

(11) Número de Publicação: **PT 1075493 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/705 (2007.10) **C12N 15/63** (2007.10)
C12N 1/21 (2007.10) **C12P 21/02** (2007.10)
G01N 33/53 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2000.02.22**

(30) Prioridade(s): **1999.02.22 US 255376**
1999.08.13 US 387699

(43) Data de publicação do pedido: **2001.02.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.20**
236/2008

(73) Titular(es):

H. LUNDBECK A/S
OTTILIAVEJ 9 2500 VALBY-COPENHAGEN DK

(72) Inventor(es):

JAMES A. BONINI US
BETH E. BOROWSKY US
NIKA ADHAM US
NOEL BOYLE US
THELMA O. THOMPSON US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ADN QUE CODIFICA RECEPTOR SNORF25**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"ADN que codifica receptor SNORF25"

ANTECEDENTES DO INVENTO

Este pedido reivindica prioridade do pedido U.S. com n.º de série 09/387 699, apresentado a 13 de Agosto de 1999, que é uma continuação-em-parte de U.S. com n.º de série 09/255 376, apresentado a 22 de Fevereiro de 1999.

Ao longo deste pedido referem-se várias publicações como citações parciais entre parêntesis. As citações completas para estas publicações encontram-se no final da especificação imediatamente antes das reivindicações.

Os neurorreguladores incluem um grupo diversificado de produtos naturais que subvertem ou modulam comunicação no sistema nervoso. Estes incluem, entre outros, neuropéptidos, aminoácidos, aminas biogénicas, lípidos e metabolitos de lípidos e outros produtos secundários do metabolismo. Muitas destas substâncias neurorreguladoras interagem com receptores específicos da superfície celular, que convertem sinais do exterior para o interior da célula. Os receptores acoplados a proteína G (GPCR) representam uma classe principal de receptores da superfície celular com os quais muitos neurotransmissores interagem para mediar os seus efeitos. Os GPCR caracterizam-se por sete domínios transmembranares e estão acoplados aos seus efectores através de activação de receptor ligada a proteínas G com sequelas bioquímicas intracelulares tais como estimulação de adenililciclase.

A vitamina A₁ (todo-*trans*-retinol) é oxidada a aldeído de vitamina A₁ (todo-*trans*-retinal) por uma álcool desidrogenase.

O todo-*trans*-retinal é crítico para a síntese de rodoposina em células da retina em que desempenha um papel chave no sistema visual. O todo-*trans*-retinal pode também ser convertido em ácido todo-*trans*-retinóico (ATRA) pela aldeído-desidrogenase e oxidase noutros tipos de células (Bowman, W.C. e Rand, M.J., 1980).

Historicamente, pensava-se que o ATRA e outros metabolitos activos de vitamina A, ácido 9-*cis*-retinóico (9CRA), mediavam apenas os seus efeitos celulares através da acção dos receptores nucleares de ácido retinóico (RAR α , β , γ) e receptores retinóide X (RXR α , β , γ) (Mangelsdorf, D.J., et al, 1994). Estes receptores são membros de uma superfamília de factores de transcrição dependentes de ligando, que incluem o receptor de vitamina D (VDR), receptor de hormona tiróide (TR) e receptores activadores de proliferação do peroxissoma (PPAR). Estes formam heterodímeros e homodímeros que se ligam a elementos sensíveis a ADN na ausência de ligando. Em resposta a ligação de ligando o dímero muda de conformação que leva a transactivação e regulação de transcrição de conjunto(s) de genes específicos do tipo de célula (Mangelsdorf, D.J., et al, 1994; Hofman, C. e Eichele, G., 1994; e Gudas, L.J. et al, 1994).

Dado que o ácido retinóico produz uma vasta multiplicidade de efeitos biológicos, não é surpreendente que seja proposto como desempenhando um papel importante em diferentes processos fisiológicos ou patofisiológicos. Os retinóides controlam eventos fisiológicos críticos incluindo crescimento celular, diferenciação, reprodução, metabolismo e hematopoiese numa grande multiplicidade de tecidos. Ao nível celular, os retinóides são capazes de inibir proliferação celular induzindo diferenciação e induzindo apoptose (Breitman, T. et al, 1980; Sporn, M. e Roberts, A., 1984 e Martin, S., et al, 1990). Estes diferentes efeitos do tratamento com retinóide desencadearam uma série de investigações para avaliação de retinóides para quimioterapia de cancro assim como quimioprevenção de cancro. Clinicamente, utilizam-se os retinóides para o tratamento de uma grande multiplicidade de doenças malignas incluindo: leucemia promielocítica aguda (APL), malignidades cutâneas de células T, malignidades dermatológicas, carcinomas de células escamosas da pele e do cérvix e neuroblastomas (Redfern, C.P. et al, 1995 para revisão). Os retinóides foram também analisados relativamente à sua capacidade de suprimir carcinogénese e evitar desenvolvimento de cancro invasivo. O ácido 13-*cis*-retinóico reverte a leucoplaquia oral, a lesão pré-maligna mais comum do tracto aerodigestivo e é também utilizado na quimioprevenção do cancro da bexiga (Sabichi, A.L. et al, 1998, para revisão).

Igualmente, o tratamento com ácido 13-*cis*-retinóico como terapia adjuvante após cirurgia e radiação no cancro da cabeça e pescoço causou um atraso significativo na ocorrência de segundos cancros primários (Gottardis, M.M. et al, 1996, para revisão).

Curiosamente, os retinóides também têm um efeito na função pancreática. Demonstrou-se que o ácido retinóico (ou retinol) é necessário para excreção de insulina a partir de ilhéus isolados (Chertow, B.S., et al, 1987) e de células de insulinoma de rato RINm5F (Chertow, B.S., et al, 1989). O ácido retinóico pode também ter um efeito na adesão célula-a-célula e agregação (Chertow, B.S., et al, 1983). Adicionalmente, uma única administração intragástrica de 9CRA (mas não ATRA) induziu uma onda de síntese de ADN nas células acinares pancreáticas e nas células do epitélio tubular proximal dos rins (Ohmura, T., et al, 1997). Assim, o ácido retinóico poderia desempenhar um papel na função pancreática normal e possivelmente no desenvolvimento da diabetes. Há também alguma evidência que os retinóides poderiam ser úteis no tratamento de malignidades pancreáticas (El-Metwally, T.H. et al, 1999; Rosenwicz, S. et al, 1997; e Rosenwicz, S. et al, 1995).

Os retinóides têm demonstrado afectar o crescimento e diferenciação de células epidérmicas assim como actividade de glândulas sebáceas e apresentam propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias. Assim, os retinóides têm sido cada vez mais utilizados para tratamento de várias doenças da pele incluindo: psoríase e outras doenças de pele hiper-queratóticas e paraqueratóticas, genodermatose queratótica, acne grave e dermatoses relacionadas com acne e também para terapia e/ou quimioprevenção de cancro de pele e outra neoplasia (Orfanos, C.E., et al, 1997 para revisão).

Os retinóides estão também envolvidos no desenvolvimento do pulmão. A ramificação fetal do pulmão levando ao desenvolvimento da árvore alveolar é acelerada pelo ácido retinóico. Presentemente, bebés prematuros que têm pulmões imaturos são tratados com vitamina A mas podem existir outras aplicações que necessitam de investigação adicional (Chytil, F., 1996).

Por último, há alguma evidência que sugere que os retinóides podem desempenhar um papel na esquizofrenia (Goodman, A.B. 1998) e doença de Alzheimer (Connor, M.J. e Sidell, N., 1997).

A lista extensiva de efeitos mediados por retinóides indica que os receptores mediados por ácido retinóico (não nucleares) são atractivos como alvos para intervenção terapêutica para várias doenças e seriam úteis no desenvolvimento de fármacos com maior especificidade e menos efeitos secundários para uma grande multiplicidade de doenças.

O número de acesso AL035423 da base de dados de nucleótidos EMBL, versão 1 da edição 58 da base de dados emitida a 15 de Fevereiro de 1999, apresenta sequência de nucleótidos para o clone BAC contendo uma inserção de ADN humano do cromossoma Xq25-26.

SUMÁRIO DO INVENTO

Este invento proporciona um ácido nucleico isolado que codifica um receptor SNORF25 de mamífero, com a condição que o ácido nucleico não tenha a sequência de nucleótidos apresentada sob o número de acesso AL035423 na base de dados de nucleótidos EMBL, edição 58 emitida a 15 de Fevereiro de 1999.

Este invento proporciona adicionalmente uma proteína receptora SNORF25 de mamífero purificada.

Este invento também proporciona um vector incluindo um ácido nucleico de acordo com este invento.

Este invento proporciona ainda adicionalmente uma célula incluindo um vector de acordo com este invento.

Este invento proporciona adicionalmente uma preparação de membranas isolada de uma célula de acordo com este invento.

Além disso, este invento proporciona uma sonda de ácidos nucleicos incluindo pelo menos 15 nucleótidos, cuja sonda hibrida especificamente com um ácido nucleico que codifica um

receptor SNORF25 de mamífero, em que a sonda tem uma sequência complementar a uma sequência única presente no interior de uma das duas cadeias do ácido nucleico que codifica o receptor SNORF25 de mamífero contido no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495).

Este invento proporciona adicionalmente uma sonda de ácido nucleico incluindo pelo menos 15 nucleótidos, cuja sonda hibrida especificamente com um ácido nucleico que codifica um receptor SNORF25 de mamífero, em que a sonda tem uma sequência complementar a uma sequência única presente no interior de (a) a sequência de ácido nucleico apresentada nas figuras 1A-1B (SEQ ID NO:1) ou (b) o seu complementar inverso.

Este invento proporciona um oligonucleótido anti-sentido apresentando uma sequência capaz de hibridar especificamente com ARN que codifica um receptor SNORF25 de mamífero, de modo a evitar tradução de tal ARN.

Este invento também proporciona um anticorpo capaz de ligação a um receptor SNORF25 de mamífero codificado por um ácido nucleico de acordo com este invento.

Este invento também proporciona uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade de um anticorpo de acordo com este invento eficaz para bloquear ligação de um ligando a um receptor SNORF25 humano e um transportador farmacêuticamente aceitável.

Este invento proporciona um processo para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células contendo ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam à sua superfície, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto sob condições adequadas para ligação e detecção de ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona adicionalmente um processo para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto uma

preparação de membranas de células contendo ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam à sua superfície, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto sob condições adequadas para ligação e detecção de ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona ainda adicionalmente um processo envolvendo ligação competitiva para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto separadamente células que expressam na sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, simultaneamente com o composto químico e com um segundo composto químico que se sabe que se liga ao receptor e com apenas o segundo composto químico, sob condições adequadas para ligação de tais compostos ao receptor e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero, em que uma diminuição na ligação do segundo composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero na presença do composto químico a ser ensaiado, indica que tal composto químico se liga ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona adicionalmente um processo envolvendo ligação competitiva para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui por em contacto separadamente uma preparação de membranas de células que expressam à sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, simultaneamente com o composto químico e com um segundo composto químico que se sabe que se liga ao receptor e com apenas o segundo composto químico, sob condições adequadas para ligação de tais compostos ao receptor e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero, em que uma diminuição na ligação do segundo composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero na presença do composto químico a ser ensaiado, indica que o composto químico se liga ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona um método para rastreio de vários compostos químicos que não se sabe se se ligam a um receptor

SNORF25 de mamífero para identificar um composto que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, que inclui (a) pôr em contacto células transfectadas e que expressam ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero com um composto que se sabe que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero; (b) pôr em contacto as células da etapa (a) com uma multiplicidade de compostos que não se sabe se se ligam especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem ligação de compostos que se sabe que se ligam ao receptor SNORF25 de mamífero; (c) determinar se a ligação do composto que se sabe que se liga ao receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença de uma multiplicidade de compostos, relativamente à ligação do composto na ausência da multiplicidade de compostos; e sendo esse o caso (d) determinar separadamente a ligação ao receptor SNORF25 de mamífero de cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar qualquer composto aqui incluído que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona adicionalmente um método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se se ligam a um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um composto que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, que inclui (a) pôr em contacto uma preparação de membranas de células transfectadas e que expressam ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero com a multiplicidade de compostos que não se sabe se se ligam especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero sob condições que permitem ligação de compostos que se sabe que se ligam ao receptor SNORF25 de mamífero; (b) determinar se a ligação de um composto que se sabe que se liga ao receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença de qualquer composto de entre uma multiplicidade de compostos, relativamente à ligação do composto na ausência da multiplicidade de compostos; e sendo esse o caso (c) determinar separadamente a ligação ao receptor SNORF25 de mamífero de cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar qualquer composto aqui incluído que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento também proporciona um método de detectar expressão de um receptor SNORF25 de mamífero por detecção da presença de ARNm que codifica o receptor SNORF25 de mamífero que inclui obter o ARNm total de uma célula e pôr em contacto o ARNm assim obtido com uma sonda de ácido nucleico de acordo com este invento sob condições de hibridação, detecção da presença de ARNm hibridado com a sonda e assim detectar a expressão do receptor SNORF25 de mamífero pela célula.

Este invento proporciona adicionalmente um método de detectar a presença de um receptor SNORF25 de mamífero à superfície de uma célula que inclui pôr em contacto a célula com um anticorpo de acordo com este invento sob condições que permitem ligação do anticorpo ao receptor, detecção da presença do anticorpo ligado à célula e assim detectar a presença do receptor SNORF25 de mamífero à superfície da célula.

Este invento também proporciona um método de preparar um receptor SNORF25 de mamífero purificado de acordo com o invento que inclui: (a) cultivar células que expressam o receptor SNORF25 de mamífero; (b) recuperar o receptor SNORF25 de mamífero das células; e (c) purificar o receptor SNORF25 de mamífero assim recuperado.

Este invento proporciona adicionalmente um método de preparar o receptor SNORF25 de mamífero purificado de acordo com o invento que inclui: (a) inserir um ácido nucleico que codifica o receptor SNORF25 de mamífero num vector de expressão adequado; (b) introduzir o vector resultante numa célula hospedeira adequada; (c) colocar a célula hospedeira resultante em condições adequadas que permitem a produção do receptor SNORF25 de mamífero; (d) recuperar o receptor SNORF25 de mamífero assim produzido; e opcionalmente (e) isolar e/ou purificar o receptor SNORF25 de mamífero assim recuperado.

Além disso, este invento proporciona um processo para determinar se um composto químico é um agonista de receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células transfectadas com ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam, com o composto sob condições que permitam a activação do receptor SNORF25 de mamífero e

detectar qualquer aumento de actividade de receptor SNORF25 de mamífero, de modo a assim determinar se o composto é ou não um agonista de receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento também proporciona um processo para determinar se um composto químico é um antagonista de receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células transfectadas com ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam, com o composto na presença de um agonista de receptor SNORF25 de mamífero conhecido, sob condições que permitem a activação do receptor SNORF25 de mamífero e detectar qualquer diminuição de actividade de receptor SNORF25 de mamífero, de modo a assim determinar se o composto é ou não um antagonista de receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona além disso um processo para determinar se um composto químico se liga especificamente e activa um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui pôr um contacto células que produzem uma resposta de segundo mensageiro e que expressam à sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto químico sob condições adequadas para activação do receptor SNORF25 de mamífero e medir a resposta de segundo mensageiro na presença e na ausência do composto químico, sendo que uma alteração, por exemplo um aumento de resposta de segundo mensageiro na presença do composto químico indica que o composto activa o receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona ainda adicionalmente um processo para determinar se um composto químico se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero e inibe a sua activação, que inclui pôr separadamente em contacto células que produzem uma resposta de segundo mensageiro e que expressam à sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, simultaneamente com o composto químico e com um segundo composto químico que se sabe activar o receptor SNORF25 de mamífero e com apenas o segundo composto químico, sob condições adequadas para activação do receptor SNORF25 de mamífero e medir a resposta do segundo mensageiro na presença

apenas do segundo composto químico e na presença simultânea do segundo composto químico e do composto químico, em que uma pequena alteração, por exemplo um aumento, na resposta do segundo mensageiro na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico comparativamente com a presença de apenas o segundo composto químico indica que o composto químico inibe activação do receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona ainda adicionalmente um método de rastrear uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se activam um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um composto que activa o receptor SNORF25 de mamífero que inclui: (a) pôr em contacto células transfectadas com receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam com a multiplicidade de compostos que não se sabe se activam o receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem activação do receptor SNORF25 de mamífero; (b) determinar se a actividade do receptor SNORF25 de mamífero é aumentada na presença de um ou mais dos compostos; e sendo esse o caso (c) determinar separadamente se a activação do receptor SNORF25 de mamífero é aumentada por qualquer composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar cada composto que activa o receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona um método de rastrear uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se inibem a activação de um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um composto que inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero, que inclui: (a) pôr em contacto células transfectadas com o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam com a multiplicidade de compostos na presença de um agonista conhecido de receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem activação do receptor SNORF25 de mamífero; (b) determinar se a extensão ou quantidade de activação do receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença de um ou mais dos compostos, relativamente à extensão ou quantidade de activação do receptor SNORF25 de mamífero na ausência de um ou mais de tais compostos; e sendo esse o caso (c) determinar separadamente se cada um de tais compostos inibe activação do receptor SNORF25 de mamífero para cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar qualquer composto incluído em tal

multiplicidade de compostos que inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero.

DESCRIÇÃO SUCINTA DAS FIGURAS

Figuras 1A-1B

Sequência de nucleótidos incluindo a sequência que codifica um receptor SNORF25 humano (SEQ ID NO:1). Indicam-se possíveis quadros de leitura aberta incluindo o quadro de leitura aberta mais curto através de sublinhado de um codão de iniciação (ATG) (nas posições 61-63) e do codão de paragem (nas posições 1066-1068). Além disso, apresentam-se sequências não traduzidas parciais 5' e 3'.

Figuras 2A-2B

Sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO:2) do receptor SNORF25 humano codificada pelo quadro de leitura aberta mais longo indicado na sequência de nucleótidos apresentada nas figuras 1A-1B (SEQ ID NO:1). As sete possíveis regiões transmembranares (TM) estão sublinhadas.

Figuras 3A-3B

Sequência de nucleótidos incluindo a sequência que codifica um receptor SNORF25 de rato (SEQ ID NO:3). Indicam-se possíveis quadros de leitura aberta incluindo o quadro de leitura aberta mais curto através de sublinhado de um codão de iniciação (ATG) (nas posições 49-51) e do codão de paragem (nas posições 1054-1056). Além disso, apresentam-se sequências não traduzidas parciais 5' e 3'.

Figuras 4A-4B

Sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO:4) do receptor SNORF25 de rato codificada pelo quadro de leitura aberta mais longo indicado na sequência de nucleótidos apresentada nas figuras 3A-3B (SEQ ID NO:3). As sete possíveis regiões transmembranares (TM) estão sublinhadas.

Figura 5

Comparação de níveis basais de AMPc de células CHO transfectadas com SNORF25 e com simulação de transfecção. Transfectou-se ADN de SNORF25 ou vector vazio (simulação) para células CHO tal como descrito nos materiais e métodos.

Plaquearam-se os produtos de transfecção para placas de 96 poços e ensaiaram-se para libertação de AMPc tal como descrito. Apresentam-se os resultados de uma experiência representativa.

Figura 6

Modulação de libertação de AMPc por ATRA, vitamina A₁ e forskolina em células CHO com simulação de transfecção e que expressam SNORF25. Plaquearam-se os produtos de transfecção para placas de 96 poços, provocaram-se com concentrações de 10 µM de fármacos e ensaiaram-se para libertação de AMPc tal como descrito. Apresentam-se os resultados de uma experiência representativa envolvendo receptores estimuladores de ciclase conhecidos. Os resultados são médias ± D.P.M. de determinações em triplicado com a excepção de vitamina A₁ que é um ponto único. Os resultados estão normalizados para % basal de libertação de AMPc.

Figura 7

Especificidade de resposta de AMPc a ATRA em células Cos-7. Plaquearam-se os produtos de transfecção em placas de 96 poços, provocaram-se com concentrações de 10 µM de ATRA e ensaiaram-se para libertação de AMPc tal como descrito. Apresentam-se os resultados de uma experiência representativa. Os resultados são médias ± D.P.M. de determinações em triplicado.

Figura 8

Curva de dose-resposta a ATRA em células Cos-7 transfectadas transitoriamente. Exemplo representativo de efeito dose-resposta de ATRA para aumentar libertação de AMPc em células transfectadas com SNORF25 (■) e com simulação de transfecção (□).

Figuras 9A-9C

Estimulação de CFTR por ATRA em oócitos que expressam SNORF25. Registo de bloqueio de voltagem de oócitos previamente injectados com ARNm de receptor SNORF25 e CFTR (figura 9A) e oócito de controlo (CFTR sozinho) (figura 9B). A aplicação de epinefrina (1 µM) suscita uma corrente semelhante noutros oócitos que expressam o receptor adrenérgico B2 (B2AR)

e CFTR (figura 9C). O potencial de retenção foi -70 mV para todos os registos.

Figura 10

Amplitudes de corrente médias estimuladas por ATRA (10 μ M) em oócitos de controlo (CFTR sozinho) (n = 16) e oócitos injectados com ARNm que codifica SNORF25 e CFTR (n = 17).

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Este invento proporciona um ácido nucleico recombinante incluindo um ácido nucleico que codifica um receptor SNORF25 de mamífero, em que o ácido nucleico que codifica o receptor de mamífero hibrida sob condições de elevado rigor com (a) um ácido nucleico que codifica um receptor SNORF25 humano e apresentando uma sequência idêntica à sequência do ácido nucleico que codifica o receptor SNORF25 humano contido no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495) ou (b) um ácido nucleico que codifica um receptor SNORF25 de rato e apresentando uma sequência idêntica à sequência do ácido nucleico que codifica o receptor SNORF25 de rato contido no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494), com a condição que o ácido nucleico não apresente a sequência de nucleótidos apresentada sob o número de acesso AL035423 na base de dados de nucleótidos EMBL, edição 58 emitida a 15 de Fevereiro de 1999.

Este invento proporciona adicionalmente um ácido nucleico recombinante incluindo um ácido nucleico que codifica um receptor SNORF25 humano, em que o receptor SNORF25 humano inclui uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência do receptor SNORF25 humano codificada pelo quadro de leitura aberta mais curto indicado nas figuras 1A-1B (SEQ ID NO:1), com a condição que o ácido nucleico não apresente a sequência de nucleótidos apresentada sob o número de acesso AL035423 na base de dados de nucleótidos EMBL, edição 58 emitida a 15 de Fevereiro de 1999.

Este invento também proporciona um ácido nucleico recombinante incluindo um ácido nucleico que codifica um receptor SNORF25 de rato, em que o receptor SNORF25 de rato inclui uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência do

receptor SNORF25 de rato codificada pelo quadro de leitura aberta mais curto indicado nas figuras 3A-3B (SEQ ID NO:3).

O plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 e o plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 foram ambos depositados a 24 de Novembro de 1998 junto da American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, E.U.A. sob as disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patente e foram-lhes atribuídos os números de acesso ATCC 203495 e 203494, respectivamente.

Os métodos de hibridação são bem conhecidos pelos peritos na arte. Para os objectivos deste invento, hibridação sob condições altamente rigorosas significa hibridação efectuada a 40°C num tampão de hibridação contendo formamida a 50%, 5X SSC, Tris 7 mM, 1X Denhardt, ADN de esperma de salmão a 25 µg/ml; lavagem a 50°C em 0,1 X SSC, SDS a 0,1%.

