PCR. Ambos fragmentos se ligaron en pFastBac 1, que se había digerido con EcoRI y NotI. El plásmido resultante, pMON37776, se confirmó por secuenciación.

Ejemplo 3

Prueba Selectiva de Tamizado de Inhibidor de COX-2

La prueba de tamizado estándar para determinar la potencia del inhibidor (IC_{50}) fue un método ELISA para detección de PGE₂. Los valores de IC_{50} se determinaron mediante pre-incubación de los inhibidores con enzima durante 10 minutos a 25°C en una solución amortiguadora que contenía 50 mM de fosfato de potasio, pH 7.5, 2 mM fenol, 1 mM heme, y 300 mM epinefrina. Los inhibidores se prepararon primero como solución madre de 10 mM en DMSO y diluida luego en 1:9 (DMSO:etanol). La reacción se dejó avanzar durante 10 minutos. Para la inhibición en función del tiempo, la velocidad inicial de la reacción se midió deteniendo la reacción en 15 segundos con adición de 1/10 del volumen N HCl; la cantidad de prostaglandina formada se midió mediante ELISA (Cayman Chemical Co. Ann Arbor, MI). IC_{50} s se determinaron de un ajuste logarítmico de 4 parámetros de los datos empleando Grafit.

27/8

Todas las referencias, patentes o solicitudes citadas aquí se incorporan por referencia en su integridad como si estuvieran escritas aquí.

Reivindicamos:

1. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada seleccionada del grupo de ADN conformado por una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, el complemento de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, un fragmento interno de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, y un fragmento interno del complemento de molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 1, en donde ID. SEC.: 1 codifica una proteína de COX-1 canina o un fragmento de la misma.
2. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica la proteína de COX-1 canina.
3. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada tiene ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma.
4. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico se hibridiza específicamente a otra molécula de ácido nucleico que codifica la COX-1 canina o complemento de la misma

2/2/25

y falla en hibridizarse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica COX-1 no-canina o complemento de la misma.

5. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la molécula de ácido nucleico se hibridiza específicamente a otra molécula de ácido nucleico que codifica COX-1 canina o complemento de la misma bajo condiciones de alta astringencia y falla en hibridizarse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica COX-1 no-canina o complemento de la misma bajo condiciones de alta astringencia.
6. Una molécula de ácido nucleico de COX-1 canina sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 20 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma.
7. La molécula de ácido nucleico de COX-1 canina sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 50 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma.

- 
8. La molécula de ácido nucleico de COX-1 canina sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 100 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 1 ó un complemento de la misma.
 9. Una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma en donde la proteína de COX-1 canina o el fragmento está codificado por una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a ID. SEC.: 1 ó a un complemento de la misma.
 10. Una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona de ID. SEC.: 1 ó a un complemento de la misma.
 11. Una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 2.
 12. Una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma que comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 2.

87
A

13. La proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la proteína de COX-1 canina o fragmento es una proteína de fusión.

14. Un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a una proteína de COX-1 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 2.

15. El anticuerpo de la reivindicación 14, en donde el anticuerpo está marcado en forma detectable.

16. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada seleccionada del grupo de ADN conformado por una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, una molécula complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, un fragmento interno de la molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, y un fragmento interno una molécula complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene ID. SEC.: 3, en donde la ID. SEC.: 3 codifica una proteína de COX-2 canina o un fragmento de la misma.

17. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada codifica la proteína de COX-2 canina.

- 72/88
18. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada tiene la secuencia descrita por ID. SEC.: 3 ó un complemento de la misma.
 19. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada se hibridiza específicamente a otra molécula de ácido nucleico que codifica COX-2 canina, o complemento de la misma, y falla en hibridizarse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica COX-2 no-canina o complemento de la misma.
 20. La molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada se hibridiza específicamente a otra molécula de ácido nucleico que codifica COX-2 canina, o complemento de la misma, bajo condiciones de alta astringencia y falla en hibridizarse específicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica COX-2 no-canina o complemento de la misma bajo condiciones de alta astringencia.
 21. Una molécula de ácido nucleico de COX-2 canina sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es

89

idéntica a por lo menos 20 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó un complemento de la misma.

22. La molécula de ácido nucleico de COX-2 canina sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 50 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó un complemento de la misma.
23. La molécula de ácido nucleico de COX-2 canina sustancialmente purificada de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a por lo menos 100 nucleótidos contiguos de ID. SEC.: 3 ó su complemento.
24. Una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma codificado por una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza específicamente a ID. SEC.: 4 ó su complemento.
25. La proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo conformado por ID. SEC.: 4 ó y el complemento de ID. SEC.: 4.

26. Una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 4.
27. Una proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o un fragmento de la misma en donde la proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada o el fragmento de la misma comprende por lo menos 10 aminoácidos consecutivos de ID. SEC.: 4.
28. La proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada fragmento de la misma de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la proteína de COX-2 canina o fragmento de la misma es una proteína de fusión.
29. Un anticuerpo capaz de ligarse específicamente a la proteína de COX-2 canina sustancialmente purificada que tiene ID. SEC.: 4.
30. El anticuerpo de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo está marcado en forma detectable.
31. Una célula transformada que tiene una molécula de ácido nucleico que comprende una región de promotor exógeno ligada a una secuencia de ácido nucleico estructural, y una secuencia 3' no trasladada ligada a la secuencia de ácido nucleico estructural, en donde:

9/2
6

la región de promotor exógeno causa la producción de una molécula de ARNm;

la secuencia de ácido nucleico estructural codifica un gen de COX-1 canina o un fragmento del mismo; y

la secuencia 3' no trasladada causa terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de la molécula de ARNm.

32. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la secuencia de ácido nucleico estructural está en la orientación anti-sentido.

33. Una célula transformada que tiene una molécula de ácido nucleico que comprende una región de promotor exógeno ligada a una secuencia de ácido nucleico estructural, y una secuencia 3' no trasladada, en donde:

la región de promotor exógeno causa producción de una molécula de ARNm;

la molécula de ácido nucleico estructural codifica un gen de COX-2 canina o un fragmento del mismo; y

la secuencia 3' no trasladada causa terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de la molécula de ARNm.

92
✓

34. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la secuencia de ácido nucleico estructural está en la orientación anti-sentido.
35. Un método para probar una proteína de COX-2 canina en una célula, que comprende:
- (A) incubar una molécula de ácido nucleico marcador con una molécula de ácido nucleico complementario obtenido de la célula, en donde:
 - la incubación se lleva a cabo bajo condiciones que permiten hibridación del ácido nucleico; y
 - la molécula de ácido nucleico marcador es capaz de hibridarse específicamente bajo condiciones de alta astringencia a una molécula de ácido nucleico que codifica la COX-2 canina o un complemento de la misma;
 - (B) hibridizar la molécula de ácido nucleico marcador con la molécula de ácido nucleico complementario; y
 - (C) probar el ácido nucleico complementario, en donde la prueba es predictiva del nivel o patrón de la proteína de COX-2 canina.
36. El método de la reivindicación 35, en donde la prueba es predictiva de la concentración de proteína de COX-2 canina.

93
~~8~~

37. El método de la reivindicación 35, en donde la prueba es predictiva del patrón de proteína de COX-2 canina.
38. El método de la reivindicación 35, en donde la prueba se lleva a cabo por hibridación *in situ*.
39. Un método para diagnóstico o prognosis de una condición asociada con COX-2 en un perro, en donde el método comprende probar la concentración de una molécula, dependiendo la concentración de la expresión de un gen de COX-2 canina, y siendo la molécula susceptible de probarse en una muestra biológica del perro.
40. El método de la reivindicación 39, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo conformado por tejido esquelético, sangre, linfa y suero.
41. El método de la reivindicación 39, en donde la molécula es una molécula de proteína expresada por el gen de COX-2 canina.
42. El método de la reivindicación 39, en donde la molécula es una molécula de ARNm codificada por el gen de COX-2 canina, o una molécula de ADNc codificada por el gen de COX-2 canina.
43. El método de la reivindicación 42, en donde la concentración de la molécula de ARNm se prueba incubando la muestra biológica en

presencia de una molécula de ácido nucleico que se hibridiza a la molécula de ARNm para producir una molécula de ARNm hibridizada, y detectando la molécula de ARNm hibridizada.

44. Un método para diagnosticar una condición asociada con COX-2 en un perro, que comprende los pasos de:

- (A) incubar bajo condiciones que permiten hibridación de ácido nucleico una molécula de ácido nucleico marcador con una molécula de ácido nucleico complementario obtenida de un muestra biológica del perro;
- (B) hibridizar la molécula de ácido nucleico marcador con la molécula de ácido nucleico complementario; y
- (C) probar la molécula de ácido nucleico marcador hibridizada y la molécula de ácido nucleico complementario para polimorfismo;

diagnosticando mediante ello la condición asociada con COX-2 en el perro, en donde:

la molécula de ácido nucleico marcador comprende una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se hibridiza específicamente a otro polinucleótido que está ligado a un gen de COX-2 canina; y

el polimorfismo es predictivo de una mutación que afecta la condición de COX-2 canina en el perro.

- 95
X
45. El método de la reivindicación 44, en donde la prueba detecta la concentración de la molécula de ácido nucleico marcador hibridizada y la molécula de ácido nucleico complementario.
 46. El método de la reivindicación 44, en donde la prueba detecta el patrón de la molécula de ácido nucleico marcador hibridizada y la molécula de ácido nucleico complementario.
 47. El método de la reivindicación 44, en donde la molécula de ácido nucleico marcador es una molécula de ARNm codificada por el gen de COX-2 canina o una molécula de ADNc codificada por el gen de COX-2 canina.
 48. El método de la reivindicación 44, en donde la condición asociada con COX-2 es inflamación.
 49. El método de la reivindicación 44, en donde la condición asociada con COX-2 es artritis.
 50. El método de la reivindicación 44, en donde la condición asociada con COX-2 es cáncer.
 51. El método de la reivindicación 44, en donde la condición asociada con COX-2 es neoplasia.