Ao longo deste pedido utilizam-se as seguintes abreviaturas padrão para indicar bases de nucleótidos específicas:

A = adenina
G = guanina
C = citosina
T = timina
M = adenina ou citosina
R = adenina ou guanina
W = adenina ou timina
S = citosina ou guanina
Y = citosina ou timina
K = guanina ou timina
V = adenina, citosina ou guanina (não timina)
H = adenina, citosina ou timina (não citosina)
B = citosina, guanina ou timina (não adenina)
N = adenina, citosina, guanina ou timina (ou outra base modificada tal como inosina)
I = inosina

Além disso, a expressão "agonista" é utilizada ao longo deste pedido para indicar qualquer péptido ou composto não

peptídico que aumenta a actividade de qualquer dos polipéptidos do presente invento. A expressão "antagonista" é utilizada ao longo deste pedido para indicar qualquer péptido ou composto não peptídico que diminui a actividade de qualquer dos polipéptidos do presente invento.

Além disso, tal como aqui utilizada, a expressão "transportador farmacêuticamente aceitável" significa qualquer um dos transportadores farmacêuticamente aceitáveis. São exemplos, entre outros, solução salina tamponada de fosfato, solução salina fisiológica, água e emulsões, tais como emulsões óleo/água.

É possível que o gene de receptor SNORF25 de mamífero contenha intrões e além disso existe a possibilidade de poderem existir intrões adicionais nas regiões codificantes ou não codificantes. Além disso, forma(s) de ARNm que sofreram *splicing* podem codificar aminoácidos adicionais quer a montante da metionina iniciadora actualmente definida ou dentro da região de codificação. Além disso, é possível a existência e utilização de exões alternativos, em que o ARNm pode codificar aminoácidos diferentes dentro da região que inclui o exão. Adicionalmente, podem aparecer substituições de um único aminoácido através do mecanismo de edição de ARN, de modo que a sequência de aminoácidos da proteína expressa é diferente da codificada pelo gene original. (Burns, et al., 1996; Chu, et al., 1996). Tais variantes podem exhibir propriedades farmacológicas que diferem das do polipéptido codificado pelo gene original.

Este invento proporciona variantes de *splicing* dos receptores SNORF25 de mamífero aqui revelados. Este invento proporciona adicionalmente locais de iniciação de tradução alternativos e variantes de *splicing* ou de edição alternativas de ácidos nucleicos que codificam os receptores SNORF25 de acordo com este invento.

Este invento também abrange ácidos nucleicos recombinantes que incluem ácidos nucleicos que codificam variantes alélicas de ocorrência natural dos receptores SNORF25 aqui revelados.

Os ácidos nucleicos do presente invento também incluem análogos de ácidos nucleicos dos genes de receptor SNORF25 humano, em que o gene do receptor SNORF25 humano inclui a sequência de ácido nucleico apresentada nas figuras 1A-1B ou contida no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Os análogos de ácido nucleico dos genes de receptor SNORF25 humano diferem dos genes de receptor SNORF25 humano aqui descritos em termos da identidade ou localização de uma ou mais bases de ácido nucleico (análogos de deleção contendo menos do que todas as bases dos ácidos nucleicos apresentadas nas figuras 1A-1B ou contidas no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495), análogos de substituição em que uma ou mais bases dos ácidos nucleicos apresentados nas figuras 1A-1B ou contidas no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495) são substituídas por outras bases de ácido nucleico e análogos de adição, em que se adicionam uma ou mais bases de ácido nucleico a uma parte terminal ou do meio da sequência de ácido nucleico) e que codificam proteínas que partilham algumas ou todas as propriedades das proteínas codificadas pelas sequências de ácidos nucleicos apresentadas na figura 1A-1B ou contidas no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Numa concretização do presente invento, o análogo de ácido nucleico codifica uma proteína que tem uma sequência de aminoácidos idêntica à apresentada nas figuras 2A-2B ou codificada pela sequência de ácido nucleico contida no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Noutra concretização, o análogo de ácido nucleico codifica uma proteína com uma sequência de aminoácidos que difere das sequências de aminoácidos apresentadas nas figuras 2A-2B ou codificadas pelo ácido nucleico contido no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Numa concretização adicional, a proteína codificada pelo análogo de ácido nucleico tem uma função que é a mesma função das proteínas receptoras com a sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 2A-2B. Noutra concretização, a função da proteína codificada pelo análogo de ácido nucleico difere da função da proteína receptora com a sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 2A-2B. Noutra concretização, a variação da sequência de ácido nucleico ocorre dentro da região transmembranar (TM) da proteína. Numa concretização adicional, a variação da sequência de ácido nucleico ocorre fora da região TM.

Os ácidos nucleicos do presente invento também incluem análogos de ácido nucleico dos genes de receptor SNORF25 de rato, em que o gene de receptor SNORF25 de rato inclui a sequência de ácido nucleico apresentada nas figuras 3A-3B ou contida no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Os análogos de ácido nucleico dos genes de receptor SNORF25 de rato diferem dos genes de receptor SNORF25 de rato aqui descritos em termos de identidade ou localização de uma ou mais bases de ácido nucleico (análogos de deleção contendo menos do que todas as bases de ácido nucleico apresentadas nas figuras 3A-3B ou contidas no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494), análogos de substituição em que uma ou mais bases de ácido nucleico apresentadas nas figuras 3A-3B ou contidas no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494) são substituídas por outras bases de ácido nucleico e análogos de adição, em que se adicionam uma ou mais bases de ácido nucleico a uma parte terminal ou do meio da sequência de ácido nucleico) e que codifica proteínas que partilham algumas ou todas as propriedades das proteínas codificadas pelas sequências de ácido nucleico apresentadas nas figuras 3A-3B ou contidas no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Numa concretização do presente invento, o análogo de ácido nucleico codifica uma proteína que tem uma sequência de aminoácidos idêntica à apresentada nas figuras 4A-4B ou codificadas pela sequência de ácido nucleico contida no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Noutra concretização, o análogo de ácido nucleico codifica uma proteína com uma sequência de aminoácidos que difere das sequências de aminoácidos apresentadas nas figuras 4A-4B ou codificadas pelo ácido nucleico contido no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Numa concretização adicional, a proteína codificada pelo análogo de ácido nucleico tem uma função que é a mesma função das proteínas receptoras com a sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 4A-4B. Noutra concretização, a função da proteína codificada pelo análogo de ácido nucleico difere da função da proteína receptora com a sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 4A-4B. Noutra concretização, a variação da sequência de ácido nucleico ocorre dentro da região transmembranar (TM) da proteína. Numa concretização adicional, a variação da sequência de ácido nucleico ocorre fora da região TM.

Este invento proporciona os ácidos nucleicos descritos supra isolados, em que o ácido nucleico é ADN. Numa concretização, o ADN é ADNc. Noutra concretização, o ADN é ADN genómico. Ainda noutra concretização, o ácido nucleico é ARN. São bem conhecidos na arte métodos para produção e manipulação de moléculas de ácidos nucleicos.

Este invento proporciona adicionalmente ácido nucleico que é degenerado relativamente ao ADN que codifica qualquer dos polipéptidos aqui descritos. Numa concretização, o ácido nucleico inclui uma sequência de nucleótidos que é degenerada relativamente à sequência de nucleótidos apresentada nas figuras 1A-1B (SEQ ID NO:1) ou a sequência de nucleótidos contida no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495), ou seja uma sequência de nucleótidos que é traduzida para a mesma sequência de aminoácidos, desde que o ácido nucleico não tenha a sequência de nucleótidos apresentada sob o número de acesso AL035423 na base de dados de sequências de nucleótidos EMBL edição 58 emitida a 15 de Fevereiro de 1999.

Este invento proporciona adicionalmente ácido nucleico que é degenerado relativamente ao ADN que codifica qualquer dos polipéptidos aqui descritos. Numa concretização, o ácido nucleico inclui uma sequência de nucleótidos que é degenerada relativamente às sequências de nucleótidos apresentadas nas figuras 3A-3B (SEQ ID NO:3) ou as sequências de nucleótidos contidas no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494), ou seja uma sequência de nucleótidos que é traduzida para a mesma sequência de aminoácidos.

Este invento também abrange ADN e ADNc que codificam as sequências de aminoácidos que diferem das dos polipéptidos de acordo com este invento, mas que não produziriam alterações fenotípicas. Alternativamente, este invento também abrange ADN, ADNc e ARN que hibridam com o ADN, ADNc e ARN de acordo com o presente invento. São bem conhecidos dos peritos na arte métodos de hibridação.

Os ácidos nucleicos de acordo com o presente invento também incluem moléculas de ácido nucleico que codificam análogos, fragmentos ou derivados de polipéptido de polipéptidos antigénicos que diferem das formas de ocorrência

natural em termos de identidade ou localização de um ou mais resíduos de aminoácidos (análogos de deleção contendo menos do que todos os resíduos especificadas para a proteína, análogos de substituição em que são substituídos um ou mais resíduos especificados por outros resíduos e análogos de adição em que se adicionam um ou mais resíduos de aminoácidos a uma parte terminal ou do meio dos polipéptidos) e que partilham algumas ou todas as propriedades das formas de ocorrência natural. Estas moléculas incluem: a incorporação de codões "preferidos" para expressão por hospedeiros não mamíferos seleccionados; a provisão de locais para clivagem por enzimas de endonuclease de restrição; e a provisão de sequências de ADN adicionais inicial, terminal ou intermédia que facilitam a construção de vectores facilmente expressos. A criação de análogos de polipéptidos é bem conhecida dos peritos na arte (Spurney, R. F. et al. (1997); Fong, T. M. et al. (1995); Underwood, D. J. et al. (1994); Graziano, M. P. et al. (1996); Guan X. M. et al. (1995)).

Os polipéptidos modificados de acordo com este invento podem ser transfectados para células quer transitória, quer estavelmente utilizando métodos bem conhecidos na arte, dos quais se revelam aqui exemplos. Este invento também proporciona ensaios de ligação utilizando os polipéptidos modificados, nos quais o polipéptido é expresso quer transitoriamente, quer em linhas celulares estáveis. Este invento proporciona adicionalmente um composto identificado utilizando um polipéptido modificado num ensaio de ligação tal como os ensaios de ligação aqui descritos.

Os ácidos nucleicos aqui descritos e reivindicados são úteis pela informação que proporcionam relativa à sequência de aminoácidos do polipéptido e como produtos para a síntese em larga escala dos polipéptidos através de várias técnicas recombinantes. A molécula de ácido nucleico é útil para gerar novos vectores de clonagem e de expressão, células hospedeiras procarióticas e eucarióticas transformadas e transfectadas e novo métodos úteis para crescimento em cultura de tais células hospedeiras capazes de expressão do polipéptido e produtos relacionados.

Este invento também proporciona um ácido nucleico isolado que codifica homólogos de espécie dos receptores SNORF25 codificados pela sequência de ácido nucleico apresentada nas figuras 1A-1B (SEQ ID NO:1) ou codificada pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Numa concretização, o ácido nucleico codifica um homólogo de receptor SNORF25 de mamífero que tem substancialmente a mesma sequência de aminoácidos do receptor SNORF25 codificada pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Noutra concretização, o ácido nucleico codifica um homólogo de receptor SNORF25 de mamífero que tem mais de 75% de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495); de preferência mais de 85% de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495); com a maior preferência mais de 95% de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Noutra concretização, o homólogo de receptor SNORF25 de mamífero tem mais de 70% de identidade de ácido nucleico com o gene do receptor SNORF25 contido no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495); de preferência mais de 80% de identidade de ácido nucleico com o gene do receptor SNORF25 contido no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495); com maior preferência mais de 90% de identidade de ácido nucleico com o gene de receptor SNORF25 contido no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Descrevem-se noutros documentos, exemplos de métodos para isolar e purificar homólogos de espécies (por exemplo, patente U.S. N.º 5 602 024, WO94/14957, WO97/26853, WO98/15570).

Este invento também proporciona um ácido nucleico isolado que codifica homólogos de espécie do receptor SNORF25 codificado pela sequência de ácido nucleico apresentada nas figuras 3A-3B (SEQ ID NO:3) ou codificado pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Numa concretização, o ácido nucleico codifica um homólogo de receptor SNORF25 de mamífero que tem substancialmente a mesma sequência de aminoácidos do receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Noutra concretização, o ácido nucleico codifica um homólogo de

receptor SNORF25 de mamífero que tem mais de 75% de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494); de preferência mais de 85% de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494); com a maior preferência mais de 95% de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Noutra concretização, o homólogo do receptor SNORF25 de mamífero tem mais de 70% de identidade de ácido nucleico com o receptor SNORF25 contido no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494); de preferência mais de 80% de identidade de ácido nucleico com o gene do receptor SNORF25 contido no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494); com maior preferência mais de 90% de identidade de ácido nucleico com o gene de receptor SNORF25 contido no plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494).

Este invento proporciona um ácido nucleico isolado que codifica um receptor SNORF25 de mamífero modificado, que difere de um receptor SNORF25 de mamífero por ter uma deleção substituição ou adição de aminoácido(s) no terceiro domínio intracelular.

Este invento proporciona um ácido nucleico isolado que codifica um receptor SNORF25 de mamífero. Numa concretização, o ácido nucleico é ADN. Noutra concretização, o ADN é ADNc. Noutra concretização, o ADN é ADN genómico. Noutra concretização, o ácido nucleico é ARN. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Noutra concretização, o receptor SNORF25 humano tem uma sequência de aminoácidos idêntica à codificada pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Noutra concretização, o receptor SNORF25 humano tem uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 2A-2B (SEQ ID NO:2).

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de rato tem uma sequência de aminoácidos idêntica à codificada pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Noutra concretização, o receptor SNORF25 de rato

tem uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 4A-4B (SEQ ID NO:4).

Este invento proporciona uma proteína receptora SNORF25 de mamífero purificada. Numa concretização, a proteína receptora SNORF25 é uma proteína receptora SNORF25 humana. Numa concretização adicional, a proteína receptora SNORF25 é uma proteína receptora SNORF25 de rato.

Este invento proporciona um vector incluindo um ácido nucleico de acordo com este invento. Este invento proporciona adicionalmente um vector adaptado para expressão numa célula que inclui os elementos de regulação necessários para expressão do ácido nucleico numa célula ligados operativamente ao ácido nucleico que codifica o receptor de modo a permitir a sua expressão, em que a célula é uma célula bacteriana, de anfíbio, de levedura, de insecto ou de mamífero. Numa concretização, o vector é um baculovírus. Noutra concretização, o vector é um plasmídeo.

Este invento proporciona um plasmídeo denominado pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Este invento também proporciona um plasmídeo denominado pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494).

Este invento proporciona adicionalmente qualquer vector ou plasmídeo que inclua sequências não traduzidas modificadas, que sejam benéficas para expressão numa célula hospedeira pretendida ou para utilização em ensaios de ligação ou funcionais. Por exemplo, um vector ou plasmídeo com sequências não traduzidas de comprimento variável pode expressar diferentes quantidades do polipéptido dependendo da célula hospedeira utilizada. Numa concretização, o vector ou plasmídeo inclui a sequência de codificação do polipéptido e os elementos de regulação necessários para expressão na célula hospedeira.

Este invento proporciona uma célula incluindo um vector de acordo com este invento. Numa concretização, a célula não é uma célula de mamífero. Numa concretização, a célula que não é de mamífero é uma célula de oócito de *Xenopus* ou uma célula melanófora de *Xenopus*. Noutra concretização, uma célula é uma

célula de mamífero. Noutra concretização, a célula é uma célula COS-7, uma célula de rim embrionário humano 293, uma célula NIH-3T3, uma célula LM(tk-)m uma célula Y1 de ratinho ou uma célula CHO. Noutra concretização, a célula é uma célula de insecto. Noutra concretização, a célula de insecto é uma célula Sf9, uma célula Sf21 ou uma célula Trichoplusia ni 5B-4.

Este invento proporciona uma preparação membranar isolada de uma célula de acordo com este invento.

Tal como aqui utilizada, a expressão "hibridando especificamente" significa a capacidade de uma molécula de ácido nucleico reconhecer uma sequência de ácido nucleico que lhe é complementar e para formar segmentos em hélice dupla através de ligação de hidrogénio entre pares de bases complementares.

Os ácidos nucleicos de acordo com este invento podem ser utilizados como sondas para obter ácidos nucleicos homólogos de outras espécies e para detectar a existência de ácidos nucleicos com sequências complementares em amostras.

Os ácidos nucleicos podem também ser utilizados para expressar os receptores que codificam em células transfectadas.

A utilização de um receptor activo constitutivamente codificado por SNORF25, quer de ocorrência natural sem modificações adicionais, quer após mutações, deleções ou semelhantes pontuais adequadas, permite rastreio de antagonistas e a utilização *in vivo* de tais antagonistas para atribuir um papel ao receptor SNORF25 sem conhecimento prévio do ligando endógeno.

A utilização do ácido nucleico permite adicionalmente a elucidação da possível diversidade do receptor e da existência de múltiplos subtipos dentro de uma família de receptores da qual SNORF25 é um membro.

Finalmente, considera-se que este receptor servirá como uma ferramenta valiosa para a concepção de fármacos para o

tratamento de várias condições patofisiológicas, tais como inflamação crónica e aguda, artrite, doenças auto-imunes, rejeição de transplante, reacção enxerto versus hospedeiro, infecções bacterianas, fúngicas, por protozoários e víricas, septicemia, SIDA, dor, doenças psíquicas e neurológicas, incluindo ansiedade, depressão, esquizofrenia, demência, atraso mental, perda de memória, epilepsia, doenças neurológicas, doenças neuromotoras, doenças respiratórias, asma, doenças alimentares/peso corporal incluindo obesidade, bulimia, diabetes, anorexia, náusea, hipertensão, hipotensão, doenças vasculares e cardiovasculares, isquemia, AVC, cancros, úlceras, retenção urinária, doenças sexuais/do sistema reprodutivo, doenças do ritmo circadiano, doenças renais, doenças dos ossos incluindo osteoporose, hipertrofia prostática benigna, doenças gastrointestinais, congestão nasal, doenças dermatológicas tal como psoríase, alergias, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, insuficiência cardíaca aguda, doenças de angina, delírio, disquinesias tais como doença de Huntington ou de Gille do síndrome de la Tourette, entre outras e ensaios de diagnóstico para tais doenças. Este receptor pode também servir como uma ferramenta valiosa para a concepção de fármacos para quimioprevenção.

São bem conhecidos na arte métodos de transfectar células por exemplo células de mamífero, com tais ácidos nucleicos para obter células nos quais o receptor é expresso na superfície da célula. (Consultar, por exemplo, patentes U.S. N.º 5 053 337; 5 155 218; 5 360 735; 5 472 866; 5 476 782; 5 516 653; 5 545 549; 5 556 753; 5 595 880; 5 602 024; 5 639 652; 5 652 113; 5 661 024; 5 766 879; 5 786 155; e 5 786 157, cujas revelações se incorporam aqui por referência na sua globalidade neste pedido.)

Tais células transfectadas podem também ser utilizadas para ensaiar os compostos de ensaio e para rastrear bibliotecas de compostos para obter compostos que se ligam ao receptor SNORF25, bem como compostos que activam ou inibem a activação de respostas funcionais em tais células e, consequentemente, também o fazem provavelmente *in vivo*. (Consultar, por exemplo, patentes U.S. N.º 5 053 337; 5 155 218; 5 360 735; 5 472 866; 5 476 782; 5 516 653; 5 545 549; 5 556 753; 5 595 880; 5 602 024; 5 639 652;

5 652 113; 5 661 024; 5 766 879; 5 786 155; e 5 786 157, cujas revelações se incorporam aqui por referência na sua globalidade neste pedido.)

Este invento proporciona adicionalmente um anticorpo capaz de ligação a um receptor de mamífero codificado por um ácido nucleico que codifica um receptor de mamífero. Numa concretização, o receptor de mamífero é um receptor humano. Numa concretização adicional, o receptor de mamífero é um receptor de rato. Este invento também proporciona um agente capaz de inibir competitivamente a ligação de um anticorpo a um receptor de mamífero. Numa concretização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou anti-soros.

São bem conhecidos na arte métodos de preparar e utilizar oligonucleótidos anti-sentido, anticorpos, sondas de ácido nucleico e animais transgênicos dirigidos ao receptor SNORF25. (Consultar, por exemplo, patentes U.S. N.º 5 053 337; 5 155 218; 5 360 735; 5 472 866; 5 476 782; 5 516 653; 5 545 549; 5 556 753; 5 595 880; 5 602 024; 5 639 652; 5 652 113; 5 661 024; 5 766 879; 5 786 155; e 5 786 157, cujas revelações se incorporam aqui por referência na sua globalidade neste pedido.)

Este invento proporciona um anticorpo capaz de ligação a um receptor SNORF25 de mamífero codificado pelo ácido nucleico de acordo com este invento. Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Numa concretização adicional, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato.

Além disso, este invento proporciona um agente capaz de inibir competitivamente a ligação de um anticorpo de acordo com este invento a um receptor SNORF25 de mamífero. Numa concretização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou anti-soros.

Este invento também proporciona uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade de um anticorpo de acordo com este invento eficaz para bloquear ligação de um ligando a um receptor SNORF25 humano e um transportador farmacêuticamente aceitável.

Este invento proporciona um processo para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células contendo ADN que codifica, e expressa na sua superfície celular, o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto sob condições adequadas para ligação e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero. Este invento proporciona adicionalmente um processo para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto uma preparação membranar de células contendo ADN que codifica, e expressa à sua superfície celular, o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto sob condições adequadas para ligação, e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero tem substancialmente a mesma sequência de aminoácidos do receptor SNORF25 humano codificado pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203495). Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero tem substancialmente a mesma sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 2A-2B (SEQ ID NO:2). Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero tem a sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 2A-2B (SEQ ID NO:2).

Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero tem substancialmente a mesma sequência de aminoácidos do receptor SNORF25 de rato codificado pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25 (N.º de acesso ATCC 203494). Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero tem substancialmente a mesma sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 4A-4B (SEQ ID NO:4). Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero tem a sequência de aminoácidos apresentada nas figuras 4A-4B (SEQ ID NO:4).

Numa concretização, não se sabe previamente se o composto se liga a um receptor SNORF25 de mamífero. Numa concretização, a célula é uma célula de insecto. Numa concretização, a célula é uma célula de mamífero. Noutra concretização, a célula não é de origem neuronal. Noutra concretização, a célula não neuronal é uma célula COS-7, célula 293 de rim embrionário humano, uma célula CHO, uma célula NIH-3T3, uma célula Y1 de ratinho ou uma célula LM(tk-). Noutra concretização, não se sabe previamente se o composto se liga a um receptor SNORF25 de mamífero. Este invento proporciona um composto identificado pelo processo precedente deste invento.