- 96
52. El método de la reivindicación 44, en donde la condición asociada con COX-2 es un desorden del sistema nervioso central (SNC).
53. Un método de determinar una asociación entre un polimorfismo y un rasgo, en donde el método comprende:
- (A) hibridizar una molécula de ácido nucleico específica para el polimorfismo a un gen en una célula, en donde la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3 ó un complemento de la misma; y
 - (B) determinar el grado de asociación entre el polimorfismo y el rasgo.
54. El método de la reivindicación 53, en donde la molécula de ácido nucleico marcador comprende una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se liga físicamente dentro de 1 mb a una secuencia que específicamente se hibridiza al gen.
55. El método de la reivindicación 53, en donde la molécula de ácido nucleico marcador comprende una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se liga físicamente dentro de 100 kb a una secuencia que específicamente se hibridiza al gen.
56. El método de la reivindicación 53, en donde la molécula de ácido nucleico marcador comprende una secuencia de nucleótidos de un

97
97

polinucleótido que se liga físicamente dentro de 10 kb a una secuencia que específicamente se hibridiza al gen.

57. Un método de producir una célula que contiene una proteína de COX-2 canina expresada, que comprende:

(A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y

(B) cultivar la célula transformada;

produciendo mediante ello la célula que contiene la proteína de COX-2 canina expresada, en donde:

la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor;

la región de promotor se liga a una región estructural;

la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3,

la región estructural se liga a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm; y

la molécula de ácido nucleico funcional resulta en expresión de la proteína de COX-2 canina.

58. Un método de producir una célula que exhibe co-supresión de una proteína de COX-2 canina, que comprende:

(A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y

(B) cultivar la célula transformada;
produciendo mediante ello la célula que exhibe co-supresión de proteína de COX-2 canina, en donde:

la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor;

la región de promotor se liga a una región estructural;

la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3,

la región estructural se liga a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm; y

la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión de la proteína de COX-2 canina.

59. Un método para causar co-supresión de una proteína de COX-2 canina en una célula transformada, que comprende:

(A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico para producir una célula transformada; y

(B) cultivar la célula transformada;
causando mediante ello co-supresión de proteína de COX-2 canina en la célula transformada, en donde:

la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor;

la región de promotor se liga a una región estructural;

la región estructural comprende molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de ID. SEC.: 3,

la región estructural se liga a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm; y

la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión de la proteína de COX-2 canina.

60. Un método de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de COX-2 canina o un fragmento de la misma, que comprende:

- (A) incubar bajo condiciones que permiten hibridación de ácido nucleico una primera molécula de ácido nucleico que comprende ID. SEC.: 3 ó el complemento de la misma con una segunda molécula de ácido nucleico complementario obtenido de una célula;
- (B) hibridizar la primera molécula de ácido nucleico con una segunda molécula de ácido nucleico; y
- (C) aislar la segunda molécula de ácido nucleico.

127/00

61. Un método de producir una célula que contiene un gen de COX-2 canina expresado, que comprende:

(A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y

(B) cultivar la célula transformada;

produciendo mediante ello la célula que contiene el gen COX-2 canina expresado, en donde:

la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor,

la región de promotor se liga a una región estructural en donde la región estructural comprende molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico conformada por ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma;

la región estructural se liga a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm; y

la molécula de ácido nucleico funcional resulta en sobre-expresión de la proteína del gen de COX-2 canina.

62. Un método de producir una célula que exhibe co-supresión de un gen de COX-2 canina, que comprende:

(A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico funcional; y

(B) cultivar la célula transformada;

101
produciendo mediante ello co-supresión de un gen de COX-2 canina, en donde:

la molécula de ácido nucleico funcional comprende una región de promotor;

la región de promotor se liga a una región estructural en donde la región estructural comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo conformado por ID. SEC.: 3 ó complementos de la misma,

la región estructural se liga a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados a un extremo 3' de una molécula de ARNm; y

la molécula de ácido nucleico funcional resulta en co-supresión del gen de COX-2 canina.

63. Un método para causar co-supresión de un gen de COX-2 canina en una célula, que comprende:

- (A) transformar la célula con una molécula de ácido nucleico; y
- (B) cultivar la célula transformada;

reduciendo mediante ello la expresión de un gen de COX-2 canina en una célula, en donde:

la molécula de ácido nucleico tiene una región de promotor exógeno la cual funciona en la célula para causar la producción de una molécula de ARNm;

la región de promotor exógeno se liga a una molécula de ácido nucleico transcrita que tiene una cadena transcrita y una cadena no transcrita;

la cadena transcrita es complementaria con una molécula de ácido nucleico que tiene un ácido nucleico seleccionado del grupo conformado por ID. SEC.: 3, ó complementos de la misma, y la cadena transcrita es complementaria con una molécula de ARNm endógeno; y

la molécula de ácido nucleico transcrita se liga a una secuencia 3' no trasladada que funciona en la célula para causar terminación de transcripción y adición de ribonucleótidos poliadenilados al extremo 3' de una molécula de ARNm.

64. Un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener actividad de COX-2 canina, en donde el método comprende:
- (A) contactar una célula de prueba transformada con el material de prueba, en donde la célula transformada expresa un gen codificador de COX-2, y en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de una cantidad de prueba de un precursor de prostaglandina;
 - (B) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por medio de la célula transformada de prueba;

103
18/1

- (C) contactar una célula transformada de control con una cantidad de control del precursor de prostaglandina, en donde la célula transformada de control expresa un gen que codifica COX-2 canina, y en donde el contacto se realiza sustancialmente en ausencia del material de prueba;
 - (D) medir la conversión del precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina por medio de la célula transformada de control; y
 - (E) comparar la cantidad del precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina por medio de la célula transformada de prueba con la cantidad de precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina por medio de la célula transformada de control, identificando mediante ello el material de prueba.
65. Un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener actividad COX-2 canina, en donde el método comprende:
- (A) contactar una proteína de COX-2 canina con el material de prueba, y en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de una cantidad de prueba de un precursor de prostaglandina;
 - (B) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina;
 - (C) contactar una proteína de COX-2 canina de control con una cantidad de control del precursor de prostaglandina, y en donde

104
104
el contacto se realiza sustancialmente en ausencia del material de prueba;

- (D) medir la conversión del precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina; y
- (E) comparar la cantidad del precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina por medio de la proteína de COX-2 canina con la cantidad de precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina por medio de la proteína de COX-2 canina de control, identificando mediante ello el material de prueba.

66. Un método de identificar un material de prueba que tiene la capacidad de inhibir, suprimir, modular, o mantener actividad COX-2 canina, en donde el método comprende:

- (A) contactar un fragmento de aminoácido de COX-2 canina con el material de prueba, y en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de una cantidad de prueba de un precursor de prostaglandina;
- (B) medir la conversión de precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina;
- (C) contactar un fragmento de aminoácido de COX-2 canina con una cantidad de control del precursor de prostaglandina, y en donde el contacto se realiza sustancialmente en ausencia del material de prueba;

(D) medir la conversión del precursor de prostaglandina en producto de prostaglandina; y

(E) comparar la cantidad del precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina por medio del fragmento de aminoácido de COX-2 canina con la cantidad de precursor de prostaglandina convertido en producto de prostaglandina por medio del fragmento de aminoácido de COX-2 canina de control, identificando mediante ello el material de prueba.

67. El método de las reivindicaciones 64, 65, ó 66 en donde el precursor de prostaglandina es ácido aracadónico.

106
X
(2)

Extracto

La presente invención se relaciona con genes que codifican proteínas de las enzimas de ciclooxigenasa - 1 (COX-1) canina y ciclooxigenasa - 2 (COX-2) canina, las proteínas de COX-1 canina y COX-2 canina, y pruebas para la evaluación de actividades de COX-1 canina y COX-2. La invención se relaciona también con moléculas de ácido nucleico asociadas con estos genes incluyendo sus componentes, homólogos y fragmentos, y con métodos de utilizar estas moléculas de ácido nucleico, las enzimas y fragmentos de cualquiera de las dos.

107

Fig.1 Sequence alignment of human and canine COX-1

```

Canine  MSRGSRLEHRW PLLL--LL-L LLLPPPPVLP AE--ARTPAP VNPCCYYPCQ
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Human   MSR-S----- -LLLRFLFL LLLPPLPVLL ADPGAPT--P VNPCCYYPCQ 41

      HQGICVRFGL DRYQCDCTRT GYSGPNCTIP ELMTWLRNSL RPSPSFLHFL
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      HQGICVRFGL DRYQCDCTRT GYSGPNCTIP GLMTWLRNSL RPSPSFTHFL 91

      LTHGRWFWEF INATFIRDML NRIVLTAEN LIPSPPTYNI AHDIISWESF
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      LTHGRWFWEF VNATFIREMR NRIVLTVRN LIPSPPTYNS AHDIISWESF 141

      SNVSYTTRVL PSVPQDCPTP MGTGKQKQLP DAQLLGRRFL LRRKFIPDPQ
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      SNVSYTTRIL PSVPQDCPTP MGTGKQKQLP DAQLLARRFL LRRKFIPDPQ 191

      GTNLMFAFFA QHFTHQFFKT SGKMGPQFTK ALGHGVDLGH IYGDNLDRQY
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      GTNLMFAFFA QHFTHQFFKT SGKMGPQFTK ALGHGVDLGH IYGDNLDRQY 241

      QLRLFKDGKL KYQVLDGEMV PPSVEEAPVL MHYPRGILPQ SQMAVGQEVF
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      QLRLFKDGKL KYQVLDGEMV PPSVEEAPVL MHYPRGIPPO SQMAVGQEVF 250

      GLLPGLMLYA TLWLREHNRV CDLLKAEHPT WGDEQLFQTA RLILIGETIK
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      GLLPGLMLYA TLWLREHNRV CDLLKAEHPT WGDEQLFQTT RLILIGETIK 300

      IVIEEYVQQL SGYFLQLKFD PELLFSAQFQ YRNRIAMEFN QLYHWHPLMP
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      IVIEEYVQQL SGYFLQLKFD PELLFGVQFQ YRNRIAMEFN HLYHWHPLMP 350

      DSFWVGSQEY SYEQFLFNTS MLTHYGIEAL VDAFSRQSAG RIGGGRNIDH
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      DSFWVGSQEY SYEQFLFNTS MLVDYGVEAL VDAFJRQIAG RIGGGRNMDH 400

      HVLHVAVETI RESRELRLQP FNEYRKRFQM RPYMSFQELT GEKEMAAELE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      HILHVAVDVI RESREMLRQP FNEYRKRFQM KPYTSFQELV GEKEMAAELE 450

      ELYGDIDALE FYPGLLLEKC HPNSIFGESH IRIGAPPSLK GLLGNPICSP
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      ELYGDIDALE FYPGLLLEKC HPNSIFGESH IRIGAPPSLK GLLGNPICSP 500

      EYWKPSFTGG EMGFNMVKA TLKQLVCLNT KTCPYVSFRV PDPHQDGGPG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      EYWKPSFTGG EVGFNIVKA TLKQLVCLNT KTCPYVSFRV PDASQDDGPA 550

      VERPSTEL
      : : : : :
      VERPSTEL