Este invento ainda proporciona adicionalmente um processo que envolve ligação competitiva para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui separadamente pôr em contacto células que expressam na sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, simultaneamente com composto químico e com um segundo composto químico que se sabe que se liga ao receptor, e com apenas o segundo composto químico, sob condições adequadas para ligação de tais compostos ao receptor e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero, em que uma diminuição da ligação do segundo composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero na presença do composto químico a ser ensaiado indica que tal composto químico se liga ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona um processo que envolve ligação competitiva para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui separadamente pôr em contacto uma preparação membranar de células que expressam na sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto químico e um segundo composto químico que se sabe que se liga ao receptor e apenas com o segundo composto químico, sob condições adequadas para ligação de tais compostos ao receptor e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero, em que uma diminuição da ligação do segundo composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero na

presença do composto químico a ser ensaiado indica que tal composto químico se liga ao receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato. Numa concretização adicional, a célula é uma célula de insecto. Noutra concretização, a célula é uma célula de mamífero. Noutra concretização, a célula não é de origem neuronal. Noutra concretização, a célula não neuronal é uma célula COS-7, uma célula de rim embrionário humano 293, uma célula CHO, uma célula NIH-3T3, uma célula Y1 de ratinho ou uma célula LM(tk-). Noutra concretização, não se sabe previamente se o composto se liga a um receptor SNORF25 de mamífero. Este invento proporciona um composto identificado pelo processo precedente deste invento.

Este invento proporciona um método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se se ligam a um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um composto que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, que inclui (a) pôr em contacto células transfectadas com ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressa com um composto que se sabe que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero; (b) pôr em contacto as células da etapa (a) com a multiplicidade de compostos que não se sabe se se ligam especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem ligação de compostos que se sabe que se ligam ao receptor SNORF25 de mamífero; (c) determinar se a ligação do composto que se sabe que se liga ao receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença da multiplicidade de compostos, relativamente à ligação do composto na ausência da multiplicidade de compostos; e se for o caso (d) determinar separadamente a ligação ao receptor SNORF25 de mamífero de cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a identificar assim qualquer composto aí incluído que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona um método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se se ligam a um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um

composto que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, que inclui (a) pôr em contacto uma preparação membranar de células transfectadas com ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressa com a multiplicidade de compostos que não se sabe se se ligam especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero sob condições que permitem ligação de compostos que se sabe que se ligam ao receptor SNORF25 de mamífero; (b) determinar se a ligação de um composto que se sabe que se liga ao receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença da multiplicidade de compostos, relativamente à ligação do composto na ausência da multiplicidade de compostos; e se for o caso (c) determinar separadamente a ligação ao receptor SNORF25 de mamífero de cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a identificar assim qualquer composto nela incluída que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Numa concretização adicional, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato. Noutra concretização, a célula é uma célula de mamífero. Noutra concretização, a célula de mamífero não é de origem neuronal. Numa concretização adicional, a célula não neuronal é uma célula COS-7, uma célula de rim embrionário humano 293, uma célula LM(tk-), uma célula CHO, uma célula Y1 de ratinho ou uma célula NIH-3T3.

Este invento proporciona um método de detectar expressão de um receptor SNORF25 de mamífero por detecção da presença de ARNm que codifica o receptor SNORF25 de mamífero que inclui obter o ARNm total da célula e pôr em contacto o ARNm assim obtido com uma sonda de ácido nucleico de acordo com este invento sob condições de hibridação, detectar a presença de ARNm hibridado com a sonda, e consequentemente detectar a expressão do receptor SNORF25 de mamífero pela célula.

Este invento proporciona um método de detectar a presença de um receptor SNORF25 de mamífero na superfície de uma célula que inclui pôr em contacto a célula com um anticorpo de acordo com este invento sob condições que permitem ligação do anticorpo ao receptor, detectar a presença do anticorpo ligado

à célula, e consequentemente detectar a presença do receptor SNORF25 de mamífero na superfície da célula.

Este invento proporciona um método de preparar um receptor SNORF25 de mamífero purificado de acordo com este invento que inclui: (a) cultivar células que expressam o receptor SNORF25 de mamífero, (b) recuperar o receptor SNORF25 de mamífero das células; e (c) purificar o receptor SNORF25 de mamífero assim recuperado.

Este invento proporciona um método de preparar o receptor SNORF25 de mamífero purificado de acordo com este invento que inclui : (a) inserir um ácido nucleico que codifica o receptor SNORF25 de mamífero num vector de expressão adequado; (b) introduzir o vector resultante numa célula hospedeira adequada; (c) colocar a célula hospedeira resultante em condições adequadas que permitem produção do receptor SNORF25 de mamífero; (d) recuperar o receptor SNORF25 de mamífero assim produzido; e opcionalmente (e) isolar e/ou purificar o receptor SNORF25 de mamífero assim recuperado.

Este invento proporciona um processo para determinar se um composto químico é um agonista de receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células transfectadas com ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam com o composto sob condições que permitem a activação do receptor SNORF25 de mamífero, e detectar qualquer aumento da actividade do receptor SNORF25 de mamífero, de modo a determinar consequentemente se o composto é um agonista de receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona um processo para determinar se um composto químico é um antagonista de receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células transfectadas com ADN que codifica o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam com o composto na presença de um agonista de receptor SNORF25 de mamífero conhecido, sob condições que permitam a activação do receptor SNORF25 de mamífero, e detectar qualquer diminuição de actividade do receptor SNORF25 de mamífero, de modo a detectar consequentemente se o composto é um antagonista de receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato.

Este invento proporciona um processo para determinar se um composto químico se liga especificamente e activa um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui pôr em contacto células que produzem uma resposta de segundo mensageiro e que expressam na sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto químico sob condições adequadas para activação do receptor SNORF25 de mamífero e medição da resposta de segundo mensageiro na presença e na ausência do composto químico, em que uma alteração, por exemplo um aumento da resposta de segundo mensageiro na presença do composto químico indica que o composto activa o receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui a activação de canal de cloretos e a alteração no segundo mensageiro é um aumento no nível de corrente de cloreto. Noutra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui alteração dos níveis intracelulares de cálcio e a alteração de segundo mensageiro é um aumento da medida do cálcio intracelular. Noutra concretização, uma resposta de segundo mensageiro inclui libertação de fosfato de inositol e a alteração do segundo mensageiro é um aumento do nível de fosfato de inositol. Noutra concretização, uma resposta de segundo mensageiro inclui libertação de ácido araquidónico e a alteração do segundo mensageiro é um aumento do nível de ácido araquidónico. Ainda numa outra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui ligação de ligando GTPyS e a alteração de segundo mensageiro é um aumento da ligação de ligando GTPyS. Noutra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui activação de MAP quinase e a alteração da resposta de segundo mensageiro é um aumento na activação de MAP quinase. Numa concretização adicional, a resposta de segundo mensageiro inclui acumulação de AMPc e a alteração da resposta de segundo mensageiro é um aumento da acumulação de AMPc.

Este invento proporciona um processo para determinar se um composto químico se liga especificamente e inibe activação de um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui separadamente pôr em contacto células que produzem uma resposta de segundo mensageiro e que expressam na sua superfície celular o receptor SNORF25 de mamífero, em que tais células não expressam normalmente o receptor SNORF25 de mamífero, com o composto químico e um segundo composto químico que se sabe que activa o receptor SNORF25 de mamífero e apenas com o segundo composto químico, sob condições adequadas para activação do receptor SNORF25 de mamífero e medir uma resposta de segundo mensageiro apenas na presença do segundo composto químico e na presença simultânea do segundo composto químico e do composto químico, em que uma alteração menor, por exemplo um aumento, da resposta de segundo mensageiro na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico indica que o composto químico inibe activação do receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui activação de canal de cloreto e a alteração da resposta de segundo mensageiro é uma diminuição menor no nível de corrente de cloreto na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico. Noutra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui alteração dos níveis intracelulares de cálcio e a alteração da resposta do segundo mensageiro é um menor aumento na medida de cálcio intracelular na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico. Noutra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui libertação de fosfato de inositol e a alteração da resposta do segundo mensageiro é um menor aumento do nível de fosfato de inositol na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico.

Numa concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui activação de MAP quinase e a alteração da resposta do segundo mensageiro é um menor aumento do nível de activação de MAP quinase na presença simultânea do composto químico e do

segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico. Noutra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui alteração nos níveis de AMPc e a alteração da resposta do segundo mensageiro é uma alteração menor do nível de AMPc na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico. Noutra concretização, a resposta de segundo mensageiro inclui libertação de ácido araquidónico e a alteração da resposta do segundo mensageiro é um aumento do nível dos níveis de ácido araquidónico na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico. Numa concretização adicional, a resposta de segundo mensageiro inclui ligação de ligando GTPyS e a alteração no segundo mensageiro é um menor aumento na ligação de ligando GTPyS na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico.

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Numa concretização adicional, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato. Noutra concretização, a célula é uma célula de insecto. Noutra concretização, a célula é uma célula de mamífero. Noutra concretização, uma célula de mamífero não é de origem neuronal. Noutra concretização, a célula não neuronal é uma célula COS-7, célula CHO, célula de rim embrionário humano 293, célula NIH-3T3 ou célula LM(tk-). Noutra concretização, não se sabe previamente se o composto se liga a um receptor SNORF25 de mamífero.

Este invento proporciona um método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe que activam um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um composto que activa o receptor SNORF25 de mamífero que inclui: (a) pôr em contacto células transfectadas com o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam com a multiplicidade de compostos que não se sabe se activam o receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem activação do receptor SNORF25 de mamífero; (b) determinar se a actividade do receptor SNORF25 de mamífero é aumentada na presença de um ou mais dos compostos; e se assim for (c) determinar separadamente se a activação do receptor SNORF25 de mamífero é

aumentada por qualquer composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a identificar consequentemente cada composto que activa o receptor SNORF25 de mamífero. Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Numa concretização adicional, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato.

Este invento proporciona um método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se inibem a activação de um receptor SNORF25 de mamífero para identificar um composto que inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero, que inclui: (a) pôr em contacto células transfectadas com o receptor SNORF25 de mamífero e que o expressam com a multiplicidade de compostos na presença de um agonista conhecido de receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem activação do receptor SNORF25 de mamífero; (b) determinar se a extensão ou quantidade de activação do receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença de um ou mais dos compostos, relativamente à extensão ou quantidade de activação do receptor SNORF25 de mamífero na ausência de tal um ou mais compostos; e se assim for (c) determinar separadamente se cada tal composto inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero para cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a identificar consequentemente qualquer composto incluído em tal multiplicidade de compostos que iniba a activação do receptor SNORF25 de mamífero.

Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Numa concretização adicional, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato. Noutra concretização, a célula é uma célula de mamífero. Noutra concretização, a célula de mamífero não é de origem neuronal. Noutra concretização, a célula não neuronal é uma célula COS-7, uma célula de rim embrionário humano 293, uma célula LM(tk-) ou uma célula NIH-3T3.

Este invento proporciona um processo para preparar uma composição de matéria que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero que inclui identificar um composto químico utilizando um processo de acordo com este invento e seguidamente sintetizar o composto químico ou um seu

novo análogo ou homólogo estrutural e funcional. Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato.

Este invento proporciona um processo para preparar uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica que inclui misturar um transportador, por exemplo, um transportador farmaceuticamente aceitável, e uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um composto químico identificado por um processo de acordo com este invento ou um seu novo análogo ou homólogo estrutural e funcional. Numa concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano. Noutra concretização, o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato.

Deste modo, assim que se clone o gene de um subtipo de receptor alvo, coloca-se numa célula recebedora que então expressa o subtipo de receptor alvo na sua superfície. Esta célula, que expressa uma população simples de subtipo de receptor humano, é então propagada resultando no estabelecimento de uma linha celular. Esta linha celular, que constitui um sistema de revelar fármacos, é utilizada em dois tipos de ensaios diferentes: ensaios de ligação e ensaios funcionais. Em ensaios de ligação, mede-se a afinidade de um composto para o subtipo de receptor que é o alvo de um programa para encontrar determinado fármaco e para outros subtipos de receptor que podem estar associados a efeitos secundários. Estas medições permitem prever a potência de um composto, bem como o grau de selectividade que o composto tem para o subtipo de receptor alvo relativamente a outros subtipos de receptor. Os dados obtidos dos ensaios de ligação também permitem que os químicos concebam compostos mais ou menos dirigidos para um ou mais tipos de subtipos relevantes, como adequado, para eficácia terapêutica óptima. Em ensaios funcionais, determina-se a natureza da resposta do subtipo de receptor ao composto. Os dados dos ensaios funcionais mostram se o composto actua para inibir ou melhorar a actividade do subtipo de receptor, permitindo assim que os farmacologistas avaliem compostos rapidamente nos seus últimos alvos de subtipos de receptor humano permitindo que os químicos concebam racionalmente fármacos que serão mais eficazes e

terão menos efeitos secundários e substancialmente menos graves do que os fármacos existentes.

São bem conhecidas abordagens para conceber e sintetizar compostos selectivos para subtipos de receptor e incluem química médica tradicional e a nova tecnologia de química combinatória, ambas assistidas por modelação auxiliada por computador. Com tais abordagens, os químicos e farmacologistas utilizam os seus conhecimentos sobre as estruturas do subtipo de receptor alvo e compostos que se determinou que se ligam e/ou activam ou inibem a activação do subtipo de receptor para conceber e sintetizar estruturas que terão actividade nestes subtipos de receptor.

A química combinatória envolve síntese automatizada de uma variedade de compostos novos por sua montagem utilizando combinações diferentes de blocos de montagem químicos. A utilização de química combinatória acelera grandemente o processo de gerar compostos. As séries de compostos resultantes denominam-se bibliotecas e são utilizadas para rastrear compostos ("compostos líder") que demonstram um nível de actividade suficiente nos receptores de interesse. Utilizando química combinatória é possível sintetizar bibliotecas de compostos "focadas" que se antecipa que sejam altamente preferidos pelo receptor alvo de interesse.

Uma vez identificados os compostos líder, quer através da utilização de química combinatória, quer por química médica tradicional ou de outra forma, prepara-se uma variedade de homólogos e análogos para facilitar uma compreensão da relação entre a estrutura química e a actividade biológica ou funcional. Estes estudos definem relações de estrutura-actividade que são então utilizadas para conceber fármacos com potência, selectividade de propriedades farmacocinéticas melhoradas. A química combinatória é também utilizada para gerar rapidamente uma variedade de estruturas para optimização do líder. A química médica tradicional, que envolve a síntese de compostos um de cada vez, é também utilizada para refinamento adicional e para gerar compostos que não são acessíveis por técnicas automatizadas. Uma vez definidos tais fármacos, aumenta-se a escala da produção utilizando

metodologias de fabrico químico padrão utilizados na indústria farmacêutica e química.

Este invento será entendido de melhor forma a partir dos detalhes experimentais seguintes. Contudo, um perito na arte considerará facilmente que os métodos e resultados específicos discutidos são meramente ilustrativos do invento tal como descrito mais completamente nas reivindicações que depois se seguem.

DETALHES EXPERIMENTAIS

Materiais e métodos

Amplificação de ADNc iniciada com oligonucleótidos mistos (MOPAC)

Efectuou-se amplificação de ADNc iniciada com oligonucleótidos mistos (MOPAC) em vários moldes de ADN incluindo: ADN genómico de rato, ADNc proveniente de transcrição inversa de ARNm isolado da linha celular GH1 e da linha celular Rin14b. A reacção de MOPAC foi efectuada utilizando ADN-polimerase Taq (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) e os seguintes oligonucleótidos degenerados: JAB55, concebido com base no terceiro domínio transmembranar das famílias de receptores de galanina, somatostatina e opióides; e TL1020, concebido com base no 7º domínio transmembranar da família de receptores de galanina.

As condições para a reacção de PCR MOPAC foram as seguintes: manter 3 minutos a 94°C; 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 45 segundos a 44°C, 2 minutos a 72°C; 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 49°C durante 1 minuto e 45 segundos, 2 minutos a 72°C; manter 4 minutos a 72°C; manter a 4°C até estar pronto para electroforese em gel de agarose.

Correram-se os produtos num gel TAE em agarose a 1% e cortaram-se as bandas do tamanho esperado (~500-600 pb) do gel, purificaram-se utilizando o kit de extracção de gel QIAQUICK (QIAGEN, Chatsworth, CA) e subclonaram-se para o vector de clonagem TA (Invitrogen, San Diego, CA). Picaram-se colónias brancas (contendo a inserção) e sujeitaram-se a PCR

utilizando os iniciadores JAB1 e JAB2 de vector pCR2.1 utilizando o seguinte protocolo: manter a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto e 15 segundos; manter 2 minutos a 68°C, manter a 4°C até os produtos estarem prontos para purificação. Purificaram-se os produtos de PCR por precipitação com isopropanol (10 µl de produto de PCR, 18 µl de TE baixo, 10,5 µl de NaClO₄ 2 M e 21,5 µl de isopropanol) e sequenciaram-se utilizando o protocolo de ciclo de sequenciação ABI Big Dye e sequenciadores ABI 377 (ABI, Foster City, CA). Determinou-se que um destes produtos de PCR, mais tarde denominado SNORF25, é uma nova sequência do tipo receptor acoplada a proteína G com base em buscas em bases de dados e na sua homologia com outros receptores acoplados a proteína G conhecidos (~29% de identidade com os receptores conhecidos de dopamina D1, beta-adrenérgico 2b e 5-HT1f; 34% de identidade com o receptor 5-HT4l).

RACE 5' e 3'

Para determinar a sequência de codificação completa de SNORF25, utilizou-se o kit de amplificação de ADNc Clontech Marathon (Clontech, Palo Alto, CA) para amplificação rápida 5'/3' das extremidades de ADNc (RACE). Selecionou-se por Polia⁺ o ARN total de células Rin14b utilizando um kit de isolamento de ARNm FastTrack (Invitrogen). Para 5'RACE, sintetizou-se um ADNc em cadeia dupla a partir de 1 µg de ARN polia⁺ utilizando iniciador JAB73, um iniciador inverso do suposto quinto domínio transmembranar do fragmento de PCR descrito supra (SNORF25). Efectuou-se ligação de adaptador e PCR "nested" de acordo com o protocolo de amplificação de ADNc Marathon utilizando Klentaq Polymerase Advantage (Clontech, Palo Alto, CA). A PCR inicial foi efectuada numa diluição de 50 vezes do ADNc ligado utilizando o iniciador de adaptador 1 do fabricante e JAB71, um iniciador inverso da extremidade 5' do quinto domínio transmembranar do fragmento de PCR descrito supra. Reamplificou-se 1 µl desta reacção de PCR inicial utilizando o iniciador de adaptador 2 e JAB69, um iniciador inverso imediatamente a jusante do quarto domínio transmembranar. As condições para PCR foram 1 minuto a 94°C; 5 ciclos de 94°C durante 15 segundos e 72°C durante 1 minuto e 30 segundos; 5 ciclos de 94°C durante 15 segundos e 70°C

durante 1 minuto e 30 segundos; 22 ciclos de 94°C durante 15 segundos e 68°C durante 1 minuto e 30 segundos; manter a 68°C durante 5 minutos e manter a 4°C até que os produtos estejam prontos para análise. Isolou-se um fragmento de 600 pb do PCR "nested" de um gel TAE de agarose a 1% utilizando o kit QIAQUICK e sequenciou-se utilizando sequenciadores ABI 377 e sequenciação de ciclo de terminação BigDye, tal como descrito supra. As sequências foram analisadas utilizando o pacote Wisconsin (GCG, Genetics Computer Group, Madison, WI).

Para 3' RACE, sintetizou-se ADNc em cadeia dupla a partir de 1 µg de ARN polia⁺ utilizando o iniciador de síntese de ADNc CDS fornecido com o kit de amplificação de ADNc Marathon (Clontech). As condições de PCR para as reacções 3' RACE foram semelhantes às reacções 5' RACE, excepto pelo facto de se terem utilizado JAB74 e JAB72, iniciadores em sentido da sequência localizada entre o quinto e o sexto domínio transmembranar do novo fragmento de PCR do MOPAC descrito supra, em vez de JAB71 e JAB73, respectivamente. Isolou-se um fragmento de 1,4 kb de PCR "nested" de um gel TAE agarose a 1% utilizando o kit de purificação em gel QIAQUICK (QIAGEN) e sequenciou-se como supra.

Após determinar a sequência de codificação completa desta sequência de receptor, amplificou-se a região de codificação completa de ADNc da linha celular Rin14b e ADN genómico de rato utilizando o sistema de PCR Expand Long (Boehringer-Mannheim). Os iniciadores para esta reacção foram específicos para as regiões não traduzidas a 5' e a 3' de SNORF25 com locais de restrição *Bam*HI e *Hind*III incorporados nas extremidades 5' dos iniciadores 5' (JAB86) e 3' (JAB84), respectivamente. Os produtos desta reacção foram então digeridos com *Bam*HI e *Hind*III, subclonados para o local *Bam*HI/*Hind*III do vector de expressão pcDNA3.1 (-) e sequenciados em ambas as direcções utilizando iniciadores específicos de vector e iniciadores específicos de gene. A sequência em cadeia dupla do produto SNORF25 clonado de Rin14b estava de acordo com a sequência do mesmo gene amplificada de ADN genómico de rato. Esta construção de receptor/vector de expressão de SNORF25 de rato em pcDNA3.1(-) foi denominada pcDNA3.1-rSNORF25.

Clonagem por homologia do homólogo de SNORF25 humano

Para clonar o homólogo humano de SNORF25, conceberam-se duas sondas oligonucleotídicas com base no segundo (BB426) e no quinto (BB427) domínio transmembranar (TM) da sequência SNORF25 de rato e utilizaram-se para sondar uma biblioteca de cosmídeos genómicos humanos (Clontech). Ambos os iniciadores foram marcados nas extremidades com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP e transferase terminal (Promega, Madison, WI). A hibridação foi efectuada em condições de rigor médio: 40°C numa solução contendo formamida a 37,5%, 5x SSC (1x SSC em cloreto de sódio 0,15 M, citrato de sódio 0,015 M), 1x solução de Denhardt (polivinilpirrolidona a 0,02%, Ficoll a 0,02%, albumina de soro bovina a 0,02%), Tris 7 mM e ADN de esperma de salmão tratado com ultra-sons a 25 µg/ml. Lavaram-se os filtros três vezes durante 20 minutos à temperatura ambiente num tampão contendo 2x SSC/dodecilsulfato de sódio a 0,1%; duas vezes durante 20 minutos num tampão contendo 0,1x SSC/dodecilsulfato de sódio a 0,1% e exposto a -70°C a película Kodak BioMax MS na presença de um écran intensificador.

Repicaram-se clones de cosmídeo que hibridam com as sondas, riscaram-se placas e rastrearam-se uma segunda vez com as mesmas sondas para verificar e isolar as colónias positivas individuais sob as mesmas condições. Digeriu-se ADN de cosmídeo de colónias positivas com *Bam*HI e *Hind*III, correu-se num gel de agarose, transferiu-se para nitrocelulose e sondou-se com BB426 marcado com ^{32}P . Subclonou-se um fragmento de aproximadamente 1,9 kb do clone n.º 45a (biblioteca COS4) que hibridou com a sonda para um local *Bam*HI/*Hind*III de pEXJT3T7, um vector de expressão Okayama e Berg modificado a partir de pcEXV (Miller e Germain, 1986) para conter BstXI e outros locais de restrição adicionais, bem como promotores T3 e T7 (Stratagene) e sequenciou-se em ambas as cadeias tal como descrito supra. A construção do receptor SNORF25 humano neste vector denomina-se pEXJT3T7-hSNORF25. Analisou-se SNORF25 humano utilizando o utilitário GCG e determinou-se que continha a sequência completa de SNORF25 humano, com 80% de identidade de aminoácidos e 83% de identidade de nucleótidos com o receptor de rato.