```

Canine	MLFRAVLLCA	ALAVVRAANP	CCSHPCQNRG	ICMSTGFDQY	KCDCTRGTGFI	
Human	MLARALLLCA	VLALSHTANP	CCSHPCQNRG	VCMSVGFQDY	KCDCTRGTGFI	50
	GENCSTPEFL	TRIKLYLKPT	PNTVHYILTH	FKGVNIVNN	IPFLRNTIMK	
	GENCSTPEFL	TRIKLFLKPT	PNTVHYILTH	FKGFNVVNN	IPFLRNAIMS	100
	YVLTSRSHLI	ESPPTYNVNY	GYKSWEAFSN	LSYYTRALPP	VPDDCPTPMG	
	YVLTSRSHLI	DSPTYNADY	GYKSWEAFSN	LSYYTRALPP	VPDDCPTPLG	150
	VKGKKELPDS	KEIVEKPLLK	RKFIPDPQGT	NMMFAFFAQH	PTHQFFKTDH	
	VKGKKELPDS	NEIVGKLLLR	RKFIPDPQGS	NMMFAFFAQH	PTHQFFKTDH	200
	KRGPAFTKGL	GHGVDLNHVV	GETLDRQHKL	RLFKDGKMKY	QVIDGEVYPP	
	KRGPAFTNGL	GHGVDLNHIY	GETLARQRKL	RLFKDGKMKY	QIIDGEMYPP	250
	TVKDTQVEMI	YPPHVPEHLQ	FAVGQEVFGL	VPGLMMYATI	WLREHNVRCD	
	TVKDTQAEMI	YPPQVPEHLR	FAVGQEVFGL	VPGLMMYATI	WLREHNVRCD	300
	VLKQEHPEWD	DERLFQTSRL	ILIGETIKIV	IEDYVQHLSG	YHFKLKFDPE	
	VLKQEHPEWG	DEQLFQTSRL	ILIGETIKIV	IEDYVQHLSG	YHFKLKFDPE	350
	LLFNQQFQYQ	NRIAAEFNTL	YHWHPLLFD	LQIDDOEYNF	QQFIYNNSIL	
	LLFNKQFQYQ	NRIAAEFNTL	YHWHPLLFD	FQIHQQKYN	QQFIYNNSIL	400
	LEHGLTQFVE	SFSRQIAGRV	AGGRNVPAV	QQVAKASIDQ	SRQMKYQSLN	
	LEHGITQFVE	SFTRQIAGRV	AGGRNVPPAV	QKVSQASIDQ	SRQMKYQSFN	450
	EYRKRFRLKP	YTSFEELTGE	KEMAAGLEAL	YGDIDAMELY	PALLVEKPRP	
	EYRKRFMLKP	YESFEELTGE	KEMSALEAL	YGDIDAVELY	PALLVEKPRP	500
	DAIFGETMVE	MGAPFSLKGL	MGNPICSPDY	WKPSTFGGEV	GFKIINTASI	
	DAIFGETMVE	VGAPFSLKGL	MGNVICSPAY	WKPSTFGGEV	GFKIINTASI	550
	QSLICNNVKG	CPFTAFSVQD	GQLTKTVTIN	ASSSHSGLDD	INPTVLLKER	
	QSLICNNVKG	CPFTSFSVPD	PELIKTVTIN	ASSSRSGGLD	INPTVLLKER	600

109
H8

3223

Fig.3 Multiple species sequence alignment of COX-2

```
COX2_mouse      MLFRAVLCAALGLSQAANPCCSNPCQNGECNSTGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_RAT        MLFRAVLCAALGLSQAANPCCSNPCQNGECNSTGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEIL
COX2_guineapig  MLARALLCAALALGQAANPCCSNPCQNGECLSVGFDRYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_rabbit     MLARALLCAALALGQAANPCCSNPCQNGVCMTHGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_horse      MLARALLCAALALGQAANPCCSNPCQNGVCMTHGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_canine     MLARALLCAALAVVRAANPCCSNPCQNGGICMSTGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_sheep      MLARALLCAAVVCG-AANPCCSNPCQNGVCMTHGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_human      MLARALLCAALALGQAANPCCSNPCQNGVCMTHGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFL
COX2_chicken    MLLPCALLAALLAAGHAANPCCSLPCQNGVCMTHGFDQYKDCDCTRTGYGENCTTPEFF
** . **.. : :***** **;* :; **;.:*****;*****;****;

COX2_mouse      TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNVHY
COX2_RAT        TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNVHY
COX2_guineapig  TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNAHY
COX2_rabbit     TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNVHY
COX2_horse      TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNAHY
COX2_canine     TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNVHY
COX2_sheep      TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNVHY
COX2_human      TRIKLLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNADY
COX2_chicken    TWLKLKPTFNTVHYILTHFGVNNIVNNIPFLRSLTMKYVLTSSYLIDSPPTYNADY
* :; ** *****;*****;****; :; **;.:*****;*****;****;

COX2_mouse      GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGS
COX2_RAT        GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
COX2_guineapig  GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
COX2_rabbit     GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
COX2_horse      GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
COX2_canine     GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
COX2_sheep      GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
COX2_human      GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGS
COX2_chicken    GYKWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTFMGVGKKEKLPDSKEVLEKVLRLRRFIPDPQGT
*****;*****;****; :; **;.:*****;*****;****;

COX2_mouse      NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_RAT        NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_guineapig  NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_rabbit     NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_horse      NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_canine     NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_sheep      NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_human      NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
COX2_chicken    NMFAFFAQHFTHQFTKTDHKGPGFTAGLGHGVDLNHIYGETLDQHKLRLFKDGKLY
* :; ** *****;*****;****; :; **;.:*****;*****;****;

COX2_mouse      QVIGGEVYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_RAT        QVIGGEVYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_guineapig  QIIDGENYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_rabbit     QVIDGEVYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_horse      QIINGEVYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_canine     QVIDGEVYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_sheep      QIINGEVYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_human      QIIDGENYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
COX2_chicken    QIIDGENYPTVKDTQVENIYPPHIFENLQFAVGQEVFGLVPLNMYATINLREHNRVCD
* :; ** *****;*****;****; :; **;.:*****;*****;****;
```

110
Hx

3223

```
COX2_mouse      ILKQENPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_RAT        ILKQENPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_guineapig  VLKQENPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_rabbit     VLKQENPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_horse      VLKQENPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_canine     VLKQENPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_sheep      VLKQENPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_human      VLKQENPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
COX2_chicken    VLKQENPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPPELLFNQQFQYQ
```

```
COX2_mouse      NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEY5FKQFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_RAT        NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEYTFKQFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_guineapig  NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_rabbit     NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_horse      NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_canine     NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_sheep      NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_human      NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
COX2_chicken    NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFQIDDDQVYNYQOFLYNN3ILLEHGLTQFVESFTROIAGRV
```

```
COX2_mouse      AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_RAT        AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_guineapig  AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_rabbit     AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_horse      AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_canine     AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_sheep      AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_human      AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
COX2_chicken    AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSRNKYQSLNEYKRFSLKPYTSFEELTGEREMAALKEAL
```

```
COX2_mouse      YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_RAT        YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_guineapig  YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_rabbit     YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_horse      YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_canine     YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_sheep      YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_human      YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
COX2_chicken    YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPOYWKPSFTFGGEV
```

```
COX2_mouse      GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_RAT        GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_guineapig  GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_rabbit     GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_horse      GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_canine     GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_sheep      GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_human      GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
COX2_chicken    GFKIINTASIQSLICNVKCPFTSFNVQDFQPTKTATINASASHSRLEDINPTVLLKER
```

112

3223

COX2_mouse	STEL
COX2_RAT	STEL
COX2_guineapig	STEL
COX2_rabbit	STEL
COX2_horse	STEL
COX2_canine	STEL
COX2_sheep	STEL
COX2_human	STEL
COX2_chicken	STEL

..*

(X)

<110> Gierse, James K.
 <120> Canine Cyclooxygenase-1 (COX-1) and Cyclooxygenase-2 (COX-2)
 <150> US 60/147,601
 <160> 15
 <210> 1
 <211> 2587
 <212> DNA
 <213> Canis familiaris

<400> 1
 gccgcccaga gctatgagcc gggggagtcg cctgcaccgg tggccgctgc tcctgctgct 60
 gctgctgctg ctcccgcgc ccccggtcct gcccgcgga gcccggaacc cggcgctgt 120
 gaacccgtgt tgttactacc catgtcagca ccaagggatc tgtgtccgct tcggccttga 180
 ccgctaccag tgtgactgca cccgcacggg ctattctggc cccaactgca ccattcccga 240
 gctgtggacc tggctccgga attcactgag cccagtcctc tctttcctcc acttcctgct 300
 gacgcatggg cgctgggtttt gggaattcat caatgccacc ttcattccgtg acatgctcat 360
 gcgtctggta ctacagcgc gttccaaact tatccccagt cctccacact acaacatagc 420
 gcatgactac atcagctggg agtccttctc caatgtgagc tattacactc gtgttctgcc 480
 ctctgtgccc caagattgcc ccacgcccac ggggacaaa gggagaagc agttgccaga 540
 cgcccaactc ctgggcccgc gcttcctgct caggaggaag ttcatacctg acccccaagg 600
 caccaacctc atgttcgcct tctttgcaca acacttcacc catcagttct tcaaaacttc 660
 tggcaagatg ggtcctggct tcaccaaggc cttgggcccac ggggtagatc ttggccacat 720
 ttatggggac aatctggacc gtcagtatca gctgcggctc tttaaggatg ggaaactcaa 780
 gtatcagggt ctggatggag agatgtaccc gccatctgtg gaggaggcgc ctgtgttgat 840
 gcactaccca cggggcattc tgccccagag tcagatggcc gtgggccaag aagtgtttgg 900
 gctgcttcct gggctcatgc tctatgccac gctctggctg cgtgagcaca atcgtgtgtg 960
 tgacctgctg aaggctgagc accccaactg gggctgatgag caactcttcc agacggcccc 1020
 actcatcctc attggggaga ccatcaagat tgtgattgag gagtatgtgc agcagctgag 1080
 tggctacttc ttgcagctga agttcgaccc ggagctgctg tttagcgccc agttccagta 1140
 ccgcaaccgc atcgccatgg agttcaacca gctgtaccac tggcaccgc tcattgccaga 1200
 ctcttctggt gtgggttccc aggagtacag ctatgagcag ttcctgttca acacctccat 1260