Iniciadores de oligonucleótidos

Apresenta-se seguidamente uma lista de iniciadores e as suas sequências associadas que foram utilizados na clonagem destes receptores:

JAB55: 5'-TBDSYVYIGAYMGITAYVTKG-3' (SEQ ID NO:5)

TL1020: 5'-GAIRSIARIGMRTAIAYIAKIGGRTT-3' (SEQ ID NO:6)

JAB1: 5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG-3' (SEQ ID NO:7)

JAB2: 5'-ATGTGCTGCAAGGCGATTTAAGTTGGG-3' (SEQ ID NO:8)

JAB69: 5'-TGGTCTGCTGGAATATGGAG-3' (SEQ ID NO:9)

JAB71: 5'-CTTGGGTGAAACACAGCAAAGAAGG-3' (SEQ ID NO:10)

JAB72: 5'-ATGGAACATGCAGGAGCCATGGTTGG-3' (SEQ ID NO:11)

JAB73: 5'-AAGACAAAGAGGAGCACAGCTGGG-3' (SEQ ID NO:12)

JAB74: 5'-GCTCAAGATTGCCTCTGTGCACAG-3' (SEQ ID NO:13)

JAB84: 5'-ATCTATAAGCTTAGGCACTTGGAACATCCATTCC-3' (SEQ ID NO:14)

JAB86: 5'-ATCTATGGATCCTGTGAGAATCTGAGCTCAAGACCC-3' (SEQ ID NO:15)

BB426: 5'-TTCACCTTAAATCTGGCCGTGGCTGATACCTTGAT-TGGCGTGGCTATTTCTGGGCTAG-3' (SEQ ID NO:16)

BB427: 5'-GCTGTGTTTCACCCAAGGTTTGTGCTGACCCTCTC-CTGTGCTGGCTTCTTCCCAGCTGTGC-3' (SEQ ID NO:17)

Isolamento de homólogos de ADNc de receptor SNORF25 de outras espécies

Pode isolar-se uma sequência de ácido nucleico que codifica um ADNc de receptor SNORF25 de outras espécies utilizando técnicas e abordagens de biologia molecular padrão tal como as descritas abaixo:

Abordagem n.º 1: Pode rastrear-se uma biblioteca genómica (por exemplo, cosmídeo, fago, Pl, BAC, YAC) gerada da espécie de interesse com uma sonda oligonucleotídica marcada com ^{32}P correspondendo a um fragmento de receptores SNORF25 humano ou de rato cuja sequência se mostra nas figuras 1A-1B e 3A-3B para isolar um clone genómico. A sequência completa pode ser obtida por sequenciação deste clone genómico. Caso estejam presentes um ou mais intrões no gene, o gene completo sem intrões pode ser obtido a partir de ADNc utilizando técnicas padrão de biologia molecular. Por exemplo, um iniciador de PCR em sentido concebido na 5'UT e um iniciador de PCR inverso concebido na 3'UT pode ser utilizado para amplificar um receptor sem intrões completo a partir de ADNc. Podem utilizar-se técnicas de biologia molecular padrão para subclonar este gene para um vector de expressão de mamífero.

Abordagem n.º 2: Podem ser utilizadas técnicas de biologia molecular padrão para rastrear bibliotecas de fago de ADNc comercial da espécie de interesse por hibridação em condições de rigor baixas com uma sonda oligonucleotídica marcada com ^{32}P correspondente a um fragmento das sequências apresentadas nas figuras 1A-1B ou 3A-3B. Pode isolar-se um receptor SNORF25 completo por obtenção de um clone de placa purificado de bibliotecas lambda e seguidamente sujeitando o clone para dirigir sequenciação de ADN. Alternativamente, poderiam ser utilizadas técnicas de biologia molecular padrão para rastrear bibliotecas de plasmídeo de ADNc por amplificação por PCR de conjuntos de bibliotecas utilizando iniciadores concebidos contra uma sequência homóloga de uma espécie parcial. Pode isolar-se um clone completo por hibridação de *Southern* de decalques de colónias de conjuntos positivos de uma sonda oligonucleotídica com ^{32}P .

Abordagem n.º 3: Pode utilizar-se RACE 3' e 5' para gerar produtos de PCR a partir de ADNc derivado da espécie de interesse que expressa SNORF25 que contém a sequência adicional de SNORF25. Estes produtos de PCR RACE podem ser então sequenciados para determinar a sequência adicional. Esta nova sequência é então utilizada para conceber um iniciador de PCR em sentido na 5'UT e um iniciador inverso na 3'UT. Estes iniciadores são então utilizados para amplificar um clone de SNORF25 completo a partir de ADNc.

São exemplos de outras espécies, entre outros, ratinho, cão, burro, *hamster* e porquinho-da-índia.

Células hospedeiras

Pode utilizar-se uma vasta variedade de células hospedeiras para estudar proteínas expressas de forma heteróloga. Estas células incluem, entre outras, linhas celulares de mamífero, tais como; Cos-7, CHO, LM(tk-), HEK293, etc.; linhas celulares de insecto, tais como; Sf9, Sf21, etc.; células de anfíbio, tais como oócitos de *Xenopus*; estirpes de leveduras variadas; estirpes de células bacterianas variadas; e outras. As condições de cultura para cada um destes tipos de células são específicas e são conhecidas dos peritos na arte. As células utilizadas para expressar receptor SNORF25 foram células Cos-7 e células de ovário de *hamster* chinês (CHO).

Cultivam-se células COS-7 em placas de 150 mm em DMEM com suplementos (meio Eagle modificado da Dulbecco com soro de vitelo a 10%, glutamina 4 mM, penicilina a 100 unidades/ml/estreptomicina a 100 µg/ml) a 37°C, CO₂ a 5%. Sujeitam-se placas-mãe de células COS-7 a tripsinização e dividem-se a 1:6 a cada 3-4 dias.

Cultivam-se as células CHO em placas de 150 mm em meio F-12 de HAM com suplementos (soro de vitelo a 10%, L-glutamina 4 mM e penicilina a 100 unidades/ml/estreptomicina a 100 µg/ml) a 37°C, CO₂ a 5%. Sujeitam-se as placas-mãe de células CHO a tripsinização e dividem-se a 1:8 a cada 3-4 dias.

Expressão transitória

Pode expressar-se transitoriamente ADN que codifica proteínas em estudo numa variedade de linhas celulares de mamífero, insecto, anfíbio, levedura, bactérias e outras por vários métodos, tais como, entrega mediada por fosfato de cálcio, mediada por DEAE-dextrano, mediada por lipossoma, mediada por vírus, mediada por electroporação e entrega por micro-injecção. Cada um destes métodos pode requerer optimização de diversos parâmetros experimentais dependendo do ADN, linha celular e do tipo de ensaio a ser utilizado

subsequentemente. O método de electroporação foi utilizado para transfectar transitoriamente várias linhas celulares com ADNc de SNORF25.

Descreve-se abaixo um protocolo típico para o método de electroporação tal como aplicado a células Cos-7. Dividem-se as células a serem utilizadas para transfecção 24 horas antes da transfecção para obter frascos que são sub-confluentes na altura de transfecção. Recolhem-se células por tripsinização, ressuspendem-se no seu meio de cultura e contam-se. Suspendem-se 5×10^6 células em 300 μ l de DMEM e colocam-se numa cuvete de electroporação. Adiciona-se 8 μ g de ADN receptor mais 8 μ g de qualquer ADN adicional necessário (por exemplo vector de expressão de proteína G, construção de repórter, marcador de resistência a antibiótico, vector simulado, etc.) à suspensão celular, coloca-se a cuvete num gerador de impulsos BioRad e sujeita-se a um impulso eléctrico (parâmetros do gerador de impulsos: voltagem 0,25 kV, capacitância 950 μ F). Após o impulso, adiciona-se 800 μ l de DMEM completo a cada cuvete e transfere-se a suspensão para um tubo estéril. Adiciona-se meio completo a cada tubo para uma concentração celular final de 1×10^5 células/100 μ l. Plaqueiam-se então as células como necessário, dependendo do tipo de ensaio a efectuar.

Expressão estável

Pode incorporar-se estavelmente ADN heterólogo em células hospedeiras, de modo que a célula expresse perpetuamente uma proteína heteróloga. Os métodos para a entrega do ADN a uma célula são semelhantes aos descritos supra para expressão transitória mas é necessária a co-transfecção de um gene auxiliar para conferir resistência a fármacos às células hospedeiras alvo. A resistência a fármacos resultante pode ser explorada para seleccionar e manter células que absorveram o ADN. Encontram-se disponíveis diversos genes de resistência incluindo, entre outros, neomicina, canamicina e higromicina. Para os propósitos de estudos relativos ao receptor deste invento, efectua-se tipicamente expressão estável de uma proteína receptora heteróloga em células de mamífero, incluindo, entre outras, CHO, HEK293, LM(tk-), etc.

Adicionalmente, podem utilizar-se as linhas celulares nativas que contêm e expressam naturalmente as sequências de ácido nucleico para o receptor sem a necessidade de modificar racionalmente o complementar do receptor.

Preparações de membranas

As membranas celulares que expressam a proteína receptora de acordo com este invento são úteis para determinados tipos de ensaios incluindo, entre outros, ensaios de ligação de ligando, ensaios de ligação de GTP- γ -S e outros. As especificidades de preparação de tais membranas celulares podem em alguns casos ser determinadas pela natureza do ensaio subsequente mas envolvem tipicamente recolha de células inteiras e ruptura de um sedimento de células por ultra-sons em tampão gelado (por exemplo Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4). O lisado celular impuro resultante é purificado de resíduos celulares por centrifugação a baixa velocidade a 200 x g durante 5 min a 4°C. O sobrenadante purificado é então centrifugado a 40 000 x g durante 20 min a 4°C e lava-se o sedimento membranar resultante por suspensão em tampão gelado e repetição da etapa de centrifugação a alta velocidade. Suspende-se o sedimento membranar lavado final em tampão de ensaio. Determinam-se as concentrações de proteína pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. As membranas podem ser utilizadas imediatamente ou congeladas para utilização posterior.

Geração de baculovírus

A região de codificação de ADN que codifica o receptor humano aqui revelado pode ser subclonada para pBlueBacIII em locais de restrição existentes ou locais concebidos racionalmente nas sequências a 5' e 3' da região de codificação dos polipéptidos. Para gerar baculovírus, podem co-transfectar-se 0,5 μ g de ADN vírico (BaculoGold) e 3 μ g de construção de ADN que codifica um polipéptido para 2×10^6 células Sf9 de insecto *Spodoptera frugiperda* pelo método de co-precipitação de fosfato de cálcio, como resumido por Pharmingen (em "Baculovirus Expression Vector System: Procedures and Methods Manual"). As células são então incubadas durante 5 dias a 27°C.

Pode recolher-se o sobrenadante da placa de co-transfecção por centrifugação e purificar-se a placa de vírus recombinante. Os procedimentos para infectar células com vírus para preparar reservas de vírus e para titular as reservas de vírus são descritos no manual da Pharmingen.

Ensaaios de ligação com ligando marcado

Podem utilizar-se as células que expressam o receptor de acordo com este invento para rastrear ligandos para os referidos receptores, por exemplo, através de ensaios de ligação com ligando marcado. Uma vez identificado um ligando podem utilizar-se os mesmos ensaios para identificar agonistas ou antagonistas do receptor que podem ser utilizados para vários objectivos terapêuticos.

Numa concretização, colocam-se ligandos marcados em contacto com preparações membranares ou células intactas que expressam o receptor em placas de microtitulação multi-poços, conjuntamente com compostos não marcados e tampão de ligação. Incubam-se as misturas reaccionais de ligação durante intervalos e temperaturas determinados como óptimas em ensaios de ligação de equilíbrio independentes. A reacção é parada por filtração através de filtros GF/B, utilizando um dispositivo de recolha de células ou por medição directa do ligando ligado. Se o ligando estiver marcado com um isótopo radioactivo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , etc., o ligando ligado pode ser detectado por utilização de contagem de cintilação em líquido, proximidade de cintilação ou qualquer outro método de detecção para isótopos radioactivos. Se o ligando estiver marcado com um composto fluorescente, o ligando marcado ligado por ser medido por métodos tais como, entre outros, intensidade de fluorescência, fluorescência resolvida no tempo, polarização de fluorescência, transferência de fluorescência ou espectroscopia de correlação de fluorescência. Desta forma, podem ser identificados compostos agonistas ou antagonistas que se ligam ao receptor dado que inibem a ligação do ligando marcado à proteína membranares ou células intactas que expressam o receptor. Define-se ligação não específica como a quantidade de ligando marcado que permanece após incubação da proteína membranares na presença de uma concentração elevada (por exemplo, 100-1000 X

K_D) de ligando não marcado. Em ensaios de ligação de saturação de equilíbrio, incubam-se preparações membranares ou células intactas transfectadas com o receptor na presença de concentrações crescentes do composto marcado para determinar a afinidade de ligação do ligando marcado. As afinidades de ligação de compostos não marcados podem ser determinadas em ensaios de ligação de equilíbrios competitivos, utilizando uma concentração fixa do composto marcado na presença de várias concentrações dos ligandos de deslocamento.

Ensaaios funcionais

Podem utilizar-se células que expressam o ADN de receptor SNORF25 para rastrear ligandos para receptor SNORF25 utilizando ensaios funcionais. Uma vez identificado um ligando, podem utilizar-se os mesmos ensaios para identificar agonistas ou antagonistas do receptor SNORF25 que podem ser utilizados para vários objectivos terapêuticos. É bem conhecido dos peritos na arte que a sobre-expressão de um GPCR pode resultar na activação constitutiva de vias de sinalização intracelular. Da mesma forma, a sobre-expressão do receptor SNORF25, em qualquer linha celular tal como descrito supra, pode resultar na activação das respostas funcionais descritas abaixo e podem utilizar-se qualquer dos ensaios aqui descritos para rastrear ligandos agonistas e antagonistas do receptor SNORF25.

Pode utilizar-se uma vasta gama de ensaios para rastrear a presença de ligandos de receptor SNORF25. Estes ensaios vão desde medições tradicionais de acumulação total de fosfato de inositol, níveis de AMPc, mobilização de cálcio intracelular e correntes de potássio, por exemplo, a sistemas que medem estes mesmos segundos mensageiros mas que foram modificados ou adaptados para ser de mais alto rendimento, mais genéricos e mais sensíveis; a ensaios baseados em células que relatam eventos celulares mais genéricos resultantes de activação de receptor, tais como alterações metabólicas, diferenciação, divisão/proliferação celular. Segue-se a descrição de vários tais ensaios.

Ensaio de AMP cíclico (AMPC)

A estimulação ou inibição de formação de AMP cíclico (AMPC) mediada por receptor pode ser ensaiada em células que expressam os receptores. Plaqueiam-se células em placas de 96 poços ou outros recipientes e pré-incubam-se num tampão tal como solução salina tamponada com HEPES (NaCl (150 mM), CaCl_2 (1 mM), KCl (5 mM), glicose (10 mM)) suplementado com um inibidor de fosfodiesterase tal como teofilina 5 mM, com ou sem mistura de inibidor de protease (por exemplo, uma mistura de inibidor típica contém aprotinina a 2 µg/ml, leupeptina a 0,5 mg/ml e fosforamidon a 10 µg/ml) durante 20 min a 37°C, em CO_2 a 5%. Adicionam-se os compostos de ensaio com ou sem forskolina 10 mM e incubam-se durante 10 min adicionais a 37°C. Aspira-se então o meio e para-se a reacção por adição de HCl 100 mM ou outros métodos. Armazenam-se as placas a 4°C durante 15 min e mede-se o teor de AMPC na solução de paragem por radioimunoensaio. A radioactividade pode ser quantificada utilizando um contador gama equipado com utilitário de redução de dados. Podem efectuar-se modificações específicas para optimizar o ensaio para o receptor ou para alterar o método de detecção de AMPC.

Ensaio de libertação de ácido araquidónico

Inoculam-se células que expressam o receptor em placas de 96 poços ou outros recipientes e cultivam-se durante 3 dias em meio com suplementos. Adiciona-se ^3H -ácido araquidónico (actividade específica = 0,75 µCi/ml) como uma alíquota de 100 µl a cada poço e incubam-se as amostras a 37°C, CO_2 a 5% durante 18 horas. Lavam-se as células marcadas três vezes com meio. Enchem-se os poços com meio e inicia-se o ensaio com a adição de compostos de ensaio ou tampão num volume total de 250 µl. Incubam-se as células durante 30 min a 37°C, CO_2 a 5%. Transferem-se os sobrenadantes para uma placa de microtitulação e evapora-se à secura a 75°C numa estufa de vácuo. Dissolvem-se então as amostras e ressuspendem-se em 25 µl de água destilada. Adiciona-se cintilante (300 µl) a cada poço e contam-se as amostras para ^3H num leitor de placas Trilux. Analisam-se os dados utilizando regressão não linear e técnicas estatísticas disponíveis no pacote GraphPAD Prism (San Diego, CA).

Ensaio de fosfato de inositol

Pode avaliar-se a activação mediada por receptor SNORF25 das vias de segundo mensageiro de fosfato de inositol (IP) por medição radiométrica de produtos IP.

Plaqueiam-se células num ensaio em formato de microplacas de 96 poços a uma densidade de 70 000 células por poço e deixa-se incubar durante 24 horas. Marcam-se então as células com 0,5 µCi de [³H]-mio-inositol durante a noite a 37°C, CO₂ a 5%. Imediatamente antes do ensaio, remove-se o meio e substitui-se com 90 µl de PBS contendo LiCl 10 mM. Incubam-se então as placas durante 15 min a 37°C, CO₂ a 5%. A seguir à incubação, provocam-se células com agonista (10 µl/poço; concentração 10x) durante 30 min a 37°C, CO₂ a 5%. Termina-se a provocação por adição de 100 µl de ácido tricloroacético a 50% v/v, seguido por incubação a 4°C durante mais de 30 minutos. Isola-se IP totais do lisado por cromatografia de permuta iónica. Sucintamente, transfere-se o conteúdo lisado dos poços para uma placa de filtro Multiscreen HV (Millipore) contendo Dowex AG1-X8 (200-400 mesh, forma de formato). Preparam-se as placas de filtro por adição de 100 µl de suspensão de Dowex AG1-X8 (50% v/v, água:resina) a cada poço. Colocam-se as placas de filtro num tubo de distribuição de vácuo para lavar ou eluir o leite da resina. Cada poço é primeiramente lavado 2 vezes com 200 µl de mio-inositol 5 mM. Eluem-se os fosfatos de [³H]-inositol totais com 75 µl de solução de formato de amónio 1,2 M/ácido fórmico 0,1 M para placas de 96 poços. Adiciona-se 200 µl de mistura de cintilação a cada poço e determina-se a radioactividade por contagem de cintilação em líquido.

Ensaio de mobilização de cálcio intracelular

A concentração de cálcio livre intracelular pode ser medida por micro-espectrofluorimetria utilizando o corante indicador fluorescente Fura-2/AM (Bush et al, 1991). Inoculam-se células que expressam o receptor para uma placa de cultura de 35 mm contendo uma inserção de lamela de vidro e deixam-se aderir durante a noite. Lavam-se então as células com HBS e carregam-se com 100 µl de Fura-2/AM (10 µM) durante 20 a 40 min. Após lavagem com HBS para remover a solução de

Fura-2/AM, equilibram-se as células em HBS durante 10 a 20 min. Visualizam-se então as células com uma objectiva 40X num microscópio Leitz Fluovert FS e determina-se a emissão de fluorescência a 510 nM com comprimentos de onda de excitação alternado entre 340 nM e 380 nM. Os dados de fluorescência não tratados foram convertidos em concentrações de cálcio utilizando curvas padrão de concentração de cálcio e utilitários de técnicas de análise.

Noutro método, a medição de cálcio intracelular também pode ser efectuada num formato de 96 poços (ou mais) e com indicadores sensíveis a cálcio alternativos, sendo exemplos preferidos: aequorina, Fluo-3, Fluo-4, Fluo-5, Verde-1 de cálcio, Verde de Orégão e 488 BAPTA. Após activação dos receptores com ligandos agonistas a emissão induzida pela alteração da concentração de cálcio intracelular é medida por um luminómetro ou imagem de fluorescência; um exemplo preferido é o leitor de placas de imagem de fluorescência (FLIPR).

Plaqueiam-se as células que expressam o receptor de interesse em placas de 96 poços transparentes e de fundo plano com paredes pretas (Costar) a uma densidade de 80 000-150 000 células por poço e deixam-se incubar durante 48 h, CO₂ a 5%, 37°C. Aspira-se o meio de cultura e adiciona-se 100 µl de meio de carga contendo o corante fluo-3 a cada poço. O meio de carga contém: BSS de Hank (sem vermelho de fenol) (Gibco), HEPES 20 mM (Sigma), BSA a 0,1 ou 1% (Sigma), mistura de corante/ácido plurónico (por exemplo Fluo-3 1 mM, AM (Molecular Probes) e ácido plurónico a 10% (Molecular Probes) misturado imediatamente antes de utilização) e probenecida 2,5 mM (Sigma) (preparada de fresco). Deixam-se as células incubar durante cerca de 1 hora, CO₂ a 5%, 37°C.

Durante a incubação de carga de corante, prepara-se a placa de composto. Diluem-se os compostos em tampão de lavagem (BSS de Hank (sem vermelho de fenol), HEPES 20 mM, probenecida 2,5 mM) para uma concentração final 4X e separa-se em alíquotas para uma placa transparente de fundo em v (Nunc). Após a incubação, lavam-se as células para remover o excesso de corante. Utiliza-se um lavador de placas Denley para lavar suavemente as células 4 vezes e deixa-se um volume final de

100 µl de tampão de lavagem em cada poço. Coloca-se uma placa de células no tabuleiro central e coloca-se a placa de compostos no tabuleiro direito do FLIPR. O utilitário de FLIPR é preparado para a experiência, efectua-se a experiência e obtêm-se os dados. Os dados são então analisados utilizando uma folha de cálculo do utilitário excel.

Identificam-se ligandos antagonistas por inibição do sinal induzido pelos ligandos agonistas.

Ensaio funcional de GTPγS

Suspendem-se membranas de células que expressam o receptor em tampão de ensaio (por exemplo, Tris 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, GDP 10 µM, pH 7,4) com ou sem inibidores de protease (por exemplo, bacitracina a 0,1%). Incubam-se as membranas em gelo durante 20 minutos, transferem-se para uma placa de filtro GF/C de microtitulação de 96 poços Millipore e misturam-se com GTPγ³⁵S (por exemplo, 250 000 cpm/amostra, actividade específica ≈1000 Ci/mmol) mais ou menos GTPγS não marcado (concentração final = 100 µM). Concentração final de proteína membrana = 90 µg/ml. Incubam-se as amostras na presença ou ausência dos compostos de ensaio durante 30 min. À temperatura ambiente, seguidamente filtram-se num tubo de distribuição de vácuo Millipore e lavam-se três vezes com tampão de ensaio frio (4°C). As amostras recolhidas na placa de filtro são tratadas com cintilante e conta-se ³⁵S num contador de cintilação em líquido Trilux (Wallac). Espera-se obter resultados óptimos quando a preparação de receptores de membrana é derivada de um sistema de expressão heterólogo concebido racionalmente de forma adequada, ou seja, um sistema de expressão que resulta em elevados níveis de expressão do receptor e/ou que expressa proteínas G com elevadas taxas de débito catalítico (para a permuta de GTP por GDP). São bem conhecidas dos peritos na arte ensaios de GTPγS e considera-se que se podem utilizar variações do método descrito supra, tal como descritas por Tian et al. (1994) ou Lazareno e Birdsall (1993).

Ensaio microfisiométrico

Dado que o metabolismo celular está intrincadamente envolvido numa vasta gama de eventos celulares (incluindo activação de receptor de várias vias de mensageiro), a utilização de medições microfisiométricas de metabolismo celular pode, em princípio, proporcionar um ensaio genérico de actividade celular resultante da activação de qualquer receptor independentemente das especificidades da via de sinalização do receptor.

As orientações gerais para expressão transitória de receptor, preparação celular e registo microfisiométrico são descritos noutra sítio (Salon, J. A. e Owicki, J. A., 1996). Tipicamente, recolhem-se células que expressam receptores e inoculam-se a 3×10^5 células por cápsula de microfisiómetro em meio completo, 24 h antes de uma experiência. Substitui-se o meio com meio isento de soro 16 horas antes de registar, para minimizar estimulação metabólica não específica por factores de soro variados e mal definidos. No dia da experiência, transferem-se as cápsulas de células para o microfisiómetro e deixam-se equilibrar em meio de registo (tampão baixo RPMI 1640, sem bicarbonato, nem soro (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) contendo BSA isenta de ácidos gordos a 0,1%), durante a qual se estabelece a medição da linha de base da actividade metabólica basal.

Um protocolo de registo padrão especifica um caudal de 100 µl/min, com um ciclo de bomba de um total de 2 min que inclui uma interrupção de fluxo de 30 s durante o qual se mede a taxa de acidificação. A provocação de ligando envolve uma exposição de 1 min 20 s à amostra imediatamente antes de se efectuar a primeira medição de taxa pós-provocação, seguido por dois ciclos de bomba adicionais durante um total de 5 min 20 s de exposição de amostra. Tipicamente, apresentam-se os fármacos a células num rastreio primário a uma concentração final de 10 µM. Efectuam-se então experiências de seguimento para examinar a dependência com a dose dos compostos activos por provocação sequencial das células com uma gama de concentrações de fármaco superior à quantidade necessária para gerar respostas desde o limiar inferior aos níveis máximos. Lavam-se então as amostras de ligando e expressam-se as taxas

de acidificação registadas como uma percentagem de aumento da resposta de pico relativamente à taxa de linha de base verificada imediatamente antes de provocação.

Ensaio de MAP quinase

Pode monitorar-se MAP quinase (quinase activada por mitogénio) para avaliar a activação de receptor. A MAP quinase é inactivada por várias vias numa célula. Um modo primário de activação envolve a via ras/raf/MEK/MAP quinase. Os receptores de factor de crescimento (tirosina quinase) alimentam esta via através de SHC/Grb-2/SOS/ras. Sabe-se também que os receptores acoplados a Gi activam ras e produzem subsequentemente uma activação de MAP quinase. Os receptores que activam fosfolipase C (tal como acoplados a Gq/G11) produzem diacilglicerol (DAG) em consequência de hidrólise de fosfatidil-inositol. DAG activa proteína quinase C que por seu lado fosforila MAP quinase.

A activação de MAP quinase pode ser detectada através de várias abordagens. Uma abordagem baseia-se numa avaliação do estado de fosforilação, quer não fosforilado (inactivo), quer fosforilado (activo). A proteína fosforilada tem uma mobilidade menor em SDS-PAGE e pode assim ser comparada com a proteína não estimulada utilizando transferência de *Western*. Alternativamente, estão disponíveis anticorpos específicos para a proteína fosforilada (New England Biolabs) que podem ser utilizados para detectar um aumento da quinase fosforilada. Em qualquer dos métodos, estimulam-se células com o composto de ensaio e seguidamente extraem-se com tampão Laemmli. Aplica-se a fracção solúvel num gel de SDS-PAGE, transferem-se as proteínas electroforéticamente para nitrocelulose ou Immobilon. Detectam-se as bandas imunorreactivas pela técnica de hibridação de *Western* padrão. Registam-se os sinais visíveis ou quimioluminescentes em película e podem ser quantificados por densitometria.

Outra abordagem baseia-se na avaliação da actividade de MAP quinase através de um ensaio de fosforilação. Estimulam-se as células com o composto de ensaio e prepara-se um extracto solúvel. O extracto é incubado a 30°C durante 10 min com gama-³²P-ATP, um sistema de regeneração de ATP e um substrato

específico para MAP quinase, tal como proteína estável a ácido e calor fosforilada regulada por insulina ou PHAS-I. Termina-se a reacção pela adição de H_3PO_4 e transferem-se as amostras para gelo. Transfere-se uma alíquota para papel de cromatografia Whatman P81, que retém a proteína fosforilada. Lava-se o papel de cromatografia e conta-se ^{32}P num contador de cintilação de líquido. Alternativamente, incuba-se o extracto celular com gama- ^{32}P -ATP, um sistema de regeneração de ATP e proteína básica mielina biotinilada ligada por estreptavidina a um suporte de filtro. A proteína básica de mielina é um substrato para MAP quinase activada. A reacção de fosforilação é efectuada durante 10 min a 30°C . O extracto pode ser então aspirado através do filtro, que retém a proteína básica de mielina fosforilada. Lava-se o filtro e conta-se ^{32}P por contagem de cintilação de líquido.

Ensaio de proliferação celular

A activação de receptor do receptor pode levar a uma resposta mitogénica ou proliferativa que pode ser monitorizada por absorção de ^3H -timidina. Quando se incubam as células cultivadas com ^3H -timidina, a timidina desloca-se para os núcleos onde é fosforilada a timidina-trifosfato. O nucleótido-trifosfato é então incorporado no ADN celular a uma velocidade que é proporcional à velocidade de crescimento celular. Tipicamente, cultivam-se células numa cultura durante 1-3 dias. Forçam-se as células até quiescência por remoção de soro durante 24 h. Adiciona-se então um agente mitogénico ao meio. Vinte e quatro horas mais tarde, incubam-se células com ^3H -timidina com actividades específicas na gama de 1 a 10 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 2-6 h. Os procedimentos de recolha podem envolver tripsinização e armadilha de células por filtração em filtros de GF/C com ou sem uma incubação prévia em TCA para extrair timidina solúvel. Processam-se os filtros com cintilante e conta-se ^3H por contagem de cintilação de líquido. Alternativamente, fixam-se células aderentes em MeOH ou TCA, lavam-se com água e solubilizam-se em desoxicolato a 0,05%/NaOH 0,1 N. Transfere-se o extracto solúvel para frascos de cintilação e conta-se ^3H por contagem de cintilação de líquido.

Alternativamente, pode ensaiar-se proliferação celular por medição da expressão de um produto génico endógeno ou heterólogo, expresso por uma linha celular utilizada para transfectar o receptor, que pode ser detectado por métodos tal como, entre outros, intensidade de fluorescência, actividade enzimática, imunorreactividade, hibridação de ADN, reacção de polimerização em cadeia, etc.

Ensaaios de segundo mensageiro promíscuo

Não é possível prever *a priori* e com base apenas na sequência GPCR, quais das várias diferentes vias de sinalização celular serão utilizadas naturalmente por um determinado receptor. É possível contudo aproveitar receptores de diferentes classes funcionais para sinalizar através de uma via pré-seleccionada, através da utilização de subunidades G_α promíscuas. Por exemplo, proporcionando uma subunidade G_i promíscua fornecida endogenamente (subunidade tal como $G_{\alpha 15}$ ou $G_{\alpha 16}$ ou uma subunidade quimérica G_α , tal como $G_{\alpha qz}$, um GPCR, que normalmente prefere acoplar através de uma via de sinalização específica (por exemplo, G_s , G_i , G_q , G_0 , etc.)) a um sistema de ensaio de receptor baseado em células pode fazer-se acoplar através da via definida pela subunidade G_α promíscua e através de activação de agonista produzir o segundo mensageiro associado com essa via da subunidade. No caso de $G_{\alpha 15}$, $G_{\alpha 16}$ e/ou $G_{\alpha qz}$ tal envolveria activação da via G_q e produção do segundo mensageiro IP_3 . Através da utilização de estratégias e ferramentas semelhantes, é possível desviar a sinalização de receptor para vias que produzem diferentes segundos mensageiros tal como Ca^{++} , AMPc e correntes de K^+ , por exemplo (Milligan, 1999).

Consequentemente, a interacção promíscua da subunidade G_α fornecida endogenamente com o receptor torna desnecessário efectuar um ensaio diferente para cada via de sinalização possível e aumenta as hipóteses de detectar um sinal funcional por activação de receptor.

Métodos para registar correntes em oócitos de *Xenopus*

Recolhem-se oócitos de *Xenopus laevis* e injectam-se com produtos de transcrição de ARNm tal como descrito previamente

(Quick e Lester, 1994; Smith et al., 1997). O receptor de ensaio deste invento e os produtos de transcrição de ARN da subunidade $G\alpha$ são sintetizados utilizando a T7 polimerase ("Message Machine", Ambion) a partir de plasmídeos linearizados ou produtos de PCR contendo a região de codificação completa dos genes. Injectam-se os oócitos com 10 ng de ARN de receptor sintético e incubam-se durante 3-8 dias a 17 graus. Três a oito horas antes do registo, injectam-se oócitos com 500 pg de ARNm de subunidades $G\alpha$ promíscuas de modo a observar acoplamento a correntes de Cl^- activadas por Ca^{++} . Efectua-se bloqueamento de voltagem com dois eléctrodos (Axon Instruments Inc.) utilizando microeléctrodos de vidro cheios com KCl 3 M, com resistências de 1-2 MOhm. Salvo indicação em contrário, bloqueia-se a voltagem em oócitos a um potencial constante de -80 mV. Durante o registo, banham-se os oócitos em fluxo contínuo (1-3 ml/min) de meio contendo NaCl 96 mM, KCl 2 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, $MgCl_2$ 1 mM e HEPES 5 mM, pH 7,5 (ND96). Aplicam-se os fármacos quer por perfusão local de um tubo capilar de vidro de 10 μ l fixado a uma distância de 0,5 mm do oócito, quer por mudança para uma série de linhas de perfusão de alimentação por gravidade.

Podem injectar-se outros oócitos com uma mistura de ARNm de receptor e ARNm sintético que codifica os genes para canais rectificadores para o interior activados por proteína G (GIRK1 e GIRK4, patentes U.S. N.º 5 734 021 e 5 728 535 ou GIRK1 e GIRK2) ou quaisquer outras combinações adequadas (consultar, por exemplo, Inanobe et al., 1999). Podem obter-se os genes que codificam proteína G de canais de K^+ rectificadores para o interior (GIRK) canais 1, 2 e 4 (GIRK1, GIRK2 e GIRK4) por PCR utilizando as sequências publicadas (Kubo et al., 1993; Dascal et al., 1993; Krapivinsky et al., 1995 e 1995b) para derivar iniciadores 5' e 3' adequados. Pode utilizar-se ADNc de coração ou cérebro humano como molde conjuntamente com iniciadores adequados.

A expressão heteróloga de GPCR em oócitos de *Xenopus* tem sido vastamente utilizada para determinar a identidade das vias de sinalização activadas por estimulação com agonista (Gundersen et al., 1983; Takahashi et al., 1987). A activação da via de fosfolipase C (PLC) é ensaiada por aplicação de um

composto de ensaio em solução ND96 a oócitos previamente injectados com ARNm para o receptor SNORF25 e determinando as correntes para o interior a um potencial constante de aproximadamente -80 mV. O aparecimento de correntes que invertem a -25 mV e apresentam outras propriedades do canal de Cl^- activado por Ca^{++} é indicativo de activação de receptor de PLC e libertação de IP_3 e Ca^{++} intracelular. Tal actividade é apresentada por GPCR que acoplam a G_q ou G_{11} .

O envolvimento da classe de proteínas G, $G_{i/o}$ em correntes de Cl^- activadas por Ca^{++} estimuladas por GPCR avalia-se utilizando PTX, uma toxina que inactiva a proteínas G, $G_{i/o}$. Injectam-se oócitos com 25 ng de PTX/oócito e avalia-se subsequentemente a modulação de correntes de Cl^- activadas por Ca^{++} pelo receptor SNORF25 após 2-5 h.

A elevação de AMPc intracelular pode ser monitorizada em oócitos por expressão do regulador de condutância transmembranar de fibrose quística (CFTR) cujo poro selectivo a Cl^- abre em resposta a fosforilação por proteína quinase A (Riordan, 1993). De modo a preparar produtos de transcrição de ARN para expressão em oócitos, cria-se um molde por PCR utilizando iniciadores 5' e 3' derivados da sequência publicada do gene CFTR (Riordan, 1993). O iniciador 5' incluiu a sequência de codificação de T7 polimerase de modo a ser possível gerar produtos de transcrição directamente dos produtos de PCR sem clonagem. Injectaram-se oócitos com 10 ng de ARNm de CFTR além de 10-15 ng de ARNm de SNORF25. Os registos electrofisiológicos foram efectuados em solução ND96 após uma incubação de 2-3 dias a 18°C. Registaram-se as correntes com bloqueamento de voltagem com eléctrodo duplo (Axon Instruments Inc.) com microeléctrodos de vidro cheios com KCl 3 M com resistências de 1-2 Mohm. Salvo indicação em contrário, bloqueia-se a voltagem dos oócitos a um potencial constante de -80 mV. Durante o registo, banham-se os oócitos em fluxo contínuo (1-3 ml/min) de meio contendo NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1 mM e HEPES 5 mM, pH 7,5 (ND96). Aplicam-se os fármacos quer por perfusão local de um tubo capilar de vidro de 10 μl fixado a uma distância de 0,5 mm do oócito, quer por mudança para uma série de linhas de perfusão de alimentação por gravidade.

A activação de proteína G, G_i e G_o pode ser monitorizada por medição da actividade de canais de K^+ (potássio) rectificadores para o interior (GIRK). A actividade pode ser monitorizada em oócitos que foram co-injectados com ARNm que codificam o receptor de mamífero mais as subunidades GIRK. Os produtos génicos GIRK montam-se conjuntamente para formar um canal de potássio activado por proteína G que se sabe ser activado (ou seja, estimulado) por vários GPCR que acoplam a G_i ou G_o (Kubo et al., 1993; Dascal et al., 1993). Os oócitos que expressam o receptor de mamífero mais as subunidades GIRK são ensaiados para sensibilidade a composto de ensaio por medição de correntes de K^+ em solução de K^+ elevado, contendo K^+ 49 mM.

Localização de ARNm que codifica SNORF25 humano e de rato.

Métodos: RT-PCR quantitativo utilizando uma sonda fluorogénica com detecção em tempo real.

Utilizou-se RT-PCR quantitativo com sondas fluorogénicas e um painel de ARNm extraído de tecido humano e de rato para caracterizar a localização de ARN humano e de rato de SNORF25.

Este ensaio utiliza dois oligonucleótidos para amplificação por PCR convencional e um terceiro oligonucleótido sonda específico que é marcado com um repórter na extremidade 5' e um agente de extinção na extremidade 3' do oligonucleótido. No presente invento, utilizaram-se os dois repórteres FAM (6-carboxifluoresceína) e JOE (6-carboxi-4,5-dicloro-2,7-dimetoxifluoresceína) e TAMRA (6-carboxi-4,7,2,7'-tetrametilrodamina) foi o agente de extinção. À medida que progride a amplificação, o oligonucleótido sonda marcado hibrida com a sequência génica entre os dois oligonucleótidos utilizados para amplificação. Utiliza-se a actividade de nuclease de Taq, ou polimerase de ADN termoestáveis rTth para clivar a sonda marcada. Tal separa o agente de extinção do repórter e gera um sinal fluorescente que é directamente proporcional à quantidade de amplificação gerado. Esta sonda marcada confere um elevado grau de especificidade. Não é detectada amplificação não específica dado que a sonda marcada não hibrida. Todas as experiências foram efectuadas num

sistema de detecção de sequência PE7700 (Perkin Elmer, Foster City, CA).

RT-PCR quantitativa

Para a detecção de ARN que codifica SNORF25, efectuou-se RT-PCR quantitativo em ARNm extraído de tecido. As reacções de transcrição inversa e PCR foram efectuadas em volumes de 50 µl utilizando ADN polimerase termoestável rTth (Perkin Elmer). Utilizaram-se iniciadores com as seguintes sequências:

SNORF 25 humano:

Iniciador directo:

SNORF25H-765F

5'-CCTCTACCTAGTGCTGGAACGG-3' (SEQ ID NO:18)

Iniciador inverso:

SNORF25H-868R

5'-GCTGCAGTCGCACCTCCT-3' (SEQ ID NO:19)

Sonda oligonucleotídica fluorogénica:

SNORF25H-814T

5' (6-FAM)-TCCCTGCTCAACCCACTCATCTATGCCTATT-(TAMRA) 3' (SEQ ID NO:20)

SNORF25 de rato

Iniciador directo:

SNORF25R-231F

5'-GTGTAGCCTTCGGATGGCA-3' (SEQ ID NO:21)

Iniciador inverso:

SNORF25R-329R

5'-GGCTGCTTAATGGCCAGGTAC-3' (SEQ ID NO:22)

Sonda oligonucleotídica fluorogénica:

SNORF25R-278T

5' (6-FAM)-TCCTCACGGTCATGCTGATTGCCTTT-(TAMRA) 3' (SEQ ID NO:23)

Utilizando estes pares de iniciadores, o comprimento do amplicão é de 104 pb para SNORF25 humano e 99 pb para SNORF25 de rato. Cada reacção de RT-PCR continha 50 ng de ARNm. As

concentrações de oligonucleótido foram: 500 nM de iniciadores directo e inverso e 200 nM de sonda fluorogénica. As concentrações de reagentes de cada reacção foram: dGTP; dATP; dCTP cada 300 µM; UTP 600 µM; Mn(OAc)₂ 3,0 mM; bicina 50 mM; acetato de potássio 115 mM, glicerol a 8%, 5 unidades de ADN polimerase termoestável rTth e 0,5 unidades de uracilo-N-glicosilase. O tampão para as reacções de RT-PCR continha também um fluoróforo utilizado como referência passiva (ROX: Perkin Elmer referência passiva de propriedade I). Todos os reagentes para RT-PCR (excepto ARNm e oligonucleótidos iniciadores) foram obtidos de Perkin Elmer (Foster City, CA). As reacções foram efectuadas utilizando o seguinte perfil de ciclos térmicos: 50°C 2 min., 60°C 30 min., 95°C 5 min., seguido por 40 ciclos de: 94°C, 20 s, 62°C 1 min.

Os controlos positivos das reacções de PCR consistiram em amplificação da sequência alvo de uma construção de plasmídeo. Construíram-se curvas padrão para quantificação utilizando o gene SNORF25 humano com um vector de plasmídeo ou ARN extraído de pâncreas como um molde para amplificação. Os controlos negativos consistiram em brancos de ARNm, bem como brancos de iniciador e ARNm. Para confirmar que o ARNm não estava contaminado com ADN genómico, efectuaram-se reacções de PCR sem transcrição inversa utilizando ADN-polimerase Taq. A integridade do ARN foi avaliada por amplificação de ARNm que codifica ciclofilina ou gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). Após transcrição inversa e amplificação por PCR, analisaram-se os dados utilizando o utilitário de detecção de sequências Perkin Elmer. O sinal fluorescente de cada poço foi normalizado utilizando uma referência passiva interna e ajustaram-se os dados a uma curva padrão para obter quantidades relativas de expressão de ARNm de SNORF25.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem da sequência completa de SNORF25

Preparou-se ADN genómico e ADNc a partir de vários tecidos (incluindo células GH1 e células Rin14b) e sujeitou-se a PCR MOPAC com dois iniciadores degenerados concebidos com base no terceiro domínio transmembranar dos membros das famílias de receptores de galanina, somatostatina e opióides e no sétimo

domínio transmembranar de membros da família de receptores de galanina. Verificou-se que três produtos desta reacção eram o mesmo clone em qualquer das orientações (directa ou inversa), que tem uma nova sequência que não se encontra nas bases de dados Genbank, SwissProtPlus, GSS, EST ou STS. Continha homologia significativa com outros receptores acoplados a proteína G conhecidos (~29% de identidade com os receptores de dopamina D1, beta-adrenérgico 2b e 5-HT_{1F} conhecidos; 34% de identidade com o receptor de 5-HT_{4L}). Esta sequência de receptor foi posteriormente denominada SNORF25 e foi utilizada para conceber iniciadores para amplificação rápida de extremidades 5' e 3' de ADNc (RACE), tal como descrito na secção de métodos supra. A reacção 5' RACE proporcionou informação de sequência através do primeiro domínio transmembranar e uma suposta sequência de codificação iniciando com metionina em quadro rodeado por uma sequência de consenso de kozak (ACCATGG).

A reacção de 3' RACE proporcionou uma banda de 600 pb por electroforese em gel de agarose. Esta banda foi subclonada para um kit de clonagem TA e sequenciaram-se as colónias isoladas. A sequência destes produtos revelou a presença de um codão de paragem em quadro a jusante da região de codificação para o sétimo domínio transmembranar. Determinou-se que o tamanho completo da sequência de codificação de SNORF25 era 1005 pb, codificando uma proteína de 335 aminoácidos. Utilizaram-se dois iniciadores, JAB86 e JAB84, para amplificar a sequência de codificação completa a partir de ADNc da linha celular Rin14b e ADN genómico de rato utilizando o sistema de PCR "Expand Long". Os iniciadores para esta reacção específicos para as regiões não traduzidas a 5' e 3' de SNORF25 com locais de restrição *Bam*HI e *Hind*III incorporados nas extremidades 5' dos iniciadores 5' e 3', respectivamente. Quando se subclonaram os produtos destas reacções para pcDNA3.1(-) e se sequenciaram, verificou-se que a sequência do clone Rin14b e do clone genómico eram idênticas e a construção de vector contendo SNORF25 de rato foi denominada pcDNA3.1-rSNORF25.

A análise de hidrofobicidade (Kyte-Doolittle) da sequência de aminoácidos do clone completo indica a presença de sete regiões hidrófobas, que é consistente com os sete domínios

transmembranares de um receptor acoplado a proteína G. Os sete domínios transmembranares esperados estão indicados na figura 4. Uma comparação das sequências de nucleótidos e peptídica de SNORF25 de rato com sequências contidas nas bases de dados Genbank, EMBL e SwissProtPlus revelou que a sequência de aminoácidos deste receptor está mais relacionada com as famílias de receptores de histamina, adenosina, serotonina, beta adrenérgico e dopamina, apresentando entre 25-30% de identidade de aminoácidos global com estes receptores. Os terminais N e C são relativamente curtos, de modo semelhante à família de receptores de adenosina. Contudo, a análise de domínio transmembranar indica que este receptor partilha um grau de identidade significativo com outros GPCR nos seus domínios transmembranares. Uma comparação de todos os domínios transmembranares de SNORF25 simultaneamente com uma lista exhaustiva dos domínios transmembranares de GPCR sugeriria que os domínios transmembranares de SNORF25 têm o maior grau de identidade com os receptores beta adrenérgicos 1 e 2 de 31% e 32%, respectivamente, bem como com os receptores de 5-HT₇ e 5-hT_{5B} de 32% e 36,6%, respectivamente. Quando se analisam os domínios transmembranares individualmente por busca FASTA, SNORF25 apresenta similaridade considerável com os domínios transmembranares de vários receptores acoplados a proteína G conhecidos.