113
HXX

gctgacgcac tacgggatcg aggccctggg ggatgccttc tctcgccaga gcgcccggcg 1320
gattggtgga ggtagaaaca tagaccacca tgtcctgcac gtggctgtgg aaaccatcaa 1380
ggaatcccgc gagttgcggc tgcagccctt caatgagtac cgcaagaggt ttggcatgag 1440
gccctacatg tccttcagg aactcacagg ggagaaggag atggcagccg agttggagga 1500
gctgtatgga gacattgag ccttgggaatt ctaccggggg cttcttctgg agaagtgcc 1560
----- tccaaactcc atcttttgag agagtatgat agaatattggg gctcccttct ccttaaggg 1620
cctcctaggg aatcccatct gttctccaga gtactggaag ccaagcatat tgggtggtga 1680
gatgggcttc aatatggtca agacagccac actgaagaag ctggtctgcc ttaacaccaa 1740
gacttgccc tatgtttcct tccgtgtgcc tgacccccac caggatggcg ggcctggtgt 1800
ggagcggccg tccacagagc tctgaggggg cagagcagca gcattctgga gggtygactt 1860
gtcatcccag aatgctgagg ctgggggttaa taatcccaa tggtgggtct ttggtttgcc 1920
tcaagaatat caaggtcaac atttagaact ttgtgtctct caccattat ctggaatata 1980
atggtcttgt ttgttattct agaatgtga attcctgggt gaccatctag aatggatgga 2040
gtgatgcttc tttggcaagc cagaacactg gttcctggcu qacaacctag aatgtcagac 2100
ttctggttga ctaagacgt aggcattctc taatgtgaag ctctgacag aatcatctag 2160
aaagataggg gattcttatt ttgcattcta gaattctggg cagccctcca gcatgttgat 2220
ttttttcact ggcagttcag aatgttgtgc tcttgattgc tgatccaaa tagtggtggtg 2280
tatgccagat cagtcttgct ctgaatgctt agaatggtaa tttgattcat tttcctgttc 2340
agtgaatac ccccaagca ggagaatcta cagcctaac agagtgcatt gcctgcctct 2400
gtgcctgcc caaggactta gggggcagag tgttcttcct gggatgctga ctcagaccct 2460
ggccaagga gatagaacay gtgggctttt tccaggtcat tggttggagg ccaccagagc 2520
tctgttgcca tctttgtctt gactcatgac agctgtttct catgaacta ataaaatttt 2580
ttttccc 2587

<210> 2
<211> 608
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<223> unsure at all Xaa locations
<400> 2

Met Ser Arg Gly Ser Arg Leu His Arg Trp Pro Leu Leu Leu Xaa Xaa
1 5 10 15

114
H

Leu Leu Xaa Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Pro Val Leu Pro Ala Glu
20 25 30

Xaa Xaa Ala Arg Thr Pro Ala Pro Val Asn Pro Cys Cys Tyr Tyr Pro
35 40 45

Cys Gln His Gln Gly Ile Cys Val Arg Phe Gly Leu Asp Arg Tyr Gln
50 55 60

~~Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly Tyr Ser Gly Pro Asn Cys Thr Ile Pro~~
65 70 75 80

Glu Leu Trp Thr Trp Leu Arg Asn Ser Leu Arg Pro Ser Pro Ser Phe
85 90 95

Leu His Phe Leu Leu Thr His Gly Arg Trp Phe Trp Glu Phe Ile Asn
100 105 110

Ala Thr Phe Ile Arg Asp Met Leu Met Arg Leu Val Leu Thr Ala Arg
115 120 125

Ser Asn Leu Ile Pro Ser Pro Pro Thr Tyr Asn Ile Ala His Asp Tyr
130 135 140

Ile Ser Trp Glu Ser Phe Ser Asn Val Ser Tyr Tyr Thr Arg Val Leu
145 150 155 160

Pro Ser Val Pro Gln Asp Cys Pro Thr Pro Met Gly Thr Lys Gly Lys
165 170 175

Lys Gln Leu Pro Asp Ala Gln Leu Leu Gly Arg Arg Phe Leu Leu Arg
180 185 190

Arg Lys Phe Ile Pro Asp Pro Gln Gly Thr Asn Leu Met Phe Ala Phe
195 200 205

Phe Ala Gln His Phe Thr His Gln Phe Phe Lys Thr Ser Gly Lys Met
210 215 220

Gly Pro Gly Phe Thr Lys Ala Leu Gly His Gly Val Asp Leu Gly His
225 230 235 240

Ile Tyr Gly Asp Asn Leu Asp Arg Gln Tyr Gln Leu Arg Leu Phe Lys
245 250 255

Asp Gly Lys Leu Lys Tyr Gln Val Leu Asp Gly Glu Met Tyr Pro Pro
260 265 270

Ser Val Glu Glu Ala Pro Val Leu Met His Tyr Pro Arg Gly Ile Leu
275 280 285

Pro Gln Ser Gln Met Ala Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Leu Pro
290 295 300

Gly Leu Met Leu Tyr Ala Thr Leu Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val
305 310 315 320

115
X

Cys Asp Leu Leu Lys Ala Glu His Pro Thr Trp Gly Asp Glu Gln Leu
325 330 335

Phe Gln Thr Ala Arg Leu Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val
340 345 350

Ile Glu Glu Tyr Val Gln Gln Leu Ser Gly Tyr Phe Leu Gln Leu Lys
355 360 365

Phe Asp Pro Glu Leu Leu Phe Ser Ala Gln Phe Gln Tyr Arg Asn Arg
370 375 380

Ile Ala Met Glu Phe Asn Gln Leu Tyr His Trp His Pro Leu Met Pro
385 390 395 400

Asp Ser Phe Trp Val Gly Ser Gln Glu Tyr Ser Tyr Glu Gln Phe Leu
405 410 415

Phe Asn Thr Ser Met Leu Thr His Tyr Gly Ile Glu Ala Leu Val Asp
420 425 430

Ala Phe Ser Arg Gln Ser Ala Gly Arg Ile Gly Gly Gly Arg Asn Ile
435 440 445

Asp His His Val Leu His Val Ala Val Glu Thr Ile Lys Glu Ser Arg
450 455 460

Glu Leu Arg Leu Gln Pro Phe Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Gly Met
465 470 475 480

Arg Pro Tyr Met Ser Phe Gln Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala
485 490 495

Ala Glu Leu Glu Glu Leu Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Leu Glu Phe Tyr
500 505 510

Pro Gly Leu Leu Leu Glu Lys Cys His Pro Asn Ser Ile Phe Gly Glu
515 520 525

Ser Met Ile Glu Ile Gly Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Leu Gly
530 535 540

Asn Pro Ile Cys Ser Pro Glu Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly
545 550 555 560

Glu Met Gly Phe Asn Met Val Lys Thr Ala Thr Leu Lys Lys Leu Val
565 570 575

Cys Leu Asn Thr Lys Thr Cys Pro Tyr Val Ser Phe Arg Val Pro Asp
580 585 590

Pro His Gln Asp Gly Gly Pro Gly Val Glu Arg Pro Ser Thr Glu Leu
595 600 605

116
117

<211> 3632
<212> DNA
<213> Canis familiaris

<400> 3

gagcacgctc gggaaactccg cacagcgctt gcttcctcca ggcgcgcagc cccgagccca 60
ggacgggaac gcttcgcgct ccgcctccgc cgcgcgctcc gcttcgcgcg ccgcctccgc 120
ctccgcgcgc gcttcgtcca ccgcccgcgc tccgcgcgcg cccgcgcgcg cgcgcgcgatg 180
ctggcccgcg ccctgggtgt ctgcgcgcgc ctggcggtcg tccgcgcagc aaatccttgc 240
tgttcccacc catgtcaaaa ccaggtatt tgtatgagca caggatttga ccagtataag 300
tgtgactgta cccgaacagg attctacggc gaaaactgct caacaccgga atttctgaca 360
agaataaaat tatacctgaa acccactcca aatacagtac actacatact taccacttcc 420
aagggcgctc ggaacattgt caataacatc cccttcctgc gaaatacaat tatgaaatat 480
gtgttgacat cccggtcaca ttgtattgag agtccaccaa cttataatgt gaactacggc 540
tataaagct ggggaagcctt ttctaacctc tcctattata ccagagctct tccccctgta 600
cctgatgact gtccaacacc catgggtgtg aaaggcaaga aagagcttcc tgattcaaaa 660
gagattgtgg aaaagtttct tctgcaaga aagttcattc ctgatcccca aggcaccaat 720
atgatgtttg cattctttgc ccagcacttt acccatcaat ttttcaagac agatcataag 780
cgaggaccag ctttcaccaa aggattgggc catgggggtg acttaaatca tgtttatggg 840
gaaactttgg atagacaaca taaactgcgc cttttcaagg atggaaaaat gaaatatcag 900
gtaattgatg gagagggtga tcctcctacc gtcaaagata tcagggtcga gatgatctac 960
ccacctcatg ttctgaaca cctgcagttt gctgtgggcc aggaggtctt tgggtctggtg 1020
cctggtctga tgatgtatgc caccatttgg ctgcgggagc ataacagagt gtgtgatgtg 1080
cttaaacagg agcaccaga atgggatgat gagcggttat tccagacgag caggctaata 1140
cttataggag aaaccattaa gattgtgatt gaagactatg tacaacactt gsgtggctat 1200
cacttcaagc tgaagtttga cccagagctg cttttcaacc aacaattcca gtacaaaac 1260
cgcattgctg ctgagtttaa cacactctac cactggcacc ccctcctgcc tgacaccttg 1320
caaatagatg accaggagta caatttcaa cagtttatct acaacaactc tatattattg 1380
gaacatggcc ttaccagtt tgtggaatca ttcagcaggc aaattgctgg cagggttgc 1440
ggtggcagga atgttccagc tgcagtacaa caagtagcaa aagcttcgat tgaccagagc 1500
agacagatga aataccagtc tcttaatgag tatcgcaaac gctttaggct gaagccctat 1560