De modo a clonar o homólogo humano de SNORF25, rastreou-se uma biblioteca de cosmídeos genómicos humanos em condições de rigor médio, com sondas oligonucleotídicas marcadas concebidas com base no segundo e quinto domínios transmembranares de SNORF25 de rato. Das cerca de 225 000 colónias rastreadas, duas colónias hibridaram com as sondas. Após isolamento e análise de cada colónia, determinou-se que estes dois clones eram idênticos a clones de cosmídeo que continham o homólogo humano de SNORF25. A análise de hibridação de *Southern* de vários produtos de digestão de restrição deste cosmídeo e subsequente sequenciação de bandas positivas indicou que um produto de digestão *Bam*HI/*Hind*III proporcionou um fragmento de 1,9 kb contendo a sequência de codificação completa deste clone humano. A construção do receptor humano subclonado para o local *Bam*HI/*Hind*III do vector pEXJT3T7 denomina-se pEXJT3T7-hSNORF25. O SNORF25 humano apresenta 80% de identidade de ADN e 83% de identidade de aminoácidos com SNORF25 de rato. Tal

como o receptor de rato, a região de codificação de proteína de SNORF25 humano tem 1005 nucleótidos (figuras 1A-1B), que codifica uma proteína de 335 aminoácidos (figuras 2A-2B). As sequências de ADN e de aminoácidos de SNORF25 de rato apresentam-se nas figuras 3A-3B e 4A-4B, respectivamente.

Uma busca nas bases de dados GenEMBL, SwissProtPlus, EST, STS e GSS confirmou que SNORF25 humano também é uma sequência única nova. Além da sua identidade com SNORF25 de rato, partilha 28-30% de identidade global com receptores de adenosina 2a, 5-HT_{4L}, 5-HT_{4S}, 5-HT₆ e 5-HT₇, dopamina D₁ e D₅, e somatostatina 5. Também partilha 25-26% de identidade com receptores de adenosina A₁, histamina H₁ e 2, beta-adrenérgico 1 e somatostatina 2 e 3. Uma comparação de todos os domínios transmembranares de SNORF25 humano simultaneamente com uma lista exhaustiva dos domínios transmembranares de GPCR sugeriria que os domínios transmembranares de SNORF25 humano têm o maior grau de identidade com os receptores adrenérgicos beta 1 e 2 (29% e 32%, respectivamente) e 5-HT₄. Os domínios transmembranares individuais de SNORF25 humano partilham identidade significativa com os domínios transmembranares de vários outros receptores acoplados a proteína G.

Tanto o SNORF25 de rato como o humano têm vários motivos potenciais de fosforilação de proteína quinase C (PKC) ao longo das suas sequências de aminoácidos. Para ambos os receptores, a treonina 73, serina 79 e serina 309 são potenciais locais de fosforilação PKC. O receptor humano tem um suposto local de fosforilação PKC adicional na serina 214, que é uma prolina no SNORF25 de rato. Ambos os receptores partilham um potencial local de fosforilação de caseína quinase II (CKII) na serina 329. O SNORF25 humano também contém mais dois potenciais locais de fosforilação CKII, treonina 217 e serina 331, que não se encontram presentes no receptor de rato. Por seu lado, SNORF25 de rato contém um potencial local de fosforilação de tirosina na tirosina 323, que não se encontra presente no receptor humano.

Resposta de AMPc de células transfectadas com SNORF25

O vector de expressão (pcDNA) contendo o ADNc de SNORF25 foi transfectado pelo método de electroporação para células CHO. Após plaqueamento, provocaram-se os transfectantes com uma biblioteca de ligandos que incluía, entre outros, vários neurotransmissores tradicionais, tais como histamina, adenosina, serotonina, norepinefrina e dopamina, com base na homologia de SNORF25 com receptores destes ligandos (consultar supra) e ensaiaram-se para a sua capacidade de estimular libertação de AMPc ou IP a níveis superiores de células com transfecção simulada. Curiosamente, os níveis de AMPc de base de células transfectadas com SNORF25 foram significativamente superiores (>10 vezes) do que em células com transfecção simulada (figura 5). Esta observação sugeriu que o receptor SNORF25 pode ser acoplado funcionalmente a uma via de estimulação de AMPc. Entre os ligandos ensaiados, apenas o ácido *todo-trans*-retinóico (ATRA) produziu um aumento significativo em AMPc mas não libertação de IP em células transfectadas com SNORF25, sem afectar estes parâmetros em células CHO com transfecção simulada. A resposta produzida a uma concentração de ATRA de 10 μ M (2 a 5 vezes acima do nível de base) foi comparável à produzida por forskolina, um estimulador directo potente de adenilil-ciclase (figura 6) (n=3).

As respostas a forskolina, tanto em células Cos-7 com transfecção simulada como transfectadas com SNORF25 foram praticamente idênticas (figura 6), sugerindo que o aumento da resposta máxima a ATRA verificada em células que expressam SNORF25, comparativamente a células transfectadas com ADN simulado, não foi devido a uma alteração na densidade celular ou nas propriedades intrínsecas das células. O *todo-trans*-retinol (vitamina A₁), um análogo próximo de ATRA não produziu um aumento em AMPc 10 μ M (figura 6).

As experiências subsequentes demonstraram que o aumento induzido por ATRA da formação de AMPc foi independente da célula hospedeira, já que se verificou também em células Cos-7 (n=3) (figura 7). O ácido *todo-trans*-retinóico não produziu qualquer resposta em células Cos-7 transfectadas com outros receptores de estimulação de ciclase conhecidos, incluindo

receptores de dopamina D1, D5, serotonina 5-HT4 e 5-HT6, indicando que a resposta verificada para ATRA é específica para células transfectadas com SNORF25 (figura 7).

A resposta AMPc a ATRA em células Cos-7 foi dependente da concentração com valores de EC_{50} na gama de aproximadamente 0,2 a 1 μ M e E_{max} de aproximadamente 200-300% (figura 8).

Activação de correntes de Cl^- activadas por cálcio em oócitos de *Xenopus* que expressam SNORF25

O aumento de AMPc intracelular pode ser monitorizado em oócitos por expressão do regulador de condutância transmembranar de fibrose quística (CFTR) cujo poro selectivo a Cl^- abre em resposta a fosforilação por proteína quinase A (Riordan, 1993). A actividade de SNORF25 foi assim ensaiada em oócitos co-injectados com ARNm que codifica SNORF25 e ARNm que codifica CFTR. Mediu-se uma corrente para o interior de Cl^- (105 ± 20 nA) em 17 destes 39 oócitos em resposta à aplicação de ácido todo-*trans*-retinóico 10 μ M (consultar figuras 9A-9C e 10).

Esta resposta foi específica para a expressão de SNORF25, já que não se verificou tal corrente em outros oócitos injectados apenas com ARNm que codifica o canal CFTR. Verificaram-se correntes semelhantes em oócitos injectados com o receptor β 2-adrenérgico (B2AR) (consultar figura 9C), embora as correntes geradas por oócitos que expressam SNORF25 tenham sido em geral 2-3 vezes mais lentas e menores. O ácido todo-*trans*-retinóico não estimulou correntes de Cl^- em oócitos isentos de CFTR, indicando que a via de fosfolipase C mediada por Gq não foi activada. Também não foram provocadas respostas em oócitos que expressam proteínas G quiméricas que são capazes de acoplar GPCR acoplados a Gi e Go à via de fosfolipase C. Conjuntamente, estas observações corroboram a hipótese que SNORF25 codifica uma GPCR que liga ácido todo-*trans*-retinóico e estimula a produção de AMPc, presumivelmente através de activação de Gs.

Noutros sistemas, o ácido todo-*trans*-retinóico estimula um de vários receptores nucleares (consultar antecedentes). Tal resulta no aumento da transcrição de um ou mais genes. A

expressão de SNORF25 em oócitos poderia resultar na expressão de um receptor nuclear para ácido *todo-trans*-retinóico, que não está normalmente presente em oócitos não injectados, que quando estimulado produz um aumento de AMPc. Se tal fosse o caso, o ácido retinóico não se ligaria necessariamente ao receptor SNORF25, mas actuaría num receptor nuclear para ácido retinóico previamente conhecido ou novo. Este mecanismo de acção indirecto de ácido retinóico pode explicar porque é que o ligando não provocou uma resposta CFTR em 3 dos 6 lotes de oócitos (17 de 39 oócitos) e porque é que a cinética de activação CFTR foi 2-3 vezes mais lenta do que a verificada em condições em que as respostas foram provocadas por activação de GPCR bem caracterizados, tal como o receptor adrenérgico B2 (figura 9C). No entanto, o atraso na activação de CFTR por ácido retinóico foi da ordem de 10 segundos e a activação de receptores nucleares encontra-se tipicamente na gama de vários minutos a horas. Assim, embora não se possa rejeitar o mecanismo de acção indirecto de ácido retinóico, o aparecimento relativamente rápido da resposta em oócitos que expressam SNORF25 sugere que tal mecanismo é pouco provável.

Detecção de ARNm que codifica SNORF25 humano:

Isolou-se ARNm de vários tecidos (listados na tabela 1) e ensaiaram-se como descrito.

O RT-PCR quantitativo utilizando uma sonda fluorogénica demonstrou expressão de ARNm que codifica SNORF25 humano na maioria dos tecidos ensaiados (Tabela 1). Verificaram-se os níveis mais elevados de ARNm de SNORF25 humano no pâncreas, estômago, intestino delgado e fígado fetal, tendo-se detectado níveis inferiores noutros locais. A maior parte das estruturas do sistema nervoso mostraram pouca expressão de ARNm de SNORF25 comparativamente a órgãos periféricos.

Os níveis mais elevados de expressão de SNORF25 foram verificados no pâncreas. O pâncreas excreta várias substâncias de vasta gama de actividade (incluindo insulina), indicando que SNORF25 pode desempenhar um papel na regulação de várias funções metabólicas, potencialmente através de mecanismos endócrinos. A expressão de SNORF25 no pâncreas não é surpreendente, já que SNORF25 também é expresso numa linha

celular de insulinoma de rato. Tal revelação, bem como a detecção de ARNm de SNORF25 no fígado, indica um possível papel na regulação dos níveis de glicose e possivelmente em diabetes.

Outros órgãos com elevados níveis de ARNm de SNORF25 são o estômago e intestino delgado. A distribuição para estas estruturas é consistente com funções relacionadas com motilidade ou absorção gastrointestinal. Actualmente, não se sabe se o ARNm de SNORF25 se encontra localizado no músculo liso ou em camadas mucosa/submucosa.

Embora detectado em níveis muito baixos, a presença de ARNm de SNORF25 em várias regiões do SNC, incluindo o tálamo e formação de hipocampo (onde os níveis são os mais elevados no SNC) e noutras áreas funcionalmente diversas, indica uma função reguladora difusa ou funcionalidade regional para este receptor.

O ARNm de SNORF25 humano parece ser regulado no desenvolvimento. Em fígado fetal, os níveis de ARNm são próximos dos medidos em pâncreas adulto (83%). No entanto, no tecido adulto, este baixa para menos de 1% da quantidade encontrada no pâncreas. A alteração profunda de ARNm de SNORF25 durante o desenvolvimento implica um papel na maturação do fígado ou um papel na regulação da necessidade/níveis de glicose durante o desenvolvimento. O curso temporal deste aumento não foi analisado e seria importante para entender a função deste receptor.

Em suma, a distribuição de ARNm de receptor SNORF25 implica funções de regulação vastas que envolvem vários sistemas de órgãos, mecanismos endócrinos, bem como o sistema nervoso central.

Detecção de ARNm que codifica SNORF25 de rato

Contrariamente à distribuição restrita de ARNm de SNORF25 humano, a distribuição de ARNm de SNORF25 no rato é espalhada. Uma diferença significativa na distribuição entre rato e humano é o nível elevado de ARNm de SNORF25 detectado no sistema nervoso central de rato. Em humanos, as concentrações

mais elevadas de ARNm de SNORF25 foram detectadas no pâncreas, com níveis muito baixos detectados nas estruturas do SNC. No rato os níveis mais elevados de ARNm de SNORF25 foram verificados na formação de hipocampo, seguidos de perto pelos níveis detectados no córtex cerebral, cerebelo, hipotálamo, plexo coróide e medula. Detecta-se também ARNm de SNORF25 tanto em raiz dorsal e gânglios trigeminais. Embora se detecte ARNm de SNORF25 no pâncreas de rato e noutros órgãos periféricos, encontra-se presente em níveis muito mais baixos do que no SNC.

Detectou-se SNORF25 de rato na maioria dos tecidos ensaiados. Além do pâncreas, é expresso em quantidades apreciáveis nos pulmões, cólon, duodeno, ovários, rins e glândulas supra-renais. Foi detectado noutros tecidos em quantidades menores, tal como apresentado na tabela 2.

Em suma, a vasta distribuição de ARNm de receptor SNORF25 de rato implica funções de regulação vastas que envolvem vários sistemas de órgãos, mecanismos endócrinos, bem como o sistema nervoso central. A diferença no padrão de distribuição verificada entre humanos e ratos sugere um papel mais vasto e potencialmente diferente para este receptor no rato comparativamente a humanos.

Tabela 1

Distribuição de ARNm que codifica receptores SNORF25 humanos utilizando qRT-PCR

O ARNm que codifica SNORF25h é expresso como % relativa ao tecido que o expressa na maior quantidade.

Região	% do máximo de qRT-PCR	Aplicações potenciais
coração	0,31	indicações cardiovasculares
rim	0,62	hipertensão, equilíbrio electrolítico
fígado	0,18	diabetes
pulmão	0,32	doenças respiratórias, asma
pâncreas	100	diabetes, doenças endócrinas
pituitária	0,03	regulação endócrina/ neuroendócrina
placenta	0,42	anomalias da gestação
intestino delgado	4,63	doenças gastrointestinais
baço	1,50	doenças imunitárias
estômago	12,60	doenças gastrointestinais
músculo estriado	0,32	doenças músculo-esqueléticas
amígdala	0,18	depressão, fobias, ansiedade, doenças do humor
putâmen caudato	0,17	modulação da função dopaminérgica
cerebelo	0,06	coordenação motora
córtex cerebral	0,01	integração sensorial e motora, conhecimento
hipocampo	0,27	conhecimento/memória
espinal-medula	0,00	analgesia, modulação e transmissão sensorial
substância negra	0,05	modulação da função dopaminérgica, modulação da coordenação motora
tálamo	0,60	integração sensorial
cérebro fetal	0,14	doenças do desenvolvimento
pulmão fetal	0,04	doenças do desenvolvimento
rim fetal	0,90	doenças do desenvolvimento
fígado fetal	82,63	doenças do desenvolvimento

Tabela 2

Distribuição de ARNm que codifica receptores SNORF25 de rato utilizando qRT-PCR

O ARNm que codifica SNORF25r é expresso como % relativa ao tecido que o expressa na maior quantidade.

Tecido	% de máximo de qRT-PCR	Aplicações potenciais
tecido adiposo	9,08	doenças metabólicas
córtex supra-renal	8,78	regulação de hormonas esteróides
medula supra-renal	16,34	regulação de libertação de epinefrina
cólon	24,15	doenças gastrointestinais
duodeno	18,89	doenças gastrointestinais
coração	11,98	indicações cardiovasculares
rim	15,86	equilíbrio electrolítico, hipertensão
fígado	vestígios	diabetes
pulmão	32,57	doenças respiratórias, asma
ovário	17,74	função reprodutora
pâncreas	30,45	diabetes, doenças endócrinas
baço	não detectado	doenças imunitárias
estômago	3,44	doenças gastrointestinais
músculo estriado	1,04	doenças músculo-esqueléticas
testículos	5,10	função reprodutora
bexiga	7,87	incontinência urinária
vaso deferente	7,16	função reprodutora
plexo celíaco	17,82	modulação da inervação autónoma
cerebelo	84,14	coordenação motora
córtex cerebral	83,54	integração sensorial e motora, conhecimento

plexo coróide	66,59	regulação de fluido cerebrospinal
gânglios da raiz dorsal	38,14	transmissão sensorial
hipocampo	100	conhecimento/memória
hipotálamo	67,19	apetite/obesidade, regulação endócrina
medula	52,66	analgesia, coordenação motora
bolbo olfactivo	6,66	olfacto
glândula pineal	41,16	regulação de libertação de melatonina
espinal medula	31,72	analgesia, modulação e transmissão sensorial
gânglios trigeminais	42,98	transmissão sensorial

REFERÊNCIAS

Bowman, W.C. e Rand, M.J., eds., "The eye and drugs affecting ocular function", In: Textbook of Pharmacology. Second Edition, London: Blackwell Scientific Publications. p.29.22-29.27 (1980).

Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976).

Breitman, T., et al., "Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid", Proc. Natl. Ada. Sci. 77: 2936-2940 (1980).

Burns, C.C., et al., "Identification and deletion of sequences required for feline leukemia virus RNA packaging and construction of a high-titer feline leukemia virus packaging cell line", Virology 222(1): 14-20 (1996).

Bush, et al., "Nerve growth factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells", J. Neurochem. 57: 562-574 (1991).

Chertow, B.S., et al., "Cellular mechanisms of insulin release: effects of retinoids on rat islet cell-to-cell adhesion, reaggregation, and insulin release", Diabetes 32: 568-574 (1983).

Chertow, B.S., et al., "Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets", J. Clin. Invest. 79: 163-169 (1987).

Chertow, B.S., et al., "Cytoplasmic retinoid-binding proteins and retinoid effects on insulin release in RINm5F - cells", Diabetes 38: 1544-1548 (1989).

Chu, Y.Y., et al., "Characterization of the rat A2a adenosine receptor gene", ADN Cell Biol. 15(4): 329-337 (1996).

Chytil, F., "Retinoids in lung development", FASEB J. 10(9): 986-992 (1996).

Connor, M.J. e Sidell, N., "Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells", Mol. Chem. Neurophathol. 30(3): 239-252 (1997).

Dascal, N., et al., "A trial G protein-activated K+ channel: expression cloning and molecular properties", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10235-10239 (1993).

El-Matwally, T.H. e T.E. Adrian (1999) Optimization of treatment conditions for studying the anticancer effects of retinoids using pancreatic adenocarcinoma as a model. Biochem. Biophy. Res. Commun. 257(2): 596-603.

Fong, T.M., et al., "Mutational analysis of neurokinin receptor function" Can. J. Physio. Pharmacol. 73(7): 860-865 (1995) .

Goodman, A.B., "Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia", PNAS 95(13): 7240-7244 (1998).

Gottardis, M.M., et al., "The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer", Breast Cancer Res. and Treat. 38: 85-96 (1996).

Graziano, M.P. et al., "The amino terminal domain of the glucagon-like peptide-1 receptor is a critical determinant of subtype specificity" Receptors Channels 4(1): 9-17 (1996).

Guan, X.M., et al., "Determination of Structural Domains for G Protein Coupling and Ligand Binding in (3 - Adrenergic Receptor" Mol. Pharmacol. 48(3): 492-498 (1995).

Gudas, L.J., et al. "Cellular biology and biochemistry of the retinoids" In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. eds. The retinoids: Biology, chemistry, and medicine. 2nd ed. New York: Raven Press. p. 443-520 (1994).

Gundersen, C.B., et al., "Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes" Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 219(1214): 103-109 (1983).

Hofman, C. e Eichele, G., "Retinoids in development" In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. eds. The retinoids: Biology, chemistry, and medicine. 2nd ed. New York: Raven Press. p. 387-441 (1994).

Inanobe, A., et al., "Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra" J. of Neurosci. 19(3): 1006-1017 (1999).

Krapivinsky, G., et al., "The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying-K(+) -channel proteins" Nature 374:135-141 (1995).

Krapivinsky, G., et al., "The cardiac inward rectifier K⁺ channel subunit, CIR, does not comprise the ATP-sensitive K⁺ channel, IKATP", J. Biol. Chem. 270:28777-28779 (1995b).

Kubo, Y., et al., "Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel" *Nature* 364:802-806 (1993).

Lazareno, S. e Birdsall, N.J.M., "Pharmacological characterization of acetylcholine stimulated [35S]-GTPγS binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies", *Br. J. Pharmacol.* 109: 1120-1127 (1993).

Manglesdorf, D.J., et al. "The retinoid receptors", In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. eds. *The retinoids: Biology, chemistry, and medicine*. 2nd ed. New York: Raven Press. p. 319-349 (1994). Martin, S., et al., "HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis" *Clin. Exp. Immunol.* 79: 448-453 (1990).

Miller, J., e Germain, R.N. "Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain", *J. Exp. Med.* 164(5): 1478-1489 (1986).

Milligan, G., et al., "Use of chimeric G(proteins in drug discovery" *TIPS* (In press).

Ohmura, T., et al., "Induction of cellular ADN synthesis in the pancreas and kidneys of rats by peroxisome proliferators, 9-cis retinoic acid, and 3,3',5-triiodo-L-thyronine", *Cancer Res.* 57: 795-798 (1997).

Orfanos, C.E., et al., "Current use and future potential role of retinoids in dermatology", *Drugs* 53(3): 358-388(1997).

Quick, M.W. e Lester, H.A., "Methods for expression of excitability proteins in *Xenopus* oocytes", *Meth. Neurosci.* 19: 261-279 (1994).

Redfern, C.P., et al., "Gene expression and neuroblastoma cell differentiation in response to retinoic acid: differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid" *Eur. J. Cancer* 31A(4): 486-494 (1995).

Riordan, J.R., "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *Ann. Rev. Physiol.* 55: 609-630 (1993).

Rosenwicz, S., Wollbergs, K., Von Lampe, B., Matthes, H., Kaiser, A., e E.O. Riecken (1997) Retinoids inhibit adhesion to laminin in human pancreatic carcinoma cells via the alpha 6 beta 1-integrin receptor. *Gastroenterology* 112(2): 532-542.

Rosenwicz, S., Stier, U., Brembeck, F., Kaiser, A., Papadimitriou, C.A., Berdel, W.E., Wiedenmann, B., e E.O. Riecken (1995) Retinoids: effects on growth, differentiation, and nuclear receptor expression in human pancreatic carcinoma cell lines. *Gastroenterology* 109(5): 1646-1660.

Sabichi, A.L., et al., "Retinoids in the chemoprevention of bladder cancer", *Curr. Opin. Oncol.* 10(5): 479-484 (1998).

Salon, J.A. e Owicki, J.A., "Real-time measurements of receptor activity: Application of microphysiometric techniques to receptor biology" *Meth. Neurosci.* 25: 201-224 (1996).

Smith, K.E., et al., "Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover", *J. Biol. Chem.* 272: 24612-24616 (1997).

Sporn, M., e Roberts, A., "Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis" *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 1381-1387 (1984).

Spurney, R.F., et al., "The C-terminus of the thromboxane receptor contributes to coupling and desensitization in a mouse mesangial cell line", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283(1): 207-215 (1997).

Takahashi, T., et al., ARat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels@ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(14): 5063-5067 (1987).

Tian, W., et al., "Determinants of alpha-Adrenergic Receptor Activation of G protein: Evidence for a Precoupled Receptor/G protein State" *Molecular Pharm.* 45: 524-553 (1994).