117
HJ

acatcattcg aagaacttac aggagagaag gaaatggctg cggggttgga ggccctttat 1620
ggatgatattg atgccatgga gctgtatcct gccctcttgg tagaaaagcc tcgtccagat 1680
gccatctttg gtgagaccat ggtagaaatg ggagcaccat tctccttgaa aggacttatg 1740
ggtaatccca tctgttcacc tgactactgg aagcctagca cctttggtgg agaagtaggc 1800
tttaaaatca tcaacactgc ctcaatccag tctctcatct gcaataacgt gaagggctgt 1860
ccattcactg cattctctgt tcaagacgga caactcacca aaacagtcac cattaatgca 1920
agctcttcgc actccggtct agatgacatc aatcccacag tcctactgaa agaacggtca 1980
actgaactat agaagcctgt taatcctatt tatttattta tatggacgat tccttttaac 2040
ttaattattt aatatttatg ttaaaactcct tatgttactt aacatctgtt aaggagaaag 2100
gggtcatact tgtgaagatt ttcatgtcac tattttaaag atgtcttcgg gttaaagagg 2160
aaaacagttt tctgttttat aatgagttt gacatccttt tacttgaatt tcagtttata 2220
ttattattat gaacaaaagc gaagatgttg gatattttaa tgctgttcca ggatgacaaa 2280
atgctgcang tttttttcga cactatcggg atttctagtg tatcttccct ggtgcattag 2340
aagcaactac ctgcacactt tcttttcttc tgtagccac tgtgctggta gaaactctct 2400
tctgatcagt ttactttctt gtttccttga tttttaagat ctgagtatac ctttctttgg 2460
actctgtcta tactttctta cctgaacttg tgtaagtttt caggaaaacc tcaactcagg 2520
actactagta atttagctcc tcttaagagg aatgaaggga aaaaaaac agccotttaa 2580
ggactctata cacaacagta tacacttatt ttaagtgaag ggcagcgatc tttttgtaa 2640
ttaattttta attgtaacag aaggcttcaa tgaggctaat gactgacaaa gaactgtagg 2700
gggttcttga tggaaggag tcgtatttct attaagaaba tcctttctca tttaaaagca 2760
aagtcnaatt ctgaatagtt cccgggaaga taatgtttct tttccacatc tcattgtcag 2820
ctgacatttg ctggtactgt atacttaatt tattgaggat tattatttgt tttgttagga 2880
tgttattata aactagggtt aagctgcaat catttttttt tttttttgca ttatgtgaga 2940
atcagtatat cttctttgag attaactctg aattattatg taacactaa gagaaattat 3000
ttgagatctg tgagtaaat ttcaggaacc caactctggt atattgaat atggcaagtt 3060
ggaattgaaa tatagatttc cctatatacc agcccacaga gaacactgtg tctcattaac 3120
ctgcatgtac cataagatct ttacagtttt gagggaccta tggatccttc attaatcat 3180
tcagctataa cttattgagg acacaggtgc aatatcact gtgggtttta atattttttg 3240



tggattctaa tttttttaa tcatgcactg attacagata acatcagtat ttgtaaatga 3300
 gaaagcatgt ctttaggtag agaagaaaa tgaattttta ttaaaggaaa taactcaggg 3360
 gaatttttaa gattttatgt ttaaaaagtt aagaatagt caatattaga agggcttatg 3420
 taaaaacctt ttttaacttca ctgaagaaa ttttggtatt aatatcaatg ccgactgaat 3480
 tcggagtata atatatgaat gttttggtgc ctgagacaaa tgtgtattta aattaactta 3540
 --tgtaagatgt aagtggtacc aaatgcctgt ttatttttat actatctaag aatgaaaaat 3600
 ctcttctaaa ataaattttt gcctgtttcc at 3632

<210> 4
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 4

Met Leu Ala Arg Ala Leu Val Leu Cys Ala Ala Leu Ala Val Val Arg
1 5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser His Pro Cys Gln Asn Gln Gly Ile Cys
20 25 30

Met Ser Thr Gly Phe Asp Gln Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
35 40 45

Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Ser Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
50 55 60

Leu Tyr Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Asn Ile Pro Phe Leu Arg Asn
85 90 95

Thr Ile Met Lys Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Leu Ile Glu Ser
100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Val Asn Tyr Gly Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe
115 120 125

Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Pro Asp Asp
130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Lys Lys Glu Leu Pro Asp Ser
145 150 155 160

Lys Glu Ile Val Glu Lys Phe Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
180 185 190

119
128

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp His Lys Arg Gly Pro Ala Phe Thr Lys
195 200 205

Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Val Tyr Gly Glu Thr Leu
210 215 220

Asp Arg Gln His Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr
225 230 235 240

~~Gln Val Ile Asp Gly Glu Val Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln~~
245 250 255

Val Glu Met Ile Tyr Pro Pro His Val Pro Glu His Leu Gln Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln
290 295 300

Glu His Pro Glu Trp Asp Asp Glu Arg Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Leu Gln Ile Asp
370 375 380

Asp Gln Glu Tyr Asn Phe Gln Gln Phe Ile Tyr Asn Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400

Leu Glu His Gly Leu Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Ser Arg Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Ala Ala Val Gln Gln
420 425 430

Val Ala Lys Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Gln Met Lys Tyr Gln Ser
435 440 445

Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Arg Leu Lys Pro Tyr Thr Ser Phe
450 455 460

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Met Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

120
1/8

Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Met Gly
500 505 510

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro
515 520 525

Asp Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Lys Ile
530 535 540

Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

Cys Pro Phe Thr Ala Phe Ser Val Gln Asp Gly Gln Leu Thr Lys Thr
565 570 575

Val Thr Ile Asn Ala Ser Ser Ser His Ser Gly Leu Asp Asp Ile Asn
580 585 590

Pro Thr Val Leu Leu Lys Glu Arg Ser Thr Glu Leu
595 600

<210> 5
<211> 2554
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5

gcgccatgag ccggagtctc ttgctccggt tcttgetgtt cctgctcctg ctcccgcgc 60

tccccgtcct gctcgcggac ccaggggagc ccacgccagt gaatccctgt tgttactatc 120

catgccagca ccagggcatc tgtgtccgct tcggccttga ccgctaccag tgtgactgca 180

cccgacggg ctattccggc cccaactgca ccacccctgg cctgtggacc tggctccgga 240

attcactgag gccagcccc tctttaccc attcctgct cactcacggg cgctggttct 300

gggagtttgt caatgccacc ttcacccgag agatgctcat gcgcctggta ctacacagtgc 360

gtcccaacct tatccccagt cccccacct acaactcagc acatgactac atcagctggg 420

agtctttctc caacgtgagc tattacactc gtattctgcc ctctgtgcct aaagattgcc 480

ccacacccat gggaaccaaa gggaagaagc agttgccaga tgcccagctc ctggcccgcc 540

gcttctctgct caggaggsag ttcatacctg aaaaaagg caccaacctc atgtttgcct 600

tctttgcaca acattcacc caccagttct tcaaaacttc tggcaagatg ggtcctggct 660

tcaccaaggc cttgggcat ggggtagacc tcggccacat ttatggagac aatctggagc 720

gtcagtatca actgcggctc ttttaggatg ggaaactcaa gtaccaggtg ctggatggag 780

aatgtaccc gcctcggta gaagaggcgc ctgtgttgat gcactacccc cgaggcatcc 840

121
121

cgccccagag ccagatggct gtggggcagg aggtggttgg gctgcttcct gggctcatgc 900
tgtatgccac gctctggcta cgtgagcaca accgtgtgtg tgacctgctg aaggctgagc 960
acccccacctg gggcgatgag cagcttttcc agacgacctg cctcatcttc ataggggaga 1020
ccatcaagat tgtcatcgag gagtacgtgc agcagctgag tggctatttc ctgcagctga 1080
aatttgaccc agagctgctg ttcggtgtcc agttccaata ccgcaaccgc attgccatgg 1140
agttcaacca tctctaccac tggcaccccc tcatgcctga ctcttcaag gtgggctccc 1200
aggagtacag ctacgagcag ttcttgttca acacctccat gllgggtggac tatgggggtg 1260
aggccctggg ggatgccttc tctcgccaga ttgctggccg gatcggtggg ggcaggaaca 1320
tggaccacca catcctgcat gtggctgtgg atgtcatcag ggagtctcgg gagatgcggc 1380
tgcagccctt caatgagtac cgcaagaggt ttggcatgaa accctacacc tccttcagg 1440
agctcgtagg agagaaggag atggcagcag agttggagga attgtatgga gacattgatg 1500
cgttggagtt ctacctgga ctgcttcttg aaaagtgcc a tccaaactct atctttgggg 1560
agagtatgat agagattggg gctccctttt cctcaaggg tctcctaggg aatcccatct 1620
gttctccgga gtactggaag ccgagcacat ttggcggcga ggtgggcttt aacattgtca 1680
agacggccac actgaagaag ctggtctgcc tcaacaccaa gacctgtccc tacgtttcct 1740
tccgtgtgcc ggatgccagt caggatgatg ggcctgctgt ggagcgacca tccacagagc 1800
tctgagggggc aggaangcag cattctggag gggagagctt tgtgcttgtc attccagagt 1860
gctgaggcca gggctgatgg tcttaaatgc tcattttctg gtttggcatg gtgagtgttg 1920
gggttgacat ttagaacttt aagtctcacc cattatctgg aatattgtga ttctgtttat 1980
tcttcagaa tgctgaactc cttgttagcc cttcagattg ttaggagtgg ttctcatttg 2040
gtctgccaga atactgggtt cttagttgac aacctagaat gtcagatttc tgggtgattt 2100
gtaacacagt cattctagga tgtggagcta ctgatgaat ctgctagaaa gttagggggg 2160
tcttattttg cattccagaa tcttgacttt ctgattgggtg attcaaagtg ttgtgttccc 2220
tggctgatga tccagAACag tggctcgtat cccaaatctg tcagcatctg gctgtctaga 2280
atgtggattt gattcatttt cctgttcagt gagatatcat agagacggag atcctaagg 2340
ccaacaagaa tgcattccct gaatctgtgc ctgcactgag agggcaagga agtgggggtg 2400
tcttcttggg accccacta agacctgggt ctgaggatgt agagagaaca ggtgggctgt 2460
attcacgcca ttgggtggaa gctaccagag ctctatcccc atccaggctct tgactcatgg 2520

122
122

cagctgtttc tcatgaagct aataaaattc gcc

2554

<210> 6
<211> 608
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<223> unsure at all Xaa locations
<400> 6

Met	Ser	Arg	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Leu	Leu	Arg	Phe
1				5						10				15	
Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Ala	Asp
			20					25						30	
Pro	Gly	Ala	Pro	Thr	Xaa	Xaa	Pro	Val	Asn	Pro	Cys	Cys	Tyr	Tyr	Pro
		35					40					45			
Cys	Gln	His	Gln	Gly	Ile	Cys	Val	Arg	Phe	Gly	Leu	Asp	Arg	Tyr	Gln
	50					55					60				
Cys	Asp	Cys	Thr	Arg	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gly	Pro	Asn	Cys	Thr	Ile	Pro
65					70					75					80
Gly	Leu	Trp	Thr	Trp	Leu	Arg	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	Pro	Ser	Phe
				85					90						95
Thr	His	Phe	Leu	Leu	Thr	His	Gly	Arg	Trp	Phe	Trp	Glu	Phe	Val	Asn
			100					105						110	
Ala	Thr	Phe	Ile	Arg	Glu	Met	Arg	Met	Arg	Leu	Val	Leu	Thr	Val	Arg
		115					120					125			
Ser	Asn	Leu	Ile	Pro	Ser	Pro	Pro	Thr	Tyr	Asn	Ser	Ala	His	Asp	Tyr
		130				135					140				
Ile	Ser	Trp	Glu	Ser	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Tyr	Tyr	Thr	Arg	Ile	Leu
145					150					155					160
Pro	Ser	Val	Pro	Lys	Asp	Cys	Pro	Thr	Pro	Met	Gly	Thr	Lys	Gly	Lys
				165					170					175	
Lys	Gln	Leu	Pro	Asp	Ala	Gln	Leu	Leu	Ala	Arg	Arg	Phe	Leu	Leu	Arg
			180					185					190		
Arg	Lys	Phe	Ile	Pro	Asp	Pro	Gln	Gly	Thr	Asn	Leu	Met	Phe	Ala	Phe
		195					200					205			
Phe	Ala	Gln	His	Phe	Thr	His	Gln	Phe	Phe	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Met
	210					215					220				
Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Lys	Ala	Leu	Gly	His	Gly	Val	Asp	Leu	Gly	His
225					230					235					240
Ile	Tyr	Gly	Asp	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Tyr	Gln	Leu	Arg	Leu	Phe	Lys

123
174

	245		250		255
Asp Gly Lys	Leu Lys Tyr Gln Val	Leu Asp Gly Glu Met Tyr	Pro Pro		
260		265	270		
Ser Val Glu Glu Ala Pro Val	Leu Met His Tyr Pro Arg Gly Ile Pro				
275	280	285			
Pro Gln Ser Gln Met Ala Val	Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Leu Pro				
290	295	300			
Gly Leu Met Leu Tyr Ala Thr	Leu Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val				
305	310	315	320		
Cys Asp Leu Leu Lys Ala Glu His	Pro Thr Trp Gly Asp Glu Gln Leu				
325	330	335			
Phe Gln Thr Thr Arg Leu Ile Leu Ile	Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val				
340	345	350			
Ile Glu Glu Tyr Val Gln Gln Leu Ser	Gly Tyr Phe Leu Gln Leu Lys				
355	360	365			
Phe Asp Pro Glu Leu Leu Phe Gly Val	Gln Phe Gln Tyr Arg Asn Arg				
370	375	380			
Ile Ala Met Glu Phe Asn His Leu Tyr His	Trp His Pro Leu Met Pro				
385	390	395	400		
Asp Ser Phe Lys Val Gly Ser Gln Glu Tyr	Ser Tyr Glu Gln Phe Leu				
405	410	415			
Phe Asn Thr Ser Met Leu Val Asp Tyr	Gly Val Glu Ala Leu Val Asp				
420	425	430			
Ala Phe Ser Arg Gln Ile Ala Gly Arg Ile	Gly Gly Gly Arg Asn Met				
435	440	445			
Asp His His Ile Leu His Val Ala Val Asp	Val Ile Arg Glu Ser Arg				
450	455	460			
Glu Met Arg Leu Gln Pro Phe Asn Glu Tyr	Arg Lys Arg Phe Gly Met				
465	470	475	480		
Lys Pro Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Leu Val	Gly Glu Lys Glu Met Ala				
485	490	495			
Ala Glu Leu Glu Glu Leu Tyr Gly Asp Ile	Asp Ala Leu Glu Phe Tyr				
500	505	510			
Pro Gly Leu Leu Leu Glu Lys Cys His	Pro Asn Ser Ile Phe Gly Glu				
515	520	525			
Ser Met Ile Glu Ile Gly Ala Pro Phe Ser	Leu Lys Gly Leu Leu Gly				
530	535	540			
Asn Pro Ile Cys Ser Pro Glu Tyr Trp Lys	Pro Ser Thr Phe Gly Gly				

1241
10/3

545	550	555	560
Glu Val Gly Phe Asn Ile Val Lys Thr Ala Thr Leu Lys Lys Leu Val			
	565	570	575
Cys Leu Asn Thr Lys Thr Cys Pro Tyr Val Ser Phe Arg Val Pro Asp			
	580	585	590
Ala Ser Gln Asp Asp Gly Pro Ala Val Glu Arg Pro Ser Thr Glu Leu			
	595	600	605

<210> 7
 <211> 3387
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

```

gtccaggaac tcctcagcag cgcctccttc agctccacag ccagacgccc tcagacagca. 60
aagcctaccc ccgcgccgcg ccctgcccgc cgtgcgatg ctgcgccgcg ccctgctgct 120
gtgcgcggtc ctggcgctca gccatacagc aaatccttgc tgttcccacc catgtcaaaa 180
ccgaggtgta tgtatgagtg tgggatttga ccagtataag tgcgattgta cccggacagg 240
attctatgga gaaaactgct caacaccgga atttttgaca agaataaaat tatttctgaa 300
accactcca aacacagtgc actacatact taccaccttc aagggatttt ggaacgttgt 360
gaataacatt cccttccttc gaaatgcaat tatgagttat gtgttgacat ccagatcaca 420
tttgattgac agtccaccaa cttacaatgc tgactatggc tacaaaagct ggaagcctt 480
ctctaacctc tcctattata ctagagccct tcctcctgtg cctgatgatt gcccgactcc 540
cttgggtgtc aaaggtaaaa agcagcttcc tgattcaaat gagattgtgg gaaaattgct 600
tctaagaaga aagttcatcc ctgatcccca gggctcaaac atgatgtttg cattctttgc 660
ccagcacttc acgcatcagt ttttcaagac agatcataag cgagggccag ctttcaccaa 720
cgggctgggc catggggtgg acttaaatca tatttacggt gaaactctgg ctgacagcg 780
taactgcgc cttttcaagg atggaaaaat gaaatatcag ataattgatg gagagatgta 840
tcctcccaca gtcaagata ctcaggcaga gatgatctac cctcctcag tcctgagca 900
tctacggttt gctgtggggc aggaggtctt tggctcgttg cctgggtctga tgatgtatgc 960
cacaatctgg ctgaggggaa acaacagagt atgcgatgtg cttaaacagg agcatcctga 1020
atggggtgat gagcagttgt tccagacaag caggctaata ctgataggag agactattaa 1080
gattgtgatt gaagattatg tgcaaacactt gagtggctat cacttcaaac tgaatttga 1140
  
```

[illegible]

126
 128

ttaaactttt tgaagcaaac ttttttttag ccttgtgcac tgcagacctg gtactcagat 2940
 tttgctatga ggtaaatgaa gtaccaagct gtgcttgaat aacgatatgt tttctcagat 3000
 tttetgttgt acagttdat ttagcagtec ataccacatt gcaaaagtag caatgacctc 3060
 ataaaatacc tcttcaaat gcttsaatc atttcacaca ttaattttat ctcagtcttg 3120
 aagccaattc agtaggtgca ttggaatcaa gcctggctac ctgcatgctg ttccttttct 3180
 tttcttcttt tagccatttt gctaagagac acagtcttct caaacacttc gtttctccta 3240
 ttttgtttta ctagttttaa gatcagagtt cactttcttt ggactctgcc tatattttct 3300
 tacctgaact tttgcaagtt ttgaggtaaa cctcagctca ggactgctat ttagctcctc 3360
 ttaagaagat taaaaaaaa aaaaaag 3387

<210> 8
 <211> 604
 <212> PRT.
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

127
198

Asn Glu Ile Val Glu Lys Leu Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
165 170 175

Pro Gln Gly Ser Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp His Lys Arg Gly Pro Ala Phe Thr Asn
195 200 205

Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu
210 215 220

Ala Arg Gln Arg Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr
225 230 235 240

Gln Ile Ile Asp Gly Glu Met Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln
245 250 255

Ala Glu Met Ile Tyr Pro Pro Gln Val Pro Glu His Leu Arg Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln
290 295 300

Glu His Pro Glu Trp Gly Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Lys Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Gln Ile His
370 375 380

Asp Gln Lys Tyr Asn Tyr Gln Gln Phe Ile Tyr Asn Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400

Leu Glu His Gly Ile Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Thr Arg Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Pro Ala Val Gln Lys
420 425 430

Val Ser Gln Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Gln Met Lys Tyr Gln Ser
435 440 445

Phe Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Met Leu Lys Pro Tyr Glu Ser Phe
450 455 460

128
128

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ser Ala Glu Leu Glu Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Val Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Val Gly
500 505 510

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Val Ile Cys Ser Pro
515 520 525