Underwood, D.J. et al., "Structural model of antagonist and agonist binding to the angiotensin II, AT1 subtype, G protein coupled receptor", *Chem. Biol.* 1(4): 211-221 (1994).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION

<120> ADN QUE CODIFICA O RECEPTOR SNORF25

<130> E 2672 EP

<140> 00908748.7

<141> 2000-02-22

<160> 23

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1129

<212> ADN

<213> *HOMO SAPIENS*

<400> 1

tgagaatttc agctggagag atagcatgcc ctggtaagtg aagtcctgcc acttcgagac	60
atggaatcat ctttctcatt tggagtgate cttgctgtcc tggcctccct catcattgct	120
actaacacac tagtggctgt ggctgtgctg ctgttgatcc acaagaatga tgggtgcagt	180
ctctgcttca ccttgaatct ggctgtggct gacaccttga ttggtgtggc catctctggc	240
ctactcacag accagctctc cagcccttct cggcccacac agaagaccct gtgcagcctg	300
cggatggcat ttgtcacttc ctccgcagct gcctctgtcc tcacggtcac gctgatcacc	360
tttgacaggt accttgccat caagcagccc ttccgctact tgaagatcat gagggggttc	420
gtggccgggg cctgcattgc cgggctgtgg ttagtgtctt acctcattgg cttcctccca	480
ctcggaatcc ccatgttcca gcagactgcc tacaaagggc agtgcagctt ctttgctgta	540
tttcacctc acttcgtgct gacctctcc tgcgttggct tcttcccagc catgctctc	600
tttgtcttct tctactgcga catgctcaag attgcctcca tgcacagcca gcagattcga	660
aagatggaac atgcaggagc catggctgga ggttategat ccccacggac tcccagcgac	720
ttcnaagctc tccgtactgt gtctgttctc attgggagct ttgctctatc ctggaccccc	780
ttccttatca ctggcattgt gcagggtggc tgccaggagt gtcacctcta cctagtgtg	840
gaacggtacc tgtggctgct cggcgtgggc aactccctgc tcaaccact catctatgcc	900
tattggcaga aggaggtgcg actgcagctc taccacatgg ccctaggagt gaagaaggty	960
ctcacctcat tctctctctt tctctcggcc aggaattgtg gccagagag gccagggaa	1020
agttcctgtc acatcgtcac tatctccagc tcagagttag atggctaaga cggtaagggc	1080
agagaagttt caaagtgcct ttctcctccc actctggagc cccaactag	1129

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> *HOMO SAPIENS*

<400> 2

```

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser
 1          5          10          15

Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu
      20          25          30

Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala
      35          40          45

Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp
      50          55          60

Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
      65          70          75          80

Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val
      85          90          95

Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg
      100          105          110

Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly
      115          120          125

Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro
      130          135          140

Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val
      145          150          155          160

Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro
      165          170          175

Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala
      180          185          190

Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met
      195          200          205

Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu
      210          215          220

Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro
      225          230          235          240

Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu
      245          250          255

Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
      260          265          270

Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu
      275          280          285

Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe
      290          295          300

Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu
      305          310          315          320

Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly
      325          330          335

```

<210> 3

<211> 1082

<212> ADN

<213> *RATTUS NORVEGICUS*

<400> 3

```

tcaagaccca gcatgccctt ataagtggga gtccctgtac ctcgaacctat ggagtcattct      60
ttctcatttg gagtgatcct tgctgtcctg accatcctta tcattgtgtg taatgcgctg      120
gtggttggtg ctatgtctgt atcaatctac aagaatgatg gtgttggcct ttgcttcacc      180
ttaaatctgg ccgtggctga taccttgatt ggcgtggcta tttctgggct agttacagac      240
cagctctcca gctctgtctc gcacacacag aagaccttgt gtagccttcg gatggcattc      300
gtcacttctt ctgcagccgc ctctgtcttc acggtcatgc tgattgcctt tgacaggtac      360
ctggccatta agcagccctt ccgttacttc cagatcatga atgggcttgt agccggagga      420
tgcattgcag ggtgtgtggt gatattctac cttatcggtt tctctccact tggagtctcc      480
atattccagc agaccaccta ccatggggcc tgcaccttct ttgctgtgtt tcaccaagg      540
tttgtgtgta cctctctctg tgctggcttc tcccagctg tgctcctctt tgtcttcttc      600
tactgtgaca tgctcaagat tgcctctgtg cacagccagc acatccggaa gatggaacat      660
gcaggagcca tgggtggagc ttgccggccc ccacggcctg tcaatgactt caaggctgtc      720
cggactgtat ctgtccttat tgggagcttc accctgtcct ggtctccgtt tctcatcact      780
agcattgtgc aggtggcctg ccacaaatgc tgctctacc aagtgtgga aaaatacctc      840
tggtccttg gagttggcaa ctccctgtc aaccactca tctatgcta ttggcagagg      900
gaggttcggc agcagctctg ccacatggcc ctgggggtga agaagtctt tacttcaatc      960
ttcctcttc tctcgccag gaatcgtggt ccacagagga cccgagaaag ctctatcac      1020
atcgtcacta tcagccagcc ggagctcgat ggctaggatg gtaaggaatg gatgtttcca      1080
ag                                                                                   1082

```

<210> 4

<211> 335

<212> PRT

<213> *RATTUS NORVEGICUS*

<400> 4

```

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

Leu Ile Ile Ala Val Asn Ala Leu Val Val Val Ala Met Leu Leu Ser
20           25           30

Ile Tyr Lys Asn Asp Gly Val Gly Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala

```

35					40					45					
Val	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Val	Thr	Asp
50						55					60				
Gln	Leu	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	His	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Cys	Ser	Leu
65					70					75					80
Arg	Met	Ala	Phe	Val	Thr	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Val
				85					90					95	
Met	Leu	Ile	Ala	Phe	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Lys	Gln	Pro	Leu	Arg
			100					105					110		
Tyr	Phe	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	Cys	Ile	Ala	Gly
		115					120					125			
Leu	Trp	Leu	Ile	Ser	Tyr	Leu	Ile	Gly	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly	Val	Ser
	130					135					140				
Ile	Phe	Gln	Gln	Thr	Thr	Tyr	His	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Phe	Ala	Val
145						150					155				160
Phe	His	Pro	Arg	Phe	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Gly	Phe	Phe	Pro
				165					170						175
Ala	Val	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asp	Met	Leu	Lys	Ile	Ala
			180					185						190	
Ser	Val	His	Ser	Gln	His	Ile	Arg	Lys	Met	Glu	His	Ala	Gly	Ala	Met
			195				200					205			
Val	Gly	Ala	Cys	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Val	Asn	Asp	Phe	Lys	Ala	Val
	210					215					220				
Arg	Thr	Val	Ser	Val	Leu	Ile	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Ser	Pro
225						230					235				240
Phe	Leu	Ile	Thr	Ser	Ile	Val	Gln	Val	Ala	Cys	His	Lys	Cys	Cys	Leu
				245					250						255
Tyr	Gln	Val	Leu	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Asn	Ser
			260					265						270	
Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Ile	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Gln	Arg	Glu	Val	Arg	Gln
		275					280					285			
Gln	Leu	Cys	His	Met	Ala	Leu	Gly	Val	Lys	Lys	Phe	Phe	Thr	Ser	Ile
		290				295					300				
Phe	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Arg	Asn	Arg	Gly	Pro	Gln	Arg	Thr	Arg	Glu
305						310					315				320
Ser	Ser	Tyr	His	Ile	Val	Thr	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu	Leu	Asp	Gly	
				325					330					335	

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<221> modified_base

<222> (8)..(14)

<223> n = inosina

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 5
tbdsvynga ymgntayvtk g 21

<210> 6
<211> 26
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(21)
<223> n = inosina

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 6
ganrsnarng mrtanaynak nggrtt 26

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 7
ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtg 25

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 8
atgtgctgca aggcgattta agttggg 27

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 9
tggtctgctg gaatatggag 20

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 10
cttgggtgaa acacagcaaa gaagg 25

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 11
atggaacatg caggagccat ggttgg 26

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 12
aagacaaaga ggagcacagc tggg 24

<210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 13
gctcaagatt gcctctgtgc acag 24

<210> 14
<211> 35
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 14
atctataagc ttaggcactt ggaaacatcc attcc 35

<210> 15
<211> 36
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 15
atctatggat cctgtgagaa tctgagctca agaccc 36

<210> 16
<211> 58
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 16
ttcaccttaa atctggccgt ggctgatacc ttgattggcg tggetatttc tgggctag 58

<210> 17
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 17
gctgtgtttc acccaaggtt tgtgctgacc ctctctgtg ctggcttctt ccagctgtg 60
c 61

<210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 18
ctcttaccta gtgctggaac gg 22

<210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 19
gctgcagtcg cacctcct 18

<210> 20
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 20
tccctgctca acccactcat ctatgcctat t 31

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 21
gtgtagcctt cggatggca 19

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 22
ggctgcttaa tggccaggta c 21

<210> 23
<211> 26
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Descrição de Sequência Artificial: iniciador/sonda

<400> 23
tcctcacggt catgctgatt gccttt 26

Lisboa, 2008-11-20

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico isolado que codifica:

- (a) uma proteína receptora SNORF25 de mamífero incluindo uma sequência de aminoácidos como estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4;
- (b) uma proteína receptora SNORF25 de mamífero com uma sequência de aminoácidos que é a mesma sequência de aminoácidos codificada pela molécula de ácido nucleico contida no plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25, N.º de acesso ATCC 203495 ou plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25, N.º de acesso ATCC 203494; ou
- (c) uma proteína receptora SNORF25 de mamífero com uma sequência de aminoácidos que tem 75% ou mais de identidade de aminoácidos com os receptores SNORF25 de mamífero de (a) ou (b),

desde que o ácido nucleico não tenha a sequência de nucleótidos apresentada com o número de acesso AL035423 na base de dados de sequências de nucleótidos EMBL edição 58 editada a 15 de Fevereiro de 1999.

2. Ácido nucleico da reivindicação 1, em que o ácido nucleico é ADN.

3. ADN da reivindicação 2, em que o ADN é ADNc.

4. ADN da reivindicação 2, em que o ADN é ADN genómico.

5. Ácido nucleico da reivindicação 1, em que o ácido nucleico é ARN.

6. Ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a proteína receptora SNORF25 de mamífero tem uma sequência de aminoácidos que tem 85% ou mais de identidade de aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25, N.º de acesso ATCC 203495 ou pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25, N.º de acesso ATCC 203494.

7. Ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a proteína receptora SNORF25 de mamífero tem uma sequência de aminoácidos que tem 95% ou mais de identidade de

aminoácidos com o receptor SNORF25 codificado pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25, N.º de acesso ATCC 203495 ou pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25, N.º de acesso ATCC 203494.

8. Ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 de rato.

9. Ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano.

10. Ácido nucleico da reivindicação 9, em que o receptor SNORF25 humano tem uma sequência de aminoácidos idêntica à codificada pelo plasmídeo pEXJT3T7-hSNORF25, N.º de acesso ATCC 203495.

11. Ácido nucleico da reivindicação 9, em que o receptor SNORF25 humano tem uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos tal como estabelecida em SEQ ID NO:2.

12. Ácido nucleico da reivindicação 8, em que o receptor SNORF25 de rato tem uma sequência de aminoácidos idêntica à codificada pelo plasmídeo pcDNA3.1-rSNORF25, N.º de acesso ATCC 203494.

13. Ácido nucleico de reivindicação 8, em que o receptor SNORF25 de rato tem uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos tal como estabelecida em SEQ ID NO:4.

14. Ácido nucleico isolado de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 que codifica uma proteína receptora SNORF25 de mamífero:

- (a) com a sequência de aminoácidos tal como estabelecida em SEQ ID NO:2, em que o referido ácido nucleico consiste na sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:1 ou na sequência de nucleótidos apresentada da posição 61 à posição 1068 de SEQ ID NO:1, ou
- (b) com a sequência de aminoácidos tal como estabelecida em SEQ ID NO:4, em que o referido ácido nucleico consiste na sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:3 ou na

sequência de nucleótidos apresentada da posição 49 à posição 1056 de SEQ ID NO:3.

15. Proteína receptora SNORF25 de mamífero purificada, codificada pelo ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

16. Vector incluindo o ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

17. Vector da reivindicação 16 adaptado para expressão numa célula que inclui os elementos de regulação necessários para expressão do ácido nucleico na célula ligados operativamente ao ácido nucleico que codifica o receptor, de modo a permitir a sua expressão, em que a célula é uma célula bacteriana, de anfíbio, de levedura, de insecto ou de mamífero.

18. Vector da reivindicação 17, em que o vector é um baculovírus.

19. Vector da reivindicação 16, em que o vector é um plasmídeo.

20. Plasmídeo da reivindicação 19 denominado pEXJT3T7-hSNORF25, N.º de acesso ATCC 203495.

21. Plasmídeo da reivindicação 19 denominado pcDNA3.1-rSNORF25, N.º de acesso ATCC 203494.

22. Célula cultivada incluindo o vector de qualquer uma das reivindicações 17 a 21.

23. Célula da reivindicação 22, em que a célula não é uma célula de mamífero.

24. Célula da reivindicação 23, em que a célula que não é de mamífero é uma célula de oócito de *Xenopus* ou uma célula de melanóforo de *Xenopus*.

25. Célula da reivindicação 22, em que a célula é uma célula de mamífero.

26. Célula de mamífero da reivindicação 25, em que a célula é uma célula COS-7, uma célula 293 de rim embrionário humano, uma célula NIH-3T3, uma célula LM(tk-), uma célula Y1 de ratinho ou uma célula de CHO.

27. Célula da reivindicação 22, em que a célula é uma célula de insecto.

28. Célula da reivindicação 27, em que a célula de insecto é uma célula Sf9, uma célula Sf21 ou uma célula Trichoplusia ni 5B-4.

29. Preparação membranar incluindo um receptor SNORF25 isolado da célula de qualquer uma das reivindicações 22, 23, 25, 26, 27 ou 28, em que o receptor SNORF25 é um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.

30. Processo para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui pôr em contacto células contendo ADN que codifica e expressa na sua superfície celular um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou uma preparação membranar de tais células, em que tais células não expressam normalmente o referido receptor SNORF25 de mamífero, com o composto, sob condições adequadas para ligação, e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero.

31. Processo que envolve ligação competitiva para identificar um composto químico que se liga especificamente a um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui pôr em contacto separadamente células que expressam na sua superfície celular um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, em que

tais células não expressam normalmente o referido receptor SNORF25 de mamífero, ou uma preparação membranar de tais células, simultaneamente com o composto químico e um segundo composto químico que se sabe que se liga ao receptor, e com apenas o segundo composto químico, sob condições adequadas para ligação de ambos os compostos, e detectar a ligação específica do composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero, em que uma diminuição na ligação do segundo composto químico ao receptor SNORF25 de mamífero na presença do composto químico indica que o composto químico se liga ao receptor SNORF25 de mamífero.

32. Método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se se ligam a um receptor SNORF25 de mamífero, para identificar um composto que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, que inclui:

- (a) pôr em contacto células transfectadas com, e expressando, ADN que codifica um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, ou uma preparação membranar de tais células, com um composto que se sabe que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero;
- (b) pôr em contacto a preparação da etapa (a) com a multiplicidade de compostos que não se sabe se se ligam especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem ligação de compostos que se sabe que se ligam ao receptor SNORF25 de mamífero;
- (c) determinar se a ligação do composto que se sabe que se liga ao receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença de qualquer composto dentro da multiplicidade de compostos, relativamente à ligação do composto na ausência da multiplicidade de compostos; e se for o caso
- (d) determinar separadamente a ligação ao receptor SNORF25 de mamífero de compostos incluídos na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar o composto que se liga especificamente ao receptor SNORF25 de mamífero.

33. Método de detecção da expressão de um receptor SNORF25 de mamífero por detecção da presença de ARNm que

codifica o receptor SNORF25 de mamífero, que inclui obter ARNm total de uma célula e pôr em contacto o ARNm assim obtido com uma sonda de ácido nucleico capaz de hibridar especificamente com uma sequência única incluída na sequência de uma molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3 em condições de hibridação, detectar a presença de ARNm que hibrida com a sonda e desse modo detectar a expressão do receptor SNORF25 de mamífero pela célula.

34. Método de preparação do receptor SNORF25 de mamífero purificado da reivindicação 15 que inclui:

- (a) cultivar células que expressam o receptor SNORF25 de mamífero;
- (b) recuperar o receptor SNORF25 de mamífero das células; e
- (c) purificar o receptor SNORF25 de mamífero assim recuperado.

35. Método de preparação do receptor SNORF25 de mamífero purificado da reivindicação 15 purificado que inclui:

- (a) inserir um ácido nucleico que codifica o receptor SNORF25 de mamífero num vector adequado;
- (b) introduzir o vector resultante numa célula hospedeira adequada;
- (c) colocar a célula resultante em condições adequadas que permitam a produção do receptor SNORF25 de mamífero;
- (d) recuperar o receptor SNORF25 de mamífero produzido pela célula resultante; e
- (e) isolar e/ou purificar o receptor SNORF25 de mamífero assim recuperado.

36. Processo para determinar se um composto químico é um agonista de receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células transfectadas com, e expressando, ADN que codifica um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, com o composto, sob condições que permitem a activação do receptor SNORF25 de mamífero, e detectar um aumento na actividade do receptor SNORF25 de mamífero, de modo a assim

determinar se o composto é um agonista do receptor SNORF25 de mamífero.

37. Processo para determinar se um composto químico é um antagonista de receptor SNORF25 de mamífero que inclui pôr em contacto células transfectadas com, e expressando, ADN que codifica um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, com o composto, na presença de um agonista conhecido do receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem a activação do receptor SNORF25 de mamífero, e detectar uma diminuição na actividade do receptor SNORF25 de mamífero, de modo a assim determinar se o composto é um antagonista do receptor SNORF25 de mamífero.

38. Processo para determinar se um composto químico se liga especificamente e activa um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui pôr em contacto células que produzem uma resposta de segundo mensageiro e que expressam na sua superfície celular um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, em que tais células não expressam normalmente o referido receptor SNORF25 de mamífero, com o composto químico sob condições adequadas para activação do receptor SNORF25 de mamífero, e medir a resposta de segundo mensageiro na presença e na ausência do composto químico, em que uma alteração na resposta de segundo mensageiro na presença do composto químico indica que o composto activa o receptor SNORF25 de mamífero.

39. Processo da reivindicação 38, em que a resposta de segundo mensageiro inclui activação do canal de cloreto e a alteração do segundo mensageiro é um aumento no nível de corrente de cloreto.

40. Processo da reivindicação 38 em que a resposta de segundo mensageiro inclui alteração na acumulação de AMPc e a alteração da resposta do segundo mensageiro é um aumento da acumulação de AMPc.

41. Processo da reivindicação 38, em que a resposta de segundo mensageiro inclui libertação de fosfato de inositol e a alteração de segundo mensageiro é um aumento no nível de fosfato de inositol.

42. Processo para determinar se um composto químico se liga especificamente e inibe a activação de um receptor SNORF25 de mamífero, que inclui pôr em contacto separadamente células que produzem uma resposta de segundo mensageiro e que expressam na sua superfície celular um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, em que tais células não expressam normalmente o referido receptor SNORF25 de mamífero, simultaneamente com o composto químico e com um segundo composto químico que se sabe que activa o receptor SNORF25 de mamífero, e apenas com o segundo composto químico, em condições adequadas para activação do receptor SNORF25 de mamífero e medir a resposta de segundo mensageiro na presença de apenas o segundo composto químico e na presença simultânea do segundo composto químico e do composto químico, em que uma alteração menor na resposta de segundo mensageiro na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico, indica que o composto químico inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero.

43. Processo da reivindicação 42, em que a resposta de segundo mensageiro inclui a activação de canal de cloreto e a alteração da resposta do segundo mensageiro é um aumento menor no nível de corrente de cloreto na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico.

44. Processo da reivindicação 42, em que a resposta de segundo mensageiro inclui alteração nos níveis de AMPc e a alteração na resposta do segundo mensageiro é uma alteração menor no nível de AMPc na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico.

45. Processo da reivindicação 42, em que a resposta de segundo mensageiro inclui libertação de fosfato de inositol e a alteração na resposta do segundo mensageiro é um menor aumento do nível de fosfato de inositol na presença simultânea do composto químico e do segundo composto químico do que na presença apenas do segundo composto químico.

46. Processo de qualquer das reivindicações 38 a 45, em que a célula é uma célula de insecto.

47. Método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se activam um receptor SNORF25 de mamífero, para identificar um composto que activa o receptor SNORF25 de mamífero que inclui:

- (a) pôr em contacto células transfectadas com, e que expressam, um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, com a multiplicidade de compostos que não se sabe se activam o receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem activação do receptor SNORF25 de mamífero;
- (b) determinar se a actividade do receptor SNORF25 de mamífero é aumentada na presença dos compostos; e se for o caso
- (c) determinar separadamente se a activação do receptor SNORF25 de mamífero é aumentada por cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar o composto que activa o receptor SNORF25 de mamífero.

48. Método de rastreio de uma multiplicidade de compostos químicos que não se sabe se inibem a activação de um receptor SNORF25 de mamífero, para identificar um composto que inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero, que inclui:

- (a) pôr em contacto células transfectadas com, e que expressam, um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, com a multiplicidade de

compostos na presença de um agonista conhecido de receptor SNORF25 de mamífero, sob condições que permitem activação do receptor SNORF25 de mamífero;

- (b) determinar se a activação do receptor SNORF25 de mamífero é reduzida na presença da multiplicidade de compostos, relativamente à activação do receptor SNORF25 de mamífero na ausência da multiplicidade de compostos; e se for o caso
- (c) determinar separadamente a inibição da activação do receptor SNORF25 de mamífero para cada composto incluído na multiplicidade de compostos, de modo a assim identificar o composto que inibe a activação do receptor SNORF25 de mamífero.

49. Processo de qualquer das reivindicações 30, 31 ou 38 a 43 ou método de qualquer das reivindicações 32, 47 ou 48, em que a célula é uma célula de mamífero.

50. Processo ou método da reivindicação 49, em que a célula de mamífero não é de origem neuronal.

51. Processo ou método da reivindicação 50, em que a célula não neuronal é uma célula COS-7, uma célula 293 de rim embrionário humano, uma célula LM(tk-) ou uma célula NIH-3T3.

52. Processo da reivindicação 30 ou 31 ou método da reivindicação 32 ou 47 para a identificação de um composto químico para o tratamento de uma anomalia associada com a regulação dos níveis de glicose.

53. Processo da reivindicação 30 ou 31 ou método da reivindicação 32 ou 47 para a identificação de um composto químico para o tratamento de diabetes.

54. Processo da reivindicação 36 ou 38, para determinar se o composto químico é útil para o tratamento de uma anomalia associada com a regulação dos níveis de glicose.

55. Processo da reivindicação 36 ou 38, para determinar se o composto químico é útil para o tratamento de diabetes.

56. Anticorpo capaz de ligação a um receptor SNORF25 de mamífero com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 ou com 75% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.

57. Anticorpo da reivindicação 56, em que o receptor SNORF25 de mamífero é um receptor SNORF25 humano ou um receptor SNORF25 de rato.

58. Anticorpo da reivindicação 57, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou anti-soros.

Lisboa, 2008-11-20

RESUMO

"ADN que codifica receptor SNORF25"

Este invento proporciona ácidos nucleicos isolados que codificam receptores SNORF25 de mamífero, receptores SNORF25 de mamífero purificados, vectores incluindo ácido nucleico que codifica receptores SNORF25 de mamífero, células incluindo tais vectores, anticorpos dirigidos contra receptores SNORF25 de mamífero, sondas de ácido nucleico úteis para detectar ácido nucleico que codifica receptores SNORF25 de mamífero, oligonucleótidos anti-sentido complementares a sequências de ácido nucleico únicas que codificam receptores SNORF25 de mamífero, animais transgênicos não humanos que expressam ADN que codifica receptores SNORF25 de mamífero normais ou mutantes, métodos de isolar receptores SNORF25 de mamífero, métodos de tratar uma anomalia que está ligada à actividade dos receptores SNORF25 de mamífero, assim como métodos de determinar ligação de compostos a receptores SNORF25 de mamífero, métodos de identificar agonistas e antagonistas de receptores SNORF25 e agonistas e antagonistas assim identificados.

Figura 1A

1 TGAGAAATTTCACTGGAGAGATAGCATGCCCTGGTAAGTGAAGTCCCTGCCACTTCGAGAC 60
61 ATGGAATCATCTTCTCATTTGGAGTGATCCTTGGCTGTCCCTGGCCCTCCCTCATCATTGCT 120
121 ACTAACACACTAGTGGCTGTGGCTGTGCTGCTTGTGATCCACAAGAATGATGGTGCAGT 180
181 CTCTGCTTCACCTTGAATCTGGCTGTGGCTGACACCTTGATTTGGTGTGGCCATCTCTGGC 240
241 CTACTCACAGACCAGCTCTCCAGCCCTTCTCGGCCACACAGAACCCCTGTGCAGCCTG 300
301 CGGATGGCATTTGTCACTTCCTCCGCAGCTGCCCTCTGTCCCTCACGGTCACTGCTGATCACC 360
361 TTTGACAGGTACCTTGCCATCAAGCAGCCCTTCCGGCTACTTGAAGATCATGAGTGGGTTTC 420
421 GTGGCCGGGGCCCTGCATTGCCGGGGCTGTGGTTAGTGTCTTACCTCATTTGGCTTCCTCCCA 480
481 CTCGGAATCCCCCATGTTCCAGCAGACTGCCTACAAAGGGCAGTGCAGCTTCTTTGCTGTA 540
541 TTTTACCCCTCACTTCGTGCTGACCCCTCTCCTGCGTTGGCTTCTTCCCAGCCCATGCTCCTC 600

Figura 1B

601 TTTGTCTTCTTCTACTGCGACATGCTCAAGATTGCCTCCATGCACAGCCAGCAGATTCTGA 660
661 AAGATGGAACATGCAGGAGCCATGGCTGGAGGTTATCGATCCCCACGGACTCCCAGCGGAC 720
721 TTCAAAGCTCTCCGTA CTGTGTCTTCTCATTTGGGAGCTTTGCTCTATCCTGGACCCCCC 780
781 TTCCCTTATCACTGGCATTTGTGCAGGTGGCTGCCAGGAGTGTACCTCTACCTAGTGCTG 840
841 GAACGGTACCTGTGGCTGCTCGGCGTGGGCAACTCCCTGCTCAACCCACTCATCTATGCC 900
901 TATTGGCAGAGGAGGTGCCACTGCAGCTCTACCCACATGGCCCTAGGAGTGAAGAAGGTG 960
961 CTCACCTCATTCCTCCTCTTCTCTCGGCCAGGAATTGTGGCCCAGAGAGGCCCAGGGAA 1020
1021 AGTTCCGTCAATCGTCACTATCTCCAGCTCAGAGTTTGATGGCTAAGACGGTAAGGC 1080
1081 AGAGAAGTTTCAAAGTGCCCTTTCTCCTCCCACCTCTGGAGCCCCAACTAG 1129

Figura 2A

1 M E S S F S F G V I L A V L A S L I I A 20
21 T N T L V A V A V L L L I H K N D G V S 40
41 L C F T L N L A V A D T L I G V A I S G 60
61 L L T D Q L S S P S R P T Q K T L C S L 80
81 R M A F V T S S A A A S V L T V M L I T 100
101 E D R Y L A I K Q P F R Y L K I M S G F 120
121 V A G A C I A G L W L V S Y L I G F L P 140
141 L G I P M F Q Q T A Y K G Q C S F F A V 160
161 F H P H F V L T L S C V G F F P A M L L 180
181 F V F F Y C D M L K I A S M H S Q Q I R 200
201 K M E H A G A M A G G Y R S P R T P S D 220

Figura 2B

221	F	K	A	L	R	T	V	S	V	L	I	G	S	F	A	L	S	W	T	P	240
241	F	L	I	T	G	I	V	Q	V	A	C	Q	E	C	H	L	Y	L	V	L	260
261	E	R	Y	L	W	L	L	G	V	G	N	S	L	L	N	P	L	I	Y	A	280
281	Y	W	Q	K	E	V	R	L	Q	L	Y	H	M	A	L	G	V	K	K	V	300
301	L	T	S	F	L	L	F	L	S	A	R	N	C	G	P	E	R	P	R	E	320
321	S	S	C	H	I	V	T	I	S	S	S	E	F	D	G						335

Figura 3A

1 TCAAGACCCAGCATGCCCTTATAAGTGGAGTCCTGCTACCTCGAACCAATGGAGTCATCT 60
61 TTCTCATTTGGAGTGATCCTTGCTGTCCCTGACCATCCTTATCATTTGCTGTTAATGCGCTG 120
121 GTGGTTGTGGCTATGCTGCTATCAATCTACAAGAAATGATGGTGTGGCCCTTTGCTTCACC 180
181 TTAAATCTGGCCGTGGCTGATACCTTGATTGGCGTGGCTATTTCTGGGCTAGTTACAGAC 240
241 CAGCTCTCCAGCTCTGCTCAGCACACACAGAAGACCCTTGTTAGCCCTTCGGATGGCATTC 300
301 GTCACCTTCTTCTGCAGCCGCCCTCTGTCCCTCACGGTCATGCTGATTGCCCTTTGACAGGTAC 360
361 CTGGCCATTAAGCAGCCCCCTCCGTTACTTCCAGATCATGAATGGCTTGTAGCCGGAGGA 420
421 TGCATTGCAGGGCTGTGGTTGATATCTTACCTTATCGGCTTCCTCCCACCTTGAGTCTCC 480
481 ATATTCCAGCAGACCACCTACCATGGGCCCTGCACCTTCTTTGCTGTGTTTCACCCCAAGG 540
541 TTTGTGCTGACCCCTCTCCTGTGCTGGCTTCTTCCCAGCTGTGCTCCTCTTTGTCTTCTTC 600
601 TACTGTGACATGCTCAAGATTGCCCTCTGTGCACAGCCAGCACATCCGGGAAGATGGAACAT 660

Figura 3B

```
661 GCAGGAGCCATGGTTGGAGCTTGCCGGCCCCACGGCCTGTCAATGACTTCAAGGCTGTC 720
721 CGGACTGTATCTGTCCCTTATTGGGAGCTTCACCCTGTCCCTGGTCTCCGTTTCTCATCACT 780
781 AGCAATTGTCAGGTGGCCTGCCACAAATGCTGCCCTCTACCAAGTGTGGAAAAATACCTC 840
841 TGGCTCCTTGGAGTTGGCAACTCCCCTGCTCAACCCACTCATCTATGCCCTATTGGCAGAGG 900
901 GAGGTTCGGCAGCAGCTCTGCCACATGGCCCTGGGGGTGAAGAAAGTTCTTTACTTCAATC 960
961 TTCCCTCCTTCTCTCGGCCAGGAATCGTGGTCCACAGAGGACCCGAGAAAGCTCCTATCAC 1020
1021 ATCGTCACTATCAGCCAGCCGGAGCTCGATGGCTAGGATGGTAAGGAATGGATGTTTCCA 1080
1081 AG 1082
```

Figura 4A

1	M	E	S	S	F	S	F	G	V	I	L	A	V	L	T	I	L	I	I	A	20
21	V	N	A	L	V	V	A	M	L	L	S	I	Y	K	N	D	G	V	G	40	
41	L	C	F	T	L	N	L	A	V	A	D	T	L	I	G	V	A	I	S	G	60
61	L	V	T	D	Q	L	S	S	A	Q	H	T	Q	K	T	L	C	S	L	80	
81	R	M	A	F	V	T	S	S	A	A	S	V	L	T	V	M	L	I	A	100	
101	E	D	R	Y	L	A	I	K	Q	P	L	R	Y	F	Q	I	M	N	G	L	120
121	V	A	G	G	C	I	A	G	L	W	L	I	S	Y	L	I	G	F	L	P	140
141	L	G	V	S	I	E	Q	Q	T	T	Y	H	G	P	C	T	F	F	A	V	160
161	F	H	P	R	F	V	L	T	L	S	C	A	G	F	F	A	V	L	L	180	
181	F	V	F	F	Y	C	D	M	L	K	I	A	S	V	H	S	Q	H	I	R	200
201	K	M	E	H	A	G	A	M	V	G	A	C	R	P	P	R	P	V	N	D	220

Figura 4B

221	F	K	A	V	R	T	V	S	V	L	I	G	S	F	T	L	S	W	S	P	240
241	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>O</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	260
261	E	K	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	280
281	<u>Y</u>	<u>W</u>	Q	R	E	V	R	Q	Q	L	C	H	M	A	L	G	V	K	K	F	300
301	F	T	S	I	F	L	L	L	S	A	R	N	R	G	P	Q	R	T	R	E	320
321	S	S	Y	H	I	V	T	I	S	Q	P	E	L	D	G						335

Figura 5

Libertação de AMPc de base em células CHO transfectadas
com SNORF25 e com transfecção simulada

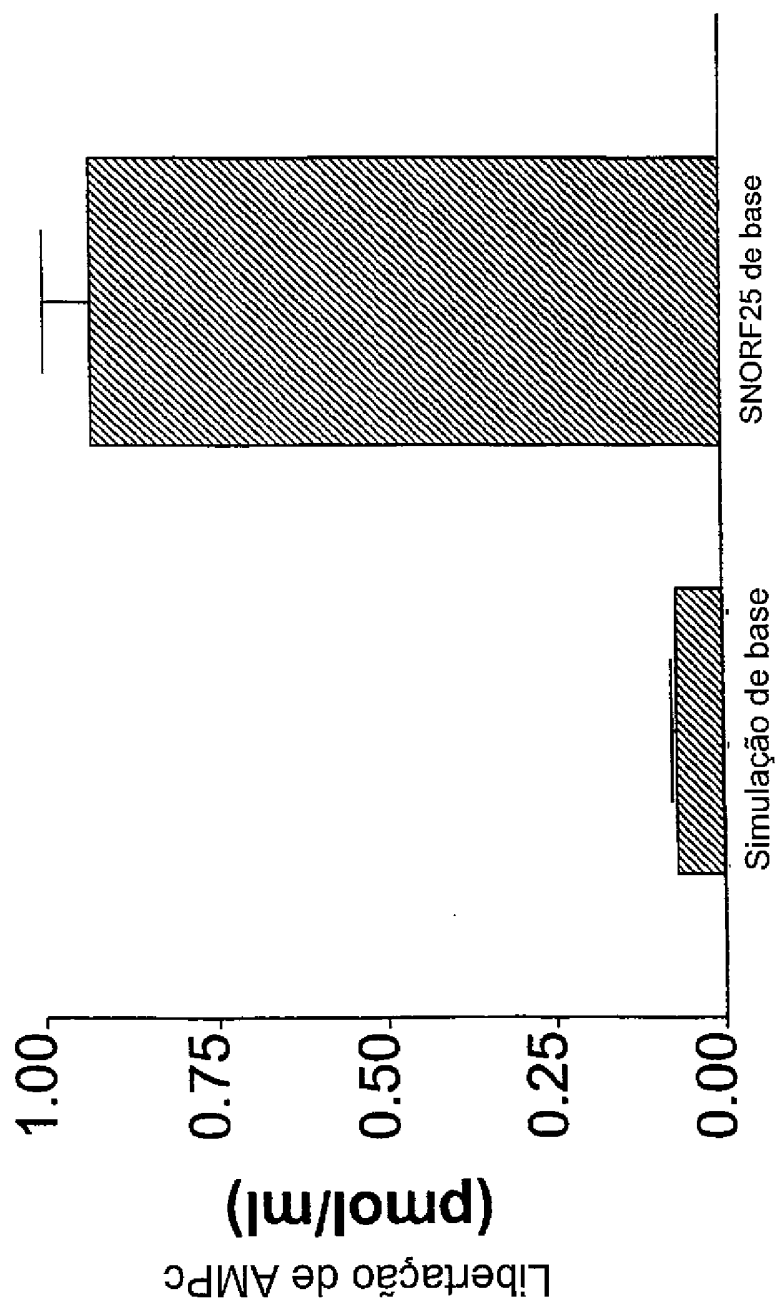


Figura 6

Especificidade de ATRA em libertação de AMPc em células CHO transfectadas com SNORF25

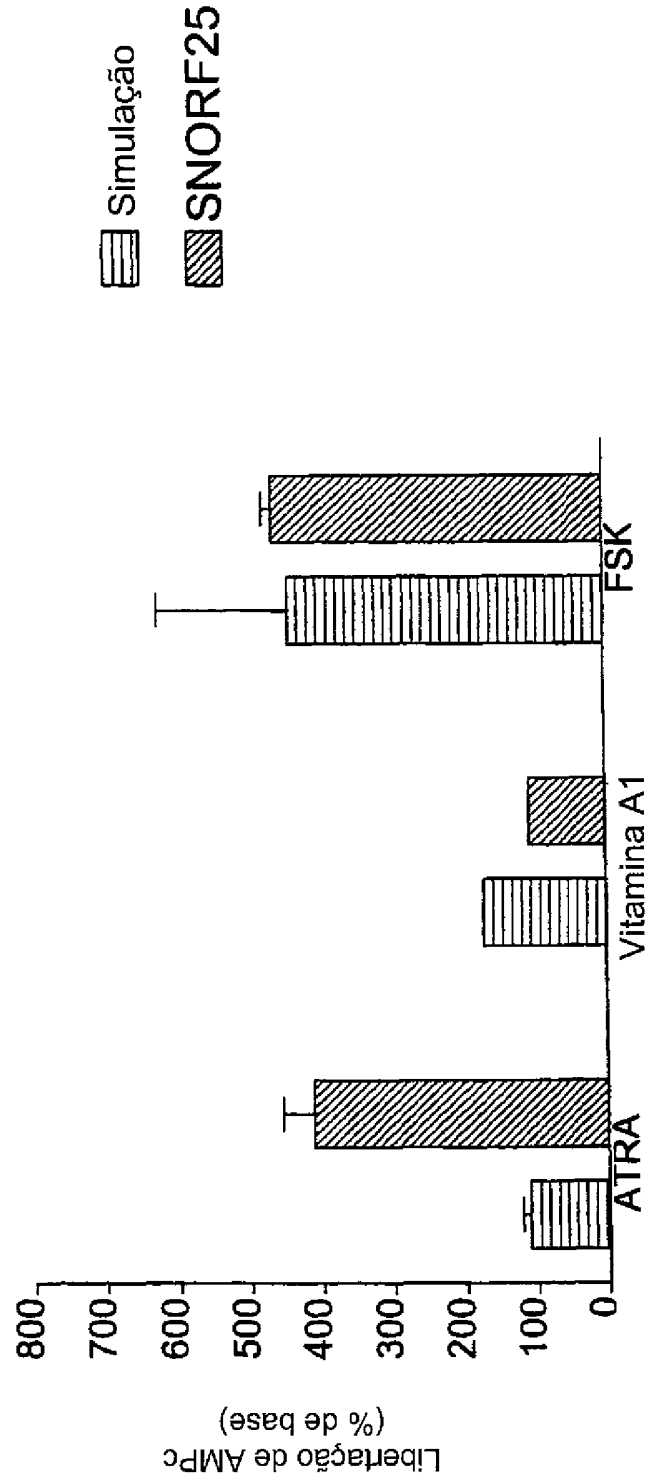


Figura 7

Efeito de ATRA em libertação de AMPc em células Cos-7 transfectedas com vários estimuladores de ciclase

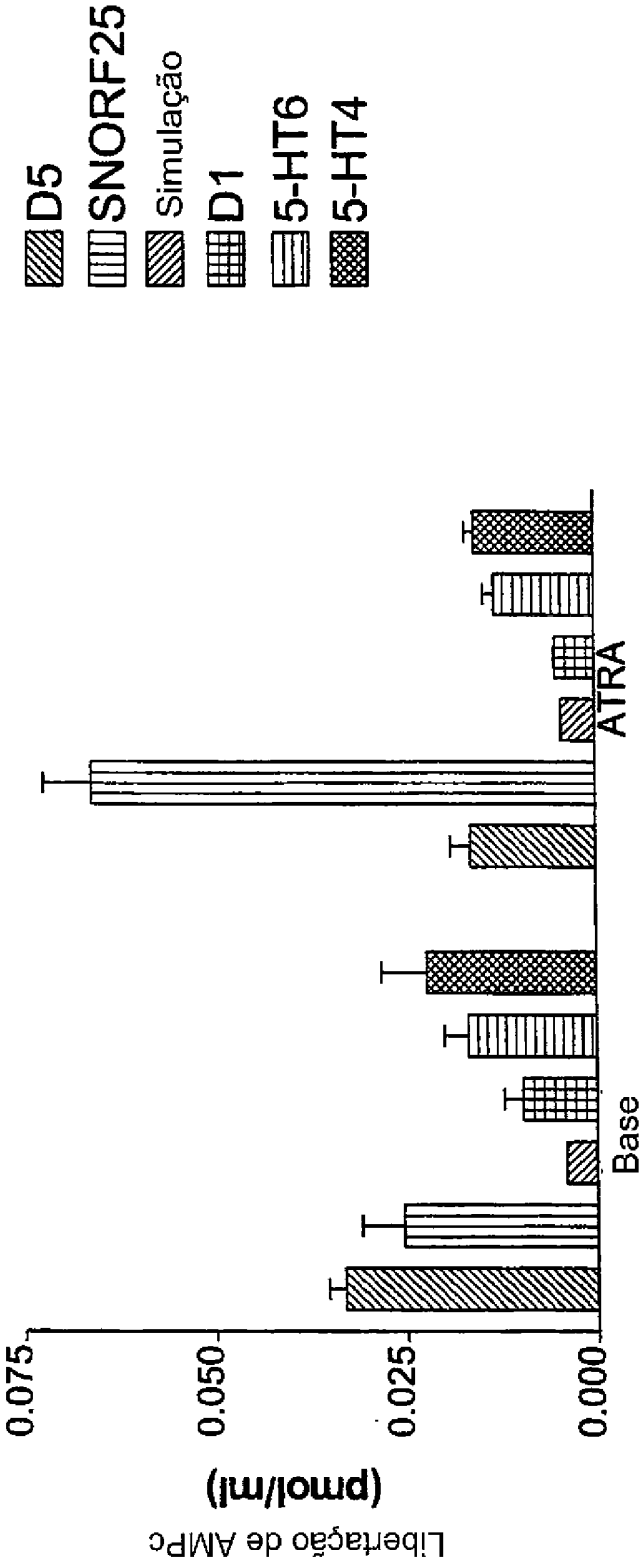


Figura 8

Curva dose-resposta de ATRA para libertação de AMPc em células Cos-7 transfectadas com SNORF25 e com transfecção simulada

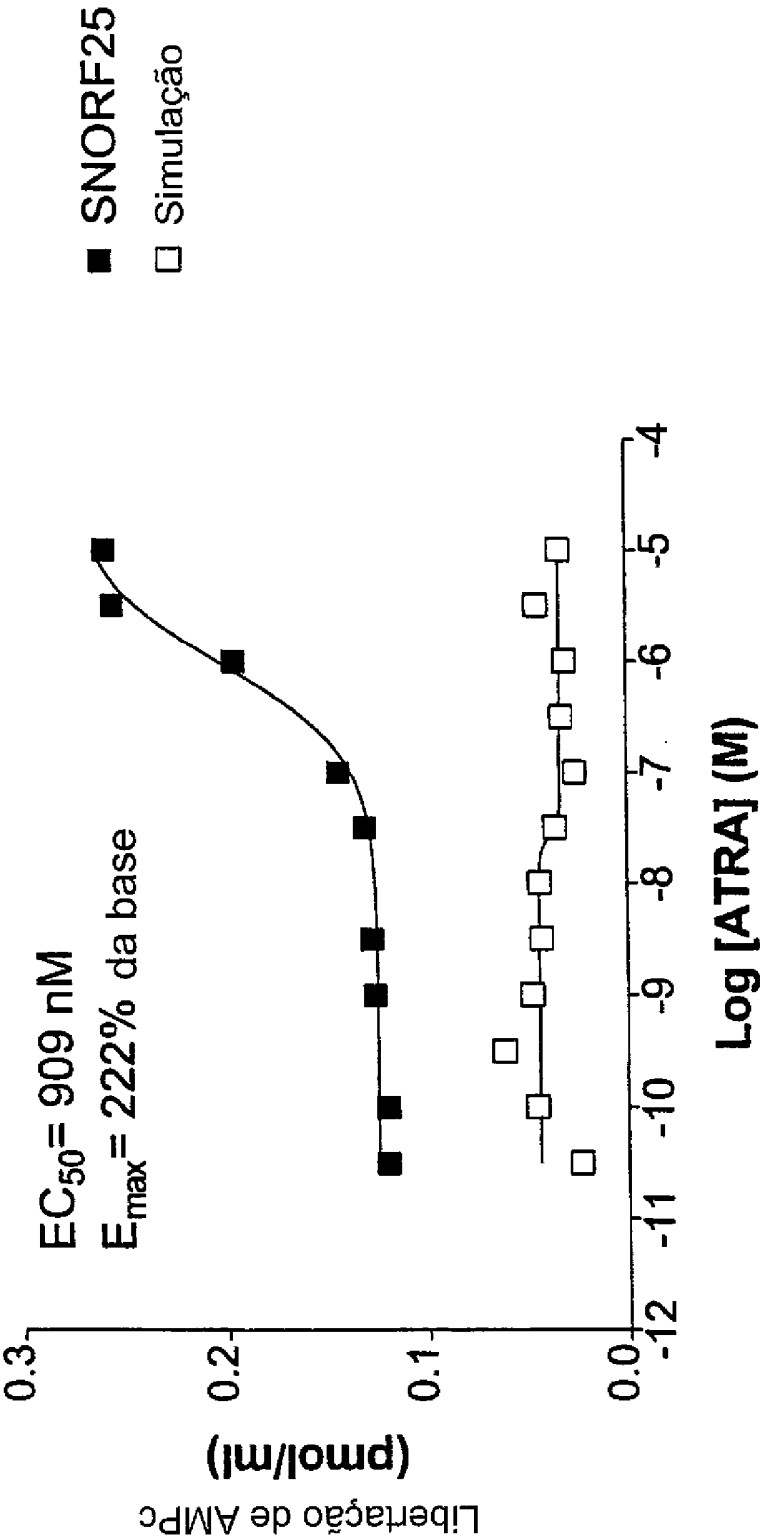


Figura 9A

SNORF25 + CFTR

Figura 9B

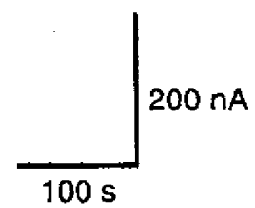
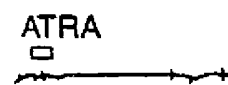
CFTR sozinho

Figura 9C

B2AR + CFTR

Figura 10

Resposta de pico média a ATRA em 17 oócitos sensíveis