Ala Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Gln Ile
530 535 540

Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

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

Val Thr Ile Asn Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly Leu Asp Asp Ile Asn
580 585 590

Pro Thr Val Leu Leu Lys Glu Arg Ser Thr Glu Leu
595 600

<210> 9
<211> 604
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

Met Leu Phe Arg Ala Val Leu Leu Cys Ala Ala Leu Gly Leu Ser Gln
1 5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser Asn Pro Cys Gln Asn Arg Gly Glu Cys
20 25 30

Met Ser Thr Gly Phe Asp Gln Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
35 40 45

Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Thr Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
50 55 60

Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Asn Ile Pro Phe Leu Arg Ser
85 90 95

Leu Thr Met Lys Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser Tyr Leu Ile Asp Ser
100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Val His Tyr Gly Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe

129
D
15

115	120	125
Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Asp Asp		
130	135	140
Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Asn Lys Glu Leu Pro Asp Ser		
145	150	155 160
Lys Glu Val Leu Glu Lys Val Leu Leu Arg Arg Glu Phe Ile Pro Asp		
	165	170 175
Pro Gln Gly Ser Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr		
	180	185 190
His Gln Phe Phe Lys Thr Asp His Lys Arg Gly Pro Gly Phe Thr Arg		
	195	200 205
Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu		
	210	215 220
Asp Arg Gln His Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Leu Lys Tyr		
	225	230 235 240
Gln Val Ile Gly Gly Glu Val Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln		
	245	250 255
Val Glu Met Ile Tyr Pro Pro His Ile Pro Glu Asn Leu Gln Phe Ala		
	260	265 270
Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala		
	275	280 285
Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Ile Leu Lys Gln		
	290	295 300
Glu His Pro Glu Trp Gly Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu		
	305	310 315 320
Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Clu Asp Tyr Val Gln		
	325	330 335
His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu		
	340	345 350
Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ser Glu Phe Asn		
	355	360 365
Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Asn Ile Glu		
	370	375 380
Asp Gln Glu Tyr Ser Phe Lys Gln Phe Leu Tyr Asn Asn Ser Ile Leu		
	385	390 395 400
Leu Glu His Gly Leu Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Thr Arg Gln Ile		
	405	410 415
Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Ile Ala Val Gln Ala		

130
13X

420	425	430
Val Ala Lys Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Glu Met Lys Tyr Gln Ser		
435	440	445
Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Ser Leu Lys Pro Tyr Thr Ser Phe		
450	455	460
Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Glu Leu Lys Ala Leu		
465	470	475
Tyr Ser Asp Ile Asp Val Met Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu		
485	490	495
Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Leu Gly		
500	505	510
Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro		
515	520	525
Gln Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Lys Ile		
530	535	540
Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly		
545	550	555
Cys Pro Phe Thr Ser Phe Asn Val Gln Asp Pro Gln Pro Thr Lys Thr		
565	570	575
Ala Thr Ile Asn Ala Ser Ala Ser His Ser Arg Leu Asp Asp Ile Asn		
580	585	590
Pro Thr Val Leu Ile Lys Arg Arg Ser Thr Glu Leu		
595	600	

<210>	10
<211>	604
<212>	PRT
<213>	Rattus norvegicus

<400>	10
-------	----

Met Leu Phe Arg Ala Val Leu Leu Cys Ala Ala Leu Ala Leu Ser His	
1	15
Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser Asn Pro Cys Gln Asn Arg Gly Glu Cys	
20	30
Met Ser Ile Gly Phe Asp Gln Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly	
35	45
Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Thr Thr Pro Glu Ile Leu Thr Arg Ile Lys	
50	60
Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His	
65	80

131
132

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Asn Ile Pro Phe Leu Arg Asn
85 90 95

Ser Ile Met Arg Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Leu Ile Asp Ser
100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Val His Tyr Gly Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe
115 120 125

~~Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Asp Asp~~
130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Asn Lys Glu Leu Pro Asp Ser
145 150 155 160

Lys Glu Val Leu Glu Lys Val Leu Leu Arg Arg Glu Phe Ile Pro Asp
165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp Gln Lys Arg Gly Pro Gly Phe Thr Arg
195 200 205

Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Val Tyr Gly Glu Thr Leu
210 215 220

Asp Arg Gln His Lys Leu Arg Leu Phe Gln Asp Gly Lys Leu Lys Tyr
225 230 235 240

Gln Val Ile Gly Gly Glu Val Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln
245 250 255

Val Asp Met Ile Tyr Pro Pro His Val Pro Glu His Leu Arg Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Ile Leu Lys Gln
290 295 300

Glu His Pro Glu Trp Asp Asp Glu Arg Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ser Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Asn Ile Glu
370 375 380

132
137

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

Leu Glu His Gly Leu Ala His Phe Val Glu Ser Phe Thr Arg Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Ile Ala Val Gln Ala
420 425 430

~~Val Ala Lys Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Glu Met Lys Tyr Gln Ser~~
435 440 445

Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Ser Leu Lys Pro Tyr Thr Ser Phe
450 455 460

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Glu Leu Lys Ala Leu
465 470 475 480

Tyr His Asp Ile Asp Ala Met Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Leu Gly
500 505 510

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro
515 520 525

Gln Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Arg Ile
530 535 540

Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

Cys Pro Phe Ala Ser Phe Asn Val Gln Asp Pro Gln Pro Thr Lys Thr
565 570 575

Ala Thr Ile Asn Ala Ser Ala Ser His Ser Arg Leu Asp Asp Ile Asn
580 585 590

Pro Thr Val Leu Ile Lys Arg Arg Ser Thr Glu Leu
595 600

<210> 11
<211> 604
<212> PRT
<213> Cavia porcellus

<400> 11

Met Leu Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Ala Ala Leu Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser Asn Pro Cys Gln Asn Arg Gly Glu Cys
20 25 30

133

Leu Ser Val Gly Phe Asp Arg Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
35 40 45

Tyr Tyr Gly Glu Asn Cys Thr Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
50 55 60

Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Asn Ile Pro Phe Leu Arg Asn
85 90 95

Ala Ile Met Ile Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Leu Ile Asp Ser
100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Ala His Tyr Gly Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe
115 120 125

Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Asp Asp
130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Lys Lys Gln Leu Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asn Glu Val Leu Glu Lys Val Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Ser Asp Gln Lys Arg Gly Pro Ala Phe Thr Thr
195 200 205

Gly Leu Ala His Gly Val Asp Leu Ser His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu
210 215 220

Asp Arg Gln His Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr
225 230 235 240

Gln Ile Ile Asp Gly Glu Met Tyr Pro Pro Thr Val Lys Glu Thr Gln
245 250 255

Val Glu Met Met Tyr Pro Pro Tyr Ile Pro Glu His Ala Arg Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln
290 295 300

Glu His Pro Glu Trp Asp Asp Glu Arg Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

134
13

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ser Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Gln Ile Asp
370 375 380

Asp Gln Val Tyr Asn Phe Gln Gln Phe Leu Tyr Asn Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400

Val Glu His Gly Leu Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Thr Lys Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Leu Ala Val Gln Arg
420 425 430

Val Ala Lys Ala Ser Ile Glu His Ser Arg Lys Met Lys Tyr Gln Ser
435 440 445

Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Leu Met Lys Pro Tyr Thr Ser Phe
450 455 460

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Met Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Met Gly
500 505 510

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro
515 520 525

His Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Gln Ile
530 535 540

Val Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

Cys Pro Val Thr Ala Phe Asn Leu Pro Asp Pro Gln Leu Ala Lys Thr
565 570 575

Val Thr Ile Asn Ala Ser Ala Ser His Ser Arg Leu Glu Asp Leu Ser
580 585 590

Pro Thr Val Leu Leu Lys Gly Arg Ser Thr Glu Leu
595 600

<210> 12
<211> 604
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

135
178

<400> 12

Met Leu Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Ala Ala Val Ala Leu Ser His
1 .5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser Asn Pro Cys Gln Asn Arg Gly Val Cys
20 25 30

Met Thr Met Gly Phe Asp Gln Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
35 40 45

Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Ser Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
50 55 60

Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Asp Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Ser Ile Pro Phe Leu Arg Asn
85 90 95

Ser Ile Met Lys Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Met Ile Asp Ser
100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Val His Tyr Asn Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe
115 120 125

Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Asp Asp
130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Lys Lys Glu Leu Pro Asp Ser
145 150 155 160

Lys Asp Val Val Glu Lys Leu Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp Leu Lys Arg Gly Pro Ala Phe Thr Lys
195 200 205

Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu
210 215 220

Asp Arg Gln His Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr
225 230 235 240

Gln Val Ile Asp Gly Glu Val Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln
245 250 255

Val Glu Met Ile Tyr Pro Pro His Ile Pro Ala His Leu Gln Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln

136
X
13

290		295		300
Glu His Pro Glu Trp Asp Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu				
305		310		315 320
Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln				
		325		330 335
His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu				
		340		345 350
Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn				
		355		360 365
Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Gln Ile Asp				
		370		375 380
Asp Gln Gln Tyr Asn Tyr Gln Gln Phe Leu Tyr Asn Asn Ser Ile Leu				
		385		390 395 400
Leu Glu His Gly Leu Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Thr Arg Gln Ile				
		405		410 415
Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Pro Ala Val Gln Lys				
		420		425 430
Val Ala Lys Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Gln Met Lys Tyr Gln Ser				
		435		440 445
Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Leu Leu Lys Pro Tyr Glu Ser Phe				
		450		455 460
Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Glu Leu Glu Ala Leu				
		465		470 475 480
Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Val Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu				
		485		490 495
Arg Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Ser Met Val Glu Met Gly				
		500		505 510
Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro				
		515		520 525
Asn Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Lys Ile				
		530		535 540
Val Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly				
		545		550 555 560
Cys Pro Phe Thr Ser Phe Asn Val Pro Asp Pro Gln Leu Thr Lys Thr				
		565		570 575
Val Thr Ile Asn Ala Ser Ala Ser His Ser Arg Leu Glu Asp Ile Asn				
		580		585 590
Pro Thr Val Leu Leu Lys Gly Arg Ser Thr Glu Leu				

137

138

595

600

<210> 13
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 13

Met. Leu. Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Val Ala Leu Ala Leu Gly His
 1 5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser Asn Pro Cys Gln Asn Arg Gly Val Cys
 20 25 30

Met Ser Val Gly Phe Asp Gln Tyr Gln Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
 35 40 45

Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Ser Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
 50 55 60

Leu Phe Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
 65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Ser Phe Pro Phe Leu Arg Asn
 85 90 95

Ala Val Met Lys Tyr Val Leu Val Ser Arg Ser His Leu Ile Glu Ser
 100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Ala Gln Tyr Gly Tyr Lys Ser Trp Glu Ser Phe
 115 120 125

Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Asp Gly
 130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Lys Lys Glu Leu Pro Asp Ser
 145 150 155 160

Lys Glu Ile Val Glu Lys Phe Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
 165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
 180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp Pro Lys Arg Gly Pro Ala Phe Thr Lys
 195 200 205

Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Ser His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu
 210 215 220

Asp Arg Gln His Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr
 225 230 235 240

Gln Ile Ile Asn Gly Glu Val Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln
 245 250 255

Val Glu Met Ile Tyr Pro Pro His Ile Pro Glu His Leu Arg Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln
290 295 300

~~Glu His Pro Glu Trp Asp Asp Glu Arg Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu~~
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Gln Ile Asp
370 375 380

Asp Gln Glu Tyr Asn Phe Gln Gln Phe Leu Tyr Asn Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400

Leu Glu His Gly Leu Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Ser Arg Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Ala Ala Ala Gln Lys
420 425 430

Ile Ala Lys Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Glu Met Lys Tyr Gln Ser
435 440 445

Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Arg Leu Thr Pro Tyr Lys Ser Phe
450 455 460

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Glu Leu Glu Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Met Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Leu Gly
500 505 510

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Leu Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro
515 520 525

Asp Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Lys Ile
530 535 540

Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

139
~~140~~

Cys Pro Phe Thr Ala Phe Ser Val Gln Asp Pro Gln Leu Ser Lys Ala
 565 570 575

Val Thr Ile Asn Ala Ser Ala Ser His Ser Gly Leu Asp Asp Val Asn
 580 585 590

Pro Thr Val Leu Leu Lys Glu Arg Ser Thr Glu Leu
 595 600

<210> 14
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<223> unsure at all Xaa locations
 <400> 14

Met Leu Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Ala Ala Val Val Cys Gly Xaa
 1 5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser His Pro Cys Gln Asn Arg Gly Val Cys
 20 25 30

Met Ser Val Gly Phe Asp Gln Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
 35 40 45

Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Thr Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
 50 55 60

Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Asp Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
 65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Val Asn Lys Ile Ser Phe Leu Arg Asn
 85 90 95

Met Ile Met Arg Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Leu Ile Glu Ser
 100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Val His Tyr Ser Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe
 115 120 125

Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Pro Asp Asp
 130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Arg Lys Glu Leu Pro Asp Ser
 145 150 155 160

Lys Glu Val Val Lys Lys Val Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
 165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Leu Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
 180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp Ile Glu Arg Gly Pro Ala Phe Thr Lys
 195 200 205

144

Gly Lys Asn His Gly Val Asp Leu Ser His Val Tyr Gly Glu Ser Leu
210 215 220

Glu Arg Gln His Asn Arg Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr
225 230 235 240

Gln Met Ile Asn Gly Glu Met Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln
245 250 255

Val Glu Met Ile Tyr Pro Pro His Ile Pro Glu His Leu Lys Phe Ala
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln
290 295 300

Glu His Pro Glu Trp Gly Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Gln Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Val Phe Gln Ile Asp
370 375 380

Gly Gln Glu Tyr Asn Tyr Gln Gln Phe Ile Tyr Asn Asn Ser Val Leu
385 390 395 400

Leu Glu His Gly Val Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Thr Arg Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Arg Arg Asn Leu Pro Ala Ala Val Glu Lys
420 425 430

Val Ser Lys Ala Ser Leu Asp Gln Ser Arg Glu Met Lys Tyr Gln Ser
435 440 445

Phe Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Leu Leu Lys Pro Tyr Glu Ser Phe
450 455 460

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ala Ala Glu Leu Glu Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Met Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

Lys Pro Ala Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Ala Gly
500 505 510

141
142

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Pro Ile Cys Ser Pro
515 520 525

Glu Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Lys Ile
530 535 540

Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Ser Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

Cys Pro Phe Thr Ser Phe Ser Val Gln Asp Ala His Leu Thr Lys Thr
565 570 575

Val Thr Ile Asn Ala Ser Ser Ser His Ser Gly Leu Asp Asp Ile Asn
580 585 590

Pro Thr Val Leu Leu Lys Glu Arg Ser Thr Glu Leu
595 600

<210> 15
<211> 604
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<223> unsure at all Xaa locations
<400> 15

Met Leu Leu Pro Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Gly His
1 5 10 15

Ala Ala Asn Pro Cys Cys Ser Leu Pro Cys Gln Asn Arg Gly Val Cys
20 25 30

Met Thr Thr Gly Phe Asp Arg Tyr Glu Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
35 40 45

Tyr Tyr Gly Glu Asn Cys Thr Thr Pro Glu Phe Phe Thr Trp Leu Lys
50 55 60

Leu Ile Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His
65 70 75 80

Phe Lys Gly Val Trp Asn Ile Ile Asn Asn Ile Ser Phe Leu Arg Asp
85 90 95

Thr Ile Met Arg Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Leu Ile Asp Ser
100 105 110

Pro Pro Thr Tyr Asn Ser Asp Tyr Ser Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Tyr
115 120 125

Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ser Leu Pro Pro Val Gly His Asp
130 135 140

Cys Pro Thr Pro Met Gly Val Lys Gly Lys Lys Glu Leu Pro Asp Ser
145 150 155 160

142
145

Lys Leu Ile Val Glu Lys Phe Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp
165 170 175

Pro Gln Gly Thr Asn Val Met Phe Thr Phe Phe Ala Gln His Phe Thr
180 185 190

His Gln Phe Phe Lys Thr Asp His Lys Lys Gly Pro Gly Phe Thr Lys
195 200 205

Ala Tyr Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu
210 215 220

Glu Arg Gln Leu Lys Leu Arg Leu Arg Lys Asp Gly Lys Leu Lys Tyr
225 230 235 240

Gln Met Ile Asp Gly Glu Met Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln
245 250 255

Ala Glu Met Ile Tyr Pro Pro His Val Pro Glu His Leu Gln Phe Ser
260 265 270

Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala
275 280 285

Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln
290 295 300

Glu His Pro Glu Trp Asp Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Thr Arg Leu
305 310 315 320

Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln
325 330 335

His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu
340 345 350

Phe Asn Gln Arg Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn
355 360 365

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Gln Ile His
370 375 380

Asn Gln Glu Tyr Thr Phe Gln Gln Phe Leu Tyr Asn Asn Ser Ile Met
385 390 395 400

Leu Glu His Gly Leu Ser His Met Val Lys Ser Phe Ser Lys Gln Ser
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Lys Asn Val Pro Ala Ala Val Gln Lys
420 425 430

Val Ala Lys Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Gln Met Arg Tyr Gln Ser
435 440 445

Leu Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Met Leu Lys Pro Phe Lys Ser Phe
450 455 460



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción 17 []
- Reivindicaciones 85 []
- Resumen 2 []
- Comprobante de Pago 3 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Indicaciones : 00039236
Fecha (UTC): 2003-08-06 17:19:55
Fecha: 02 AGOSTO 2003
Tramite : 002 PATENTES E : REGISTRO A:1 PRESENTAC
Expediente: 2300 DIVISION: E: LEY 24 DE 1995

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-59230.

Fecha: 9 de Mayo del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 14 de Noviembre de 1972,
del folio 1034 al folio 1041 del
libro de Protocolo N^o 05, obra el poder
N^o 226 conferido por G.D. SEARLE &
CO.

_____ domiciliado(a)
en CHICAGO, ILLINOIS, U.S.A.

_____ al doctor
RAMIRO CASTRO DUQUE Y/O RAFAEL BERNAL
SALAMANCA

Representante en Santafé de Bogotá D.C. El
mismo

Facultad para desistir Si.

Revisado 202022.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-59230

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 9 de Agosto del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

202022

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.**

Radicación No. 00-59230

Concepto Técnico No. 1749

Clasificación Internacional de Patentes: C12N 9/00, C12N 15/52, A61K 38/43.

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c)
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980)
- SI ☐ NO ☒ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Artc 14-c junto con el literal b) del 1rt. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA.**

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

1. Las reivindicaciones 14, 15, 29 y 30 no son claras, ellas no definen de manera precisa el objeto de la invención y por ende no cumple con el literal d) del artículo 13 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena donde se indica que: "Las solicitudes para obtener patentes de invención deberán presentarse ante la oficina nacional competente y deberán contener: Una o más reivindicaciones que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente". Es un hecho que un antígeno, en este caso un polipéptido determinado, puede unirse o enlazarse específicamente a más de un anticuerpo, por consiguiente, decir que el anticuerpo que se desea proteger es aquel que se une de manera específica a la proteína... no es suficiente información para establecer de manera precisa cual es el objeto para el que el solicitante desea protección. Siendo que un anticuerpo es una proteína, se requiere que para lograr establecer de forma exacta cual es el objeto de la invención que dicho anticuerpo sea definido en función de la secuencia de aminoácidos que constituyen dicha proteína o del número de depósito mediante el cual se puede acceder a dicho anticuerpo, de lo contrario se requiere que se eliminen las reivindicaciones que hagan mención del anticuerpo pues sin los datos mencionados ellas no precisan el objeto de la invención.

2. **Las reivindicaciones 1 a 15 no tienen unidad de invención con relación a las reivindicaciones 16 a 67. Aún cuando es claro que el objeto de todas las reivindicaciones es una enzima ciclooxigenasa, la enzima COX-1 reclamada en las primeras 15 reivindicaciones es completamente diferente y tiene una secuencia de aminoácidos distinta a la ciclooxigenasa COX-2 que se reivindica a partir de la cláusula 16. Sirvase modificar la solicitud para que cumpla con el requisito establecido en el artículo 15 de la Decisión 344 "La patente sólo podrá comprender una invención o grupo de invenciones relacionadas entre sí, de tal manera que conformen un único concepto inventivo".**

EXAMINADOR TÉCNICO: 202018.

Bogotá, D.C., 02 de noviembre de 2000

149/48

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-59230

AUTO 2710

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor RAMIRO CASTRO DUQUE como apoderado de la Sociedad solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complementa los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 07 NOV. 2000

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 07 NOV 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA