



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 604**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04710922 .8**

(86) Fecha de presentación : **13.02.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1595146**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

(54) Título: **Ensayos de cribado para moduladores de GPR55 de tipo cannabinoide-ligando.**

(30) Prioridad: **18.02.2003 US 448665 P**

(73) Titular/es: **AstraZeneca AB.**
151 85 Södertälje, SE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(72) Inventor/es: **Drmota, Tomas;**
Greasley, Peter y
Groblewski, Thierry

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 304 604 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos de cribado para moduladores de GPR55 de tipo cannabinoide-ligando.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a ensayos de cribado para compuestos que modulan la interacción entre cannabinoides y otros ligandos y el receptor GPR55 y otros receptores cannabinoides.

10 **Antecedentes**

Preparaciones de *Cannabis sativa* han sido utilizadas para propósitos medicinales y recreativos desde hace al menos 4000 años. Recientemente, los cannabinoides han sido objeto de un interés renovado por sus potenciales aplicaciones médicas, v.g., en analgesia, náuseas y estimulación del apetito.

15 Los cannabinoides ejercen sus efectos por fijarse a receptores específicos localizados en la membrana celular. Hasta la fecha han sido identificados dos tipos de receptores cannabinoides de afinidad alta por clonación molecular: 1) receptores CB1 (Devane *et al.*, 1988, Mol. Pharmacol., 34:605-613; Matsuda *et al.*, 1990, Nature, 346:561-564; Shire *et al.*, 1995, J. Biol. Chem., 270:3726-3731; Ishac *et al.*, 1996, Br. J. Pharmacol., 118:2023-2028), y 2) receptores CB2 (Munro *et al.*, 1993, Nature, 365:61-65). Tanto CB1 como CB2 están acoplados al camino de transducción de señales de la proteína G, G_i. La activación de los receptores cannabinoides conduce a la inhibición de la adenilato-ciclasa y la activación de la MAP-quinasa. Los receptores CB1 pueden modular también canales iónicos, inhibiendo los canales de calcio de tipo N y de tipo P/R, estimulando los canales K⁺ de rectificación interna e intensificando la activación del canal K⁺ de tipo A.

25 Los receptores CB1 se expresan fundamental, pero no exclusivamente, en el CNS y se cree que median los efectos en el CNS de cannabinoides aplicados endógena (v.g., anandamida) y exógenamente. Áreas periféricas de expresión incluyen, pero sin carácter limitante, la glándula hipófisis, las células inmunitarias, los tejidos reproductores, los tejidos gastrointestinales, el ganglio cervical superior, el corazón, el pulmón, la vejiga urinaria, y la glándula suprarrenal. 30 Los receptores CB1 están localizados también en terminales nerviosas centrales y periféricas, y cuando se activan, parecen suprimir la liberación neuronal de cierto número de transmisores excitativos e inhibidores, con inclusión de acetilcolina, noradrenalina, dopamina, 5-hidroxi-triptamina, ácido γ -aminobutírico, glutamato y aspartato (Pertwee, 1997, Pharmacol. Ther., 129: 74; Ong & Mackie, 1999, Neuroscience, 92: 1177; Pertwee, 2001, Progr. Neurobiol., 63: 569). La expresión del receptor CB2 está, sin embargo, restringida a la periferia, principalmente en las células inmunitarias con niveles particularmente altos en las células B y las células agresoras naturales (Galiègue *et al.*, 1995, Eur. J. Biochem., 54: 232).

Se han identificado cierto número de ligandos endógenos que se cree modulan el sistema cannabinoide por la vía de los receptores CB1 y CB2 identificados previamente, o por su acción como receptores todavía no identificados. Estos 40 ligandos incluyen, pero sin carácter limitante, anandamida, 2-aracadonilglicerol, noladin-éter, palmitoiletanolamina, virodhamine y oleiletanolamida.

Se ha demostrado que los endocannabinoides juegan un papel en la regulación fisiológica de la ingestión de alimentos y el peso corporal. Se conocen agonistas cannabinoides que aumentan el apetito (Fride, 2002, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 66: 221-233). Estudios realizados han demostrado que la anandamida aumenta la ingestión de alimento en las ratas, mientras que el antagonista no endógeno SR141716 (Sanofi Research) inhibe la ingestión de alimentos agradables al paladar.

50 Otros estudios sugieren que los endocannabinoides regulan múltiples funciones reproductoras fisiológicas y patológicas (Maccarrone *et al.*, 2002, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 66: 309-317). Se ha demostrado que los niveles de anandamida uterina afectan al embarazo y al desarrollo del embrión en los ratones. Niveles altos de anandamida en el útero del ratón han sido asociados con una disminución en la receptividad uterina. Adicionalmente, en las mujeres que sufren aborto, los niveles sanguíneos de anandamida eran 4 veces mayores que los niveles en las mujeres con gestación normal.

55 Estudios recientes sugieren que los endocannabinoides, tales como 2-araquidonoilglicerol, juegan un papel en la progresión de la patofisiología del choque, dando en un antagonista CB1 selectivo inhibe la condición de choque inducida por hemorragia (Cainazzo, 2002, Eur. J. Pharmacol., 441: 91-97).

60 Se ha demostrado también que los endocannabinoides actúan como inmunomoduladores, ejerciendo generalmente una acción negativa sobre la aparición de una diversidad de parámetros de la respuesta inmune (Parolaro *et al.*, 2002, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 66: 319-332). Estudios previos han demostrado que el receptor CB2 juega un papel muy importante en la estimulación del crecimiento de varios, si no todos, los linajes hematopoyéticos (Valk *et al.*, 1997, Blood, 90: 1448-1457; Derocq, 2000, J. Biol. Chem., 275: 15621-15628).

65 Así pues, los receptores cannabinoides son fisiológica o patofisiológicamente relevantes en una gran diversidad de áreas terapéuticas, abarcando síntomas, trastornos o síndromes de los sistemas nervioso central, cardiovascular, endo-

crino o gastrointestinal. Específicamente, la intervención de los receptores CB1 ha sido implicada en la percepción del dolor, la cognición y la memoria alterados, la adición/abuso de sustancias, trastornos de esquizofrenia/psicosis/delirio, estrés psicológico, neurológico y neurodegenerativo (es decir, enfermedad de Parkinson), alteraciones del estado de ánimo, depresión, ansiedad, regulación de la presión sanguínea, trastornos gastrointestinales, de la comida y del apetito. De hecho, fármacos que se sabe interaccionan con receptores CB1 son útiles en el tratamiento o la prevención de las afecciones mencionadas anteriormente.

En los últimos años, cierto número de estudios han sugerido la existencia de receptores cannabinoides adicionales. Calignano *et al.*, postuló la existencia de un receptor cannabinoide sensible a SR144528, distinto de CB1/CB2 (1998, *Nature*, 394: 277-281). Dichos autores presentaron pruebas de que aunque la palmitoiletanolamida carece de afinidad suficiente para los receptores CB1 o CB2, su capacidad para producir anti-hiperalgesia es atenuada fácilmente por el antagonista/agonista inverso de CB SR144528. La presencia de receptores cannabinoides distintos de CB1/CB2 en el vas deferens del ratón ha sido también propuesta. Se han obtenido también pruebas de la presencia en el endotelio vascular de un receptor sensible a SR141716, no CB1, no CB2 y no vanilloide que es insensible a los agonistas de receptores establecidos no eicosanoides CB1/CB2 pero puede ser activado a la vez por los cannabinoides eicosanoides, anandamida y metanandamida, así como por ciertos cannabinoides clásicos ("cannabidiol anormal") y su análogo más potente, O-1602 que no actúan a través de receptores CB o vanilloides. Es interesante que se ha encontrado que dos efectos del cannabidiol anormal, hipotensión y vasodilatación mesentérica, son antagonizados por el cannabinoide clásico no psicotrópico, cannabidiol. Se registró también vasodilatación mesentérica inducida por anandamida. Por último, se ha propuesto recientemente que la existencia en el cerebro de receptores de anandamida no CB1, no CB2, e insensibles a SR141716, acoplados a proteína G explica los resultados obtenidos a partir de experimentos con ratones que tenían CB silenciado ("knockout").

Teniendo en cuenta el papel de los receptores CB1 y CB2 en diversas enfermedades, existe deseo y necesidad en la técnica de identificar receptores no CB1 y no CB2 adicionales que puedan estar implicados también en la enfermedad y utilizar tales receptores, solos o como parte de un panel de otros receptores cannabinoides, para identificar y perfilar los efectos de compuestos potencialmente terapéuticos capaces de tratar una u otra de las muchas enfermedades y de los muchos trastornos mediados por los receptores cannabinoides.

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) constituyen una familia de proteínas que comparten una organización estructural común caracterizada por un extremo N-terminal extracelular, 7 hélices alfa hidrófobas que constituyen supuestamente dominios transmembranales, y un dominio C-terminal intracelular. Los GPCRs se fijan a una gran diversidad de ligandos que desencadenan señales intracelulares por la activación de proteínas G transductoras (Caron, *et al.*, 1993, *Rec. Prog. Horm. Res.*, 48: 277-290; Freedman *et al.*, 1996, *Rec. Prog. Horm. Res.*, 51: 319-353). Se han clonado más de 300 GPCRs, y se supone generalmente que existe un número de tales receptores muy superior a 1000. Aproximadamente el 50-60% de todos los fármacos clínicamente relevantes actúan por modulación de las funciones de diversos GPCRs (Gudermann *et al.*, 1995, *J. Mol. Med.*, 73: 51-63).

La clonación y secuencia del GPCR huérfano GPR55 se describe en Sawzdargo *et al.* (*Molecular Brain Research*, 64: 193-198, (1999)). La secuencia se describe también en los documentos WO00/23588 y WO01/86305. La secuencia de cDNA de GPR55 de tipo salvaje se describe en SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos codificada se describe en SEQ ID NO: 2.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la reacción filogenética de CB1 y CB2 con GPR55.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante GPR55 humana, GPR55A (SEQ ID NO: 1), con una comparación con la secuencia de número de acceso a GenBank AF096786. La secuencia de proteínas para el número de acceso AF 096786 es distinta de GPR55A en el sentido de que contiene el tramo de aminoácidos SGPPGRSLGSA (SEQ ID NO: 2), como se muestra en la figura. Se indican también las posiciones y cambios de 4 sustituciones de aminoácidos diferentes (#4, 5, 10 y 12) que han sido identificadas por los inventores.

La Figura 3 muestra la fijación específica de radioligandos cannabinoides a membranas preparadas a partir de células transfectadas con GPR55 y GPR55A.

La Figura 4 muestra el desplazamiento, dependiente de la concentración, de [³H]-SR141716 por SR141716 utilizando membranas que expresan CB1, GPR55 y GPR55A.

Las Figuras 5A-5D muestran la medida por GTPγS de la activación de GPR55A en presencia de diversas concentraciones de ligandos cannabinoides.

La Figura 6 muestra las curvas de respuesta a la concentración para CP55940 sobre GPR55a expresado en membranas HEK293s tratadas con toxina de la tos ferina, toxina del cólera, o sin tratar. La actividad dependiente de la concentración se mantiene inalterada en tanto que se reduce la actividad de fondo del sistema.

Descripción detallada

Se ha descubierto que el receptor GPR55 acoplado a la proteína G huérfana, y secuencias variantes del mismo, se fija y es activado por ligandos cannabinoides endógenos, naturales y sintéticos. De este modo se ha descubierto que GPR55 (y secuencias variantes del mismo) es un nuevo receptor cannabinoide y una diana biológica y farmacéutica de los ligandos cannabinoides. GPR55, como miembro de la clase A de la familia de receptores acoplados a proteína G, posee los motivos clásicos asociados con esta familia, con inclusión de siete hélices transmembranales hidrófobas supuestas y una secuencia (E/D)R(YFS) en el extremo citoplásmico de la hélice transmembranal 3. Filogénicamente, GPR55 es escasamente afín a otros receptores, exhibiendo la identidad más estrecha (27,2%) con otro receptor huérfano, GPR35. Sorprendentemente, GPR55 tiene baja identidad de secuencia con los receptores cannabinoides CB1 (13,5%) y CB2 (14,4%).

La presente invención está basada en el descubrimiento realizado por los inventores de que GPR55 exhibe afinidad alta para ligandos cannabinoides endógenos, naturales y sintéticos y para ligandos que incluyen, pero sin carácter limitante, palmitoiletanolamina (PEA), una molécula anti-inflamatoria y anti-hiperalgésica potente, y virodhamine. Los autores de la presente invención han descubierto que PEA y virodhamine, así como anandamina, noladin-éter, 2-aracadonilglicerol y oleiletanolamina, se fijan con afinidad alta a GPR55 y pueden activar este receptor. Por tanto, las propiedades farmacológicas de estos ligandos pueden ser mediadas por la modulación de la actividad de GPR55.

La interacción entre cannabinoide y otros ligandos y el receptor GPR55 puede aprovecharse en una diversidad de ensayos para identificar compuestos que modulan la fijación de cannabinoide, y otros ligandos a GPR55, para identificar compuestos que modulan la activación de cannabinoide y otros ligandos de GPR55, para identificar compuestos que son agonistas, antagonistas, moduladores alostéricos, o agonistas inversos de GPR55, y para identificar compuestos que modulan selectivamente GPR55, en lugar de otros receptores cannabinoides tales como CB1 o CB2. Los ensayos de la presente invención pueden utilizarse también para identificar compuestos que tienen actividad en cualquier combinación de CB1, CB1a, CB1b, CB2 y GPR55.

La modulación de la actividad de GPR55 por agonistas endógenos, naturales o sintéticos, antagonistas o agonistas inversos puede ser útil para el tratamiento (terapéutico o profiláctico) de cierto número de enfermedades en las cuales los ligandos cannabinoides juegan un papel fundamental o tienen un efecto beneficioso, en particular, pero sin carácter limitante, en tejidos en los cuales se expresa GPR55A y en donde los cannabinoides están implicados por tener un efecto modificador importante de la enfermedad, tales como el córtex prefrontal, la sustancia negra y el núcleo basal de Meynert en el CNS y trastornos de la cognición, v.g. esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y demencia, o el caudado y el putamen en la enfermedad de Parkinson y la depresión. Asimismo, en el corazón y el sistema cardiovascular, los cannabinoides pueden tener un efecto modificador de la enfermedad, particularmente a través de GPR55A sobre el tono vascular y las lesiones ateroscleróticas y también, aunque sin carácter limitante, en el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, angina, derrame cerebral, arritmia, enfermedad vascular periférica, enfermedad renal y otras secuelas vasculares de la diabetes. Asimismo, en el tracto GI, los cannabinoides pueden tener efectos moduladores a través de este receptor, particularmente sobre trastornos relacionados con la motilidad gastrointestinal tales como IBS, IBD y GERD. Asimismo, cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer de colon, adenocarcinoma intestinal y del páncreas e hígado, en particular, pueden verse afectados por la modulación cannabinoide de este receptor. Todas las formas de cánceres del CNS, en particular astrocitoma y glioblastoma y todas las formas de cáncer de pulmón, en particular los adenocarcinomas, pueden verse afectadas por la modulación cannabinoide de este receptor. Los compuestos identificados en la utilización de los ensayos de la presente invención son adicionalmente útiles para el tratamiento de la obesidad, v.g. por reducción del apetito y el peso corporal, mantenimiento de la reducción del peso y prevención del rebote; trastornos psiquiátricos tales como trastornos psicóticos, v.g. esquizofrenia y trastornos bipolares, ansiedad, trastornos ansio-depresivos, trastornos cognitivos, trastornos de la memoria, trastornos obsesivos-compulsivos, anorexia, bulimia, trastornos de la atención tales como ADHD, epilepsia, y condiciones afines; y trastornos neurológicos tales como esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud y corea de Huntington. Tales compuestos son también potencialmente útiles para el tratamiento de trastornos inmunitarios, cardiovasculares, reproductivos y endocrinos, el choque séptico y enfermedades relacionadas con los sistemas respiratorio y gastrointestinal (v.g. diarrea). Tales compuestos son también potencialmente útiles como agentes en el tratamiento del abuso extendido, la adicción y/o indicaciones de recidiva, v.g. dependencia de fármacos de tratamiento (nicotina, etanol, cocaína, opiáceos, etc.) y/o síntomas de abstinencia de fármacos de tratamiento (nicotina, etanol, cocaína, opiáceos, etc.). Dichos compuestos pueden eliminar también el aumento de peso, que acompaña normalmente a la cesación del hábito de fumar. A tales enfermedades y trastornos se hace referencia en esta memoria como enfermedades y trastornos mediados por el receptor de cannabinoides.

Ejemplos particulares de enfermedades y afecciones que pueden ser tratadas por la utilización de un compuesto modulador contra GPR55 incluyen cualesquiera de: hipertensión, aterosclerosis, y secuelas de las mismas, enfermedad microvascular de diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, IBS, IBD, cáncer de hígado, cáncer de páncreas y cáncer de colon.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la capacidad de un compuesto de ensayo para modular cada uno de un panel de receptores cannabinoides, que comprende medir el efecto modulador de un compuesto de test contra el receptor de cannabinoides que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1 o un polipéptido con al menos 90% de identidad de secuencia con el mismo, y al menos otro receptor de cannabinoides.

ES 2 304 604 T3

En una realización, el al menos otro receptor de cannabinoides se selecciona del grupo constituido por: CB1, CB1a, CB1b y CB2.

En una realización adicional, se genera un perfil del compuesto de test.

En una realización adicional, el receptor tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1.

Como se utilizan en esta memoria, los términos “modulan” o “modula” con referencia a la fijación incluyen cualquier alteración medible de la interacción de fijación entre un ligando y el receptor GPR55, que incluye, pero sin carácter limitante, la magnitud o cantidad de fijación, afinidad de fijación, y eficiencia de fijación. Por ejemplo, los compuestos identificados utilizando los ensayos y métodos de la presente invención pueden aumentar o reducir la cantidad de fijación de un ligando al receptor GPR55. Los compuestos identificados utilizando los ensayos y métodos de la presente invención pueden mejorar o inhibir la tasa de fijación de un ligando al receptor GPR55.

Como se utiliza en esta memoria, el término “inhibir” con referencia a la fijación de un ligando al receptor GPR55 significa cualquier disminución medible de la fijación.

Como se utiliza en esta memoria, el término “disminuir” con referencia a la actividad estimuladora de las células o en referencia a la fijación de un ligando al receptor GPR55 significa cualquier disminución medible de dicha actividad estimuladora o actividad de fijación celular.

Como se utiliza en esta memoria, el término “aumentar” con referencia a la actividad estimuladora de las células o con referencia a la fijación de un ligando al receptor GPR55 significa cualquier intensificación medible de dicha actividad estimuladora o actividad de fijación celular.

Como se utiliza en esta memoria, los términos “contacto” o “puesta en contacto” hacen referencia a cualquier método de combinación de componentes, tal como combinación de compuestos y/o un ligando en medio de cultivo que contiene células que expresan el receptor GPR55, o combinación de compuestos y/o un ligando en soluciones que contienen el receptor GPR55, que puede estar fijado o no a un sustrato.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “fragmento funcional” con referencia a la proteína receptora GPR55, hace referencia a porciones o fragmentos de la proteína receptora GPR55 que son funcionalmente activos(as) en los ensayos de la presente invención, es decir, son capaces de fijarse a y/o ser activados por un ligando (por ejemplo, un ligando cannabinoide). El fragmento funcional incluye también proteínas de fusión que contienen porciones del receptor GPR55.

Como se utiliza en esta memoria, el término “variante” con referencia a la proteína del receptor GPR55 incluye proteínas que tienen modificaciones, mutaciones, delecciones, o inserciones de aminoácidos y otras modificaciones de la proteína que retienen la funcionalidad en los ensayos de la presente invención. Las proteínas receptoras GPR55 variantes incluyen, pero sin carácter limitante, GPR55A, que se describe con mayor detalle más adelante en esta memoria. En una realización, la variante posee no más de 20, preferiblemente no más de 10, y todavía más preferiblemente no más de 5 sustituciones de aminoácidos de la secuencia representada en SEQ ID NO: 1 ó 2.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si una proteína o péptido es un fragmento funcional del receptor GPR55 examinando su secuencia y testando la actividad de fijación y/o activación sin experimentación excesiva. Por ejemplo, la fijación a un ligando que se sabe se fija a GPR55, tal como los identificados en los ejemplos de esta memoria, o la capacidad para activar la proteína $G\alpha_{13}$. Versiones truncadas del receptor GPR55 y proteínas de fusión que contienen porciones del receptor GPR55 pueden prepararse y testarse utilizando métodos de rutina y materiales de partida fácilmente disponibles. Típicamente, un polipéptido con al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, se considera como variante de GPR55. Polipéptidos variantes incluyen por tanto variantes alélicas existentes naturalmente así como variantes que no existen naturalmente (o modificadas por ingeniería genética).

La identidad de secuencia entre dos secuencias puede determinarse por análisis de alineación de pares por ordenador, utilizando programas tales como BestFit, Gap o FrameAlign. Una herramienta de alineación utilizada comúnmente es BestFit. En la práctica, cuando se investiga respecto a secuencias similares/idénticas para la búsqueda de consulta, partiendo de una base de datos de secuencias, es necesario por regla general realizar una identificación inicial de secuencias similares utilizando software adecuado tal como Blast, Blast2, NCBI Blast2, WashU Blast2, Fast A, Fasta3 y PILEUP, y una matriz de registro tal como Blosum 62. Tales paquetes de software procuran aproximarse estrechamente al algoritmo de alineación “patrón oro” de Smith-Waterman. Así pues, el programa motor de software/investigación preferido para uso en la evaluación de la similitud, es decir el grado en que se alinean dos secuencias polipeptídicas primarias es Smith-Waterman. Para el propósito de esta invención, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad por longitud de laguna de 12 y una penalidad por laguna de 4.

Como se utiliza en esta memoria, el término “heterólogo” con referencia al gen receptor GPR55 significa cualquier gen receptor GPR55 no endógeno, por ejemplo, uno que ha sido introducido o transfectado en una célula, que incluye

genes receptores de GPR55 procedentes de especies u organismos distintos de la célula y genes receptores GPR55 recombinantes de la misma especie u organismo que la célula.

La presente invención proporciona métodos de identificación de compuestos que modulan la interacción de fijación del receptor GPR55 o cualquier variante o fragmento funcional del mismo, con inclusión de GPR55A, con un cannabinoide, u otro ligando capaz de fijarse al receptor GPR55. La interacción de fijación puede monitorizarse por medida directa de la fijación o por medida de una señal indicativa de la activación del receptor o la actividad de estimulación de la célula.

Ejemplos de señales que pueden medirse en los ensayos de la presente invención y que sirven como indicadores de la activación del receptor o indicadores de la actividad estimuladora de las células incluyen, pero sin carácter limitante, la actividad de fosfolipasa intracelular C (PLC), actividad de fosfolipasa A (PLA), actividad de adenilil-ciclasa, niveles de cAMP, actividad de MAP-quinasa, fijación de GTP γ S, y concentración intracelular de calcio en la célula, así como apertura y cierre de canales iónicos.

La activación del receptor GPR55 puede ensayarse por examen de cierto número de sistemas de señalización celular que incluyen, pero sin carácter limitante, métodos para medir los niveles de cAMP (cribado alfa, gen informador, ensayos de centelleo por proximidad, etc.), métodos de medida de los niveles intracelulares de calcio (FLIPR, uso de proteínas G promiscuas tales como G₁₆, G_{q15}, G_{qs5}, etc.), métodos para determinación de la actividad de proteína-quinasa A, proteína-quinasa C, activación de la proteína G pequeña, fosfolipasa C, activación de proteína G pequeña, y modulación de la actividad y función de los canales iónicos.

Muchos otros métodos de medida de la activación de receptores y estimulación celular son conocidos por los expertos en la técnica y pueden utilizarse en los ensayos de la presente invención.

De acuerdo con una realización de la invención, el efecto modulador del compuesto de test contra cada receptor se determina por:

- (i) puesta en contacto de dichas células que expresan el receptor apropiado con un ligando apropiado con un ligando apropiado, en presencia o ausencia de un compuesto de test;
- (ii) determinación del efecto que el compuesto de test tiene sobre la interacción de fijación del receptor y el ligando; y
- (iii) comparación del resultado obtenido en (ii) contra cada receptor en el panel.

De acuerdo con aspectos particulares de la invención que implican la determinación de la interacción de fijación de un receptor y un ligando, la determinación implica medir la cantidad de cannabinoide u otro ligando que forma un complejo con el receptor, donde una alteración de la cantidad de dicho complejo formada en presencia de dicho compuesto de test identifica dicho compuesto como un compuesto que modula la fijación del ligando al receptor.

En una realización, los complejos receptor/ligando se aíslan antes de medir la cantidad de ligando en dichos complejos.

En otras realizaciones, el cannabinoide u otro ligando se marca de manera detectable, por ejemplo, por radiomarcación, marcación fluorescente, o marcación quimioluminiscente.

En otra realización, el cannabinoide u otro ligando se une a una enzima y la medida se realiza por ensayo de inmunsorbente unido a enzima (ELISA).

En otra realización, el receptor se proporciona como células que expresan el receptor o se proporciona como membranas preparadas a partir de dichas células.

Cualquier ligando que se fije a y/o active el receptor GPR55 o una variante o fragmento funcional del mismo puede utilizarse con los ensayos de la presente invención. Tales ligandos incluyen, pero sin carácter limitante, ligandos cannabinoides (tales como endocannabinoides (endógenos), naturales y sintéticos). Como se utiliza en esta memoria, los términos "ligando cannabinoide" y "ligando GPR55" se utilizan intercambiamente para hacer referencia a tales compuestos que se fijan a y/o interaccionan con y/o activan el receptor GPR55 o una variante o fragmento funcional del mismo. Puede utilizarse cualquier endocannabinoide en los métodos de la presente invención, incluyendo, pero sin carácter limitante, anandamida, 2-arcadonilglicerol, noladin-éter, palmitoiletanolamina, y virodhamine. Puede utilizarse cualquier cannabinoide derivado de plantas en los métodos de la presente invención, con inclusión, pero sin carácter limitante, de Δ 9-THC, cannabinol, y cannabidiol. Cualquier cannabinoide sintético derivado de plantas puede utilizarse en los métodos de la presente invención, incluyendo, pero sin carácter limitante, CP55940, WIN55-212-2, HU210, AM251, AM281, AM630, JWH015, JWH133, ACEA, y ACPA. Ligandos de receptores cannabinoides radiomarcados que pueden utilizarse en los métodos de la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, [³H]-SR141716, [³H]-WIL55-212-2, [³H]-CP55940, y [³H]-anandamida. Ejemplos de ligandos adecuados para uso en los métodos de cribado de la invención incluyen: anandamida, virodhamine, noladin-éter, 2-aracodonil-glicerol, palmitoiletanolamina, oleiletanol-amina y Δ 9-tetrahidrocannabinol.

En algunas realizaciones, se utilizan células que expresan el receptor GPR55 en ensayos para identificar compuestos que modulan la fijación ligando cannabinoide/GPR55. Las células que expresan el receptor GPR55 pueden incubarse con un ligando cannabinoide y un compuesto de test. Puede utilizarse cualquier tipo de célula en la cual se exprese el receptor GPR55, o pueda modificarse por ingeniería de modo que se exprese. Cualquier tipo de célula en la cual pueda medirse la fijación de receptores y/o la activación de receptores puede utilizarse en los ensayos de la invención. A modo de ejemplos no limitantes, el ensayo puede utilizar células de mamífero (con inclusión, pero sin carácter limitante, de células humanas, de hámster, ratón, rata, o mono) o células de animales no mamíferos tales como células de anfibios (v.g., rana) o peces. Líneas de células que pueden utilizarse en los ensayos de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, HEK-293s (riñón de embrión humano), CHO (ovario de hámster chino), LTK-(fibroblastos murinos que carecen de desoxitimidina-quinasa (dTK) citosólica), HeLa, BALB/c-3T3, oocitos de *Xenopus*; también pueden utilizarse melanóforos (células de peces y anfibios). En algunas realizaciones se utilizan células HEK-293s que expresan la proteína G, G_{α16}. Las células humanas son una realización preferida.

En algunas realizaciones, se utiliza una célula recombinante que expresa un receptor GPR55 heterólogo a partir de un constructo de expresión de gen heterólogo. Puede utilizarse cualquier especie de receptor GPR55 con inclusión, pero sin carácter limitante, de un receptor GPR55 de mamífero, incluyendo humano, roedor, murino, rata, cobayo, ratón, hámster, rhesus, mono cinomólogo, y porcino. GPR55 humano es una forma preferida. La proteína del receptor GPR55 puede ser una proteína de fusión o puede tener variación en secuencia de aminoácidos, con inclusión de delecciones, inserciones, mutaciones, y polimorfismos.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para determinar si un compuesto de ensayo es un agonista, antagonista, modulador alostérico o agonista inverso de la fijación al receptor GPR55 basado en un ensayo funcional. En algunas realizaciones, los ensayos se llevan a cabo por incubación de una célula que expresa el receptor GPR55 o un fragmento funcional o variante del mismo con un compuesto de test y determinación de si se modulan la fosfolipasa C intracelular, o de adenil-ciclase, los niveles de cAMP, la actividad de MAP-quinasa, la fijación de GTPγS o las concentraciones de calcio intracelular. Los resultados pueden compararse con controles en los cuales las incubaciones se realizan de una manera similar pero en ausencia del compuesto de test. Ensayos funcionales de este tipo pueden realizarse en asociación con ensayos de fijación, que incluyen los descritos en esta memoria. En algunas realizaciones, la célula utilizada en los ensayos funcionales es una célula recombinante que se ha transformado con un gen o constructo del receptor GPR55 heterólogo que codifica GPR55 o un fragmento funcional o variante del mismo.

Los compuestos de test que actúan como agonistas se indican por un aumento en fosfolipasa C, una disminución o aumento en la actividad de adenil-ciclase, una disminución o aumento en los niveles de cAMP, un aumento en los niveles de calcio intracelular, o un aumento en el nivel de fijación de GTPγS.

Los agonistas inversos pueden reducir la actividad de fosfolipasa o los niveles de calcio intracelular, particularmente si los ensayos se realizan en presencia de una cantidad fija de ligando. Los antagonistas bloquean la fijación de ligando al receptor pero no producen la respuesta opuesta en términos de actividad de fosfolipasa C, los niveles de fijación de GTPγS, o el calcio intracelular, que es el sello de un agonista inverso.

En algunas realizaciones de la invención, el receptor GPR55 se expresa recombinantemente en células procedentes de un gen heterólogo o heterólogo. Secuencias de ácido nucleico que codifican el receptor GPR55 humano pueden clonarse como ha sido descrito por Sawzdargo *et al.*, 1999, Mol. Brain Res., 64 193-198 (véase también, el número de acceso a GenBank AF096786, WO01/86305, y WO00/23588, todos los cuales se incorporan en esta memoria por referencia).

La secuencia codificante del receptor GPR55 puede incorporarse en un vector de expresión en un vector de expresión con un promotor y otros elementos reguladores que serán activos y apropiados para expresión en el tipo particular de célula utilizado (véase, Sambrook *et al.*, compiladores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). En algunas realizaciones, se utilizan células de mamífero. Ejemplos de promotores que pueden utilizarse para expresión en células de mamífero incluyen, pero sin carácter limitante, el promotor del gen I de metalotioneína de ratón (Hamer *et al.*, 1982, J. Mol. Appl. Gen., 1: 273-288), los promotores inmediato-precoz y TK del herpesvirus (Yao *et al.*, 1995, J. Virol., 69: 6249-6258, McKnight, 1982, Cell, 31: 355-365); el promotor precoz del virus SV40 (Benoist *et al.*, 1981, Nature, 290: 304-310), y el promotor CMV (Boshart *et al.*, 1985, Cell, 41: 521-530). Los vectores pueden incluir también intensificadores y otros elementos reguladores.

Pueden introducirse vectores de expresión en células por métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin carácter limitante, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, electroporación, transferencia de liposomas, transferencia viral, o transferencia de genes mediada por partículas.

En algunas realizaciones, el receptor GPR55 se utiliza para cribado en busca de compuestos que mimeticen la acción de cannabinoides u otros ligandos del receptor GPR55 (agonistas).

En algunas realizaciones, el receptor GPR55 se utiliza para cribado en busca de compuestos que antagonicen la acción de cannabinoides u otros ligandos del receptor de GPR55 (antagonistas).

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, se utiliza el receptor GPR55 humano.

En algunas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, se utiliza el receptor GPR55A.

Las células pueden seleccionarse y ensayarse o examinarse en cuanto a la expresión del receptor GPR55 de acuerdo con procedimientos y métodos estándar conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin carácter limitante, análisis por transferencia Northern.

En algunas realizaciones, se utilizan células que expresan el receptor GPR55 en asociación con un ligando cannabinoide en ensayos de cribado diseñados para identificar compuestos que modulan la fijación ligando cannabinoide/GPR55. Las células que expresan el receptor GPR55 pueden incubarse con un ligando cannabinoide y un compuesto de test. Se determina a continuación la magnitud en la que se desplaza la fijación de ligando cannabinoide por el compuesto de test. Pueden realizarse ensayos de radioligandos o ensayos de inmunosorbente unido a enzima en los cuales o bien el ligando cannabinoide o el compuesto de test se marca detectablemente. En ciertas realizaciones, el cannabinoide u otro ligando está radiomarcado, marcado por fluorescencia o marcado por quimioluminiscencia.

En algunas realizaciones, un cannabinoide u otro ligando y células que expresan el receptor GPR55 se utilizan en ensayos para determinar si los compuestos de test tienen algún efecto modulador sobre la fijación entre un cannabinoide u otro ligando y el receptor GPR55. Una gran diversidad de tipos de ensayos diferentes pueden realizarse utilizando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en los ensayos de fijación de radioligandos, las células que expresan el receptor GPR55 se incuban con un cannabinoide u otro ligando y con un compuesto que se testa respecto a actividad de fijación. En algunas realizaciones, la fuente del receptor GPR55 está constituida por células HEK-293s transformadas recombinantemente. En algunas realizaciones, se utilizan otros tipos de células, con inclusión de tipos de células que no expresan otras proteínas que fijen el cannabinoide u otro ligando que se utilice. Tales tipos de células pueden determinarse fácilmente realizando ensayos de fijación sobre células transformadas con GPR55 y comparando los resultados obtenidos con los que se obtienen utilizando sus contrapartidas no transformadas.

En algunas realizaciones de la invención, los ensayos funcionales, tales como movilización del calcio intracelular, se realizan utilizando el sistema de detección FLIPR (Lector de Placas por Formación de Imágenes Fluorescentes).

En algunas realizaciones de la invención, el cannabinoide u otro ligando se somete a yodación y se utiliza como trazador en ensayos de fijación de radioligandos sobre células enteras o membranas. Otros ensayos que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, el ensayo GTP γ S, ensayos de adenilil-ciclasa, ensayos que miden inositol-fosfatos, y ensayos de genes informadores (v.g., aquéllos que utilizan luciferasa, aqueeorina, fosfatasa alcalina, etc.).

Los ensayos pueden realizarse utilizando células intactas o membranas preparadas a partir de las células (véase v.g., Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 10230-10234 (1993)). En algunas realizaciones, se incuban membranas o células enteras con un cannabinoide u otro ligando y con una preparación del compuesto a testar. Una vez completada la fijación, el receptor se separa de la solución que contiene el ligando y el compuesto de test, v.g., por filtración, y se determina la cantidad de fijación que ha tenido lugar. En algunas realizaciones, el ligando utilizado se marca detectablemente con un radioisótopo tal como, por ejemplo, ¹²⁵I. Pueden utilizarse también otros tipos de marcadores, incluyendo, pero sin carácter limitante, los compuestos marcadores fluorescentes siguientes: fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficeoeritrina, ficocianina, alofocianina o-ftaldehído y fluorescamina. Pueden utilizarse también compuestos quimioluminiscentes con los ensayos de la invención, incluyendo, pero sin carácter limitante, luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

En algunas realizaciones de la invención, los ensayos se realizan en un ambiente exento de células, tal como, por ejemplo, donde se examina únicamente la interacción de fijación entre un cannabinoide u otro ligando y el receptor GPR55. En tales ensayos de fijación exentos de células o *in vitro*, el cannabinoide u otro ligando y/o el receptor GPR55 pueden estar fijados a un soporte.

En algunas realizaciones de la invención, se llevan a cabo ensayos en los cuales el compuesto se testa a concentraciones diferentes y la señal medida a estas diferentes concentraciones permite la determinación de la afinidad de fijación de los compuestos.

La fijación inespecífica puede determinarse por realización de la reacción de fijación en presencia de un gran exceso de ligando sin marcar. Por ejemplo, un cannabinoide marcado u otro ligando puede incubarse con el receptor GPR55 y el compuesto de test en presencia de un exceso de mil veces de ligando cannabinoide sin marcar. La fijación inespecífica puede restarse de la fijación total, *es decir*, fijación en ausencia de ligando sin marcar, para llegar a la fijación específica para cada muestra testada. Otros pasos tales como lavado, agitación, sacudidas, filtración y análogos pueden incluirse en los ensayos en caso necesario. Típicamente, se incluyen pasos de lavado después de la separación del ligando fijado a la membrana del ligando que queda en solución y antes de la cuantificación de la cantidad de ligando fijada, v.g., por conteo del isótopo radioactivo. La fijación específica obtenida en presencia del compuesto de test se compara con la obtenida en presencia de ligando marcado solo para determinar la extensión en la que el compuesto de test ha desplazado la fijación del receptor.

En la realización de los ensayos de fijación, los artefactos pueden hacer que parezca falsamente que un compuesto de test está interaccionando con el receptor cuando, de hecho, la fijación está siendo inhibida por algún otro mecanismo. Tales señales falsas generadas por artefactos pueden abordarse de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto a testar puede ponerse en un tampón que no inhibe por sí mismo sustan-

cialmente la fijación del cannabinoide u otro ligando al receptor GPR55, y los compuestos pueden testarse a varias concentraciones diferentes. Las preparaciones de compuestos de test pueden examinarse en cuanto a actividad proteolítica, y pueden incluirse antiproteasas en los ensayos. Adicionalmente, los compuestos que se identifican como desplazantes de la fijación del cannabinoide u otro ligando al receptor GPR55 pueden re-examinarse en una gama de concentraciones suficiente para realizar un análisis Scatchard de los resultados. Este tipo de análisis es conocido por los expertos en la técnica y puede utilizarse para determinar la afinidad de un compuesto de test para un receptor (véase, v.g., Ausubel *et al.*, compiladores, Current Protocols in Molecular Biology, 11.2.1-11.2.19, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1993); Work *et al.*, compiladores, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, NY (1978)). Pueden utilizarse programas de ordenador para ayudar al análisis de los resultados (v.g., Munson, 1983, Methods Enzymol., 92: 543-577).

Dependiendo de su efecto sobre la actividad del receptor, los agentes que inhiben la fijación del cannabinoide u otro ligando al receptor GPR55 pueden ser agonistas o antagonistas. La activación del receptor GPR55 puede monitorizarse utilizando varios métodos diferentes. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de fosfolipasa C dejando crecer células en los pocillos de una placa de microtitulación e incubando luego los pocillos en presencia o ausencia del compuesto de test; pueden extraerse luego los fosfatos de inositol (IP) totales en columnas de resina, y suspenderse de nuevo en tampón de ensayo. El ensayo de IP así recuperado puede realizarse utilizando cualquier método para determinación de la concentración de IP. Típicamente, los ensayos de fosfolipasa C se realizan por separado de los ensayos de fijación, pero es también posible realizar los ensayos de fijación y fosfolipasa C sobre una sola preparación de células.

La activación del receptor puede determinarse también basándose en una medida de la concentración de calcio intracelular. Muchos tipos de ensayos para determinación de las concentraciones de calcio intracelular son bien conocidos en la técnica y pueden emplearse en los métodos de la invención. Por ejemplo, células HEK-293s transformadas pueden dejarse crecer hasta confluencia en portaobjetos con tapa de vidrio. Después del lavado, las células pueden incubarse en presencia de un agente tal como Fluo-3, Fluo-4 o FURA-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR). Después del lavado y la incubación subsiguiente, puede medirse el desplazamiento de calcio utilizando un fotómetro.

Ensayos que miden la actividad intrínseca del receptor, tales como los basados en la medida de fosfato de inositol, pueden utilizarse para determinar la actividad de los agonistas inversos. Al contrario que los antagonistas que bloquean la actividad de los agonistas pero no producen actividad alguna por sí mismos, los agonistas inversos producen una respuesta biológica diametralmente opuesta a la respuesta producida por un agonista. Por ejemplo, si un agonista promoviera un aumento en el calcio intracelular, un agonista inverso reduciría los niveles de calcio intracelular.

Los ensayos de radioligandos y activación de células descritos en esta memoria proporcionan ejemplos de los tipos de ensayos que pueden utilizarse para determinar si un compuesto de test particular altera la fijación del cannabinoide u otro ligando al receptor GPR55 y actúa como agonista o antagonista. Existen muchas variaciones de estos ensayos que son compatibles con la presente invención. Tales ensayos pueden implicar el uso de anticuerpos marcados como medio para detectar el cannabinoide u otro ligando que se ha fijado al receptor GPR55 o pueden adquirir la forma de los ensayos de lector de placas de formación de imágenes fluorescentes.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido al cribado de métodos que utilizan GPR55 o cualquier variante o fragmento funcional del mismo, con inclusión de GPR55A, en una modalidad de matriz con CB1, CB1a, CB1b y CB2, a fin de identificar compuestos que tengan perfiles farmacológicos discretos en estos receptores. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona ensayos para identificar compuestos que actúan selectivamente como agonistas/antagonistas/agonistas inversos/moduladores alostéricos en uno solo de los receptores cannabinoides. En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona ensayos para identificar compuestos que tienen actividad en dos cualesquiera de estos receptores. En otras realizaciones adicionales, la presente invención proporciona ensayos para identificar compuestos que actúan como agonistas en uno de los receptores, pero como antagonistas en cualquiera de los restantes. Dados los diversos papeles de los cannabinoides en los procesos biológicos, los ensayos de la presente invención son útiles para la identificación y el desarrollo de compuestos con perfiles de efecto selectivos. Compuestos que modulan selectivamente un receptor cannabinoide particular pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de distintas enfermedades mediadas por el receptor particular sin afectar desfavorablemente a la fisiología normal mediada por otros receptores. De este modo, los compuestos pueden adaptarse para enfermedades particulares y los efectos secundarios pueden mantenerse en un mínimo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema de cribado en el cual se determina la capacidad moduladora de un compuesto de test por cribado del compuesto contra un panel de receptores cannabinoides, comprendiendo dicho panel el receptor GPR55A que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y al menos otro miembro de la familia de receptores cannabinoides. Cualquiera de los métodos de cribado descritos en esta memoria podría utilizarse en este aspecto de la invención.

En una realización particular, el “al menos otro miembro de la familia de receptores cannabinoides” se selecciona del grupo constituido por CB1, CB1a, CB1b y CB2.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para determinar la selectividad de un compuesto de test contra un miembro de la familia de receptores cannabinoides que comprende determinar la capacidad del compuesto de test para modular cada uno de un panel de receptores cannabinoides, comprendiendo

ES 2 304 604 T3

dicho panel de receptores cannabinoides el receptor GPR55A que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y al menos otro receptor cannabinoide seleccionado de CB1, CB1a, CB1b y CB2.

5 Puede generarse luego un perfil de los efectos del compuesto de test contra cada receptor. Dicho perfil puede, en su forma más simple, ser una tabla de datos que representa el efecto modulador de un compuesto de test contra cada receptor.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del receptor GPR55A que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y al menos otro receptor seleccionado del grupo constituido por: CB1, CB1a, CB1b y CB2, en un cribado de panel que testa la capacidad moduladora de un compuesto de test contra cada uno de los receptores presentes en el panel.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del receptor GPR55A que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, al menos otro receptor seleccionado del grupo constituido por: CB1, CB1a, CB1b y CB2, y un ligando cannabinoide para fijación a cada receptor en un ensayo de matriz para determinar el efecto modulador de un compuesto de test sobre la fijación del ligando al receptor.

20 Dados los diversos papeles de los cannabinoides en las respuestas biológicas, los ensayos de la presente invención son útiles para la identificación y el desarrollo de compuestos con perfiles de efectos selectivos. Por selectivo, en lo que respecta a GPR55, se entiende uno que exhibe al menos una actividad 10 veces mayor contra GPR55 que la de CB1 o CB2.

25 Se predice que los moduladores identificados de acuerdo con los ensayos de la presente invención tendrán utilidad potencial en el tratamiento de algunas de las enfermedades o los trastornos mediados por receptores cannabinoides, tales como los arriba identificados.

30 La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos siguientes, que tienen por objeto elaborar varias realizaciones de la invención. Estos ejemplos no pretenden limitar, ni deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación de GPR55A

40 Para testar si GPR55 tiene cualquier actividad cannabinoide o afín a los cannabinoides, se realizó una PCR y se amplificaron y secuenciaron los cDNAs aislados.

45 Se diseñaron iniciadores específicos de GPR55 basados en la secuencia de GPR55 humano (EMBL-AF096786) y se utilizaron para amplificación PCR del marco de lectura abierto de GPR55 completo. La PCR se llevó a cabo utilizando DNA genómico humano (Clontech (Palo Alto, CA) cat. #6550-1, lote #45641) como molde y los iniciadores GPR55F y GPR55R (indicados más adelante). El producto generado en la reacción PCR se utilizó subsiguientemente como molde para los iniciadores GPR55flagF y GPR55flagR en una segunda tanda de PCR para introducir un epítipo Flag así como sitios NheI y BamHI. Los fragmentos de DNA que incluían el epítipo Flag se insertaron luego en los

50 sitios de restricción correspondientes del vector pIRESneo2 (Clontech, Palo Alto, CA).

Iniciadores

55	GPR55F	5'-ATG AGT CAG CAA AAC ACC AGT GGG GAC-3' (SEQ ID NO:3)
	GPR55R	5'-TTA GCC CCG GGA GAT CGT GGT GTC-3' (SEQ ID NO:4)
		NheI Kozak Inicio Flag
60	GPR55flagF	5'-CAA <u>GCT AGC</u> TAT <u>GCC ACC</u> ATG <u>GAC TAC AAG GAC GAC GAT</u>
		<u>GAC AAG</u> AGT CAG CAA AAC ACC AGT GGG GAC-3' (SEQ ID NO:5)
		BamHI Parada
65	GPR55flagR	5'-CCT <u>GGA TCC</u> AAA TTA <u>GCC CCG</u> GGA GAT CGT GGT GTC-3' (SEQ ID NO:6)

Esto condujo a la identificación de una inserción y delección dentro de la secuencia de nucleótidos publicada (Sawz-dargo *et al.*, 1999, Mol. Brain Res., 64 193-198; número de acceso a GenBank AF096786) que dio como resultado un cambio de 11 aminoácidos en la región supuesta del bucle intracelular 2 y TM4.

El efecto de la inserción y delección sobre la secuencia de la proteína GPR55 es como sigue:

GenBank AF096786: ..S G P P G R S L G S A.. GPR55 (SEQ ID NO:8)

Clon que se obtuvo: ..L R S P R K I F G I C.. GPR55A (SEQ ID NO:7)

La alineación de este cambio puede verse en la Figura 2, que muestra la secuencia completa de la proteína para GPR55A. Este cambio, que ha sido designado por los inventores como GPR55A, se corresponde con la traducción de la secuencia del genoma humano, y ha sido identificado también en WO00/23588. Sin embargo, los autores de la presente invención han identificado también otras cuatro sustituciones simples de nucleótidos en los clones de la invención que dan como resultado diferencias de sustitución simples en la secuencia de aminoácidos entre la secuencia de la proteína GPR55A y la proteína AF096786. Éstas se muestran también en la Figura 1 y se representan por designaciones # (#4, 5, 10 y 12).

Expresión

La expresión de GPR55A se realiza por transfección transitoria de DNAs plasmídicos apropiados utilizando células HEK293s u otra línea de células apropiada y Lipofectamine Plus o reactivo de transfección alternativo, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se recogen y se preparan las membranas como se ha descrito previamente (Milligan, G. (1999) *Signal Transduction: A Practical Approach*, páginas 65-67, Oxford University Press).

Ejemplo 2

GPR55A tiene capacidad para fijarse a ligandos cannabinoides cuando se expresa en células HEK293s

Para testar si GPR55 y/o GPR55A codificaban un receptor que tuviese el potencial para comportarse como receptor cannabinoide, se transfectaron transitoriamente cDNAs que codificaban formas marcadas con FLAG de los receptores en células HEK293s utilizando lipofectamina. Las células se recogieron 48 horas después y se prepararon las membranas.

Preparaciones de membrana

Se obtuvieron preparaciones de membrana resuspendiendo las células que expresaban el receptor en tampón TE enfriado en hielo (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5) y dejándolas en hielo durante 5 minutos antes de reducir el material insoluble a un sedimento por centrifugación a 1000 g. Este proceso se repitió dos veces antes de resuspender el sedimento en un volumen apropiado de TE y guardar a -80°C.

Se incluyó como control positivo para el experimento un constructo que expresaba el receptor CB1 marcado con FLAG, mientras que se incluyó un vector vacío como control negativo.

Adicionalmente, se realizaron transfecciones para el propósito de inmunohistoquímica a fin de demostrar que los receptores se expresaban en la superficie celular (datos no presentados).

Fijación de radioligandos

Se añadieron los compuestos de test seguidos por radioligando 1,6 nM (³H-SR-141716A, ³H-CP55940 o ³H-WIN-55, 212-2) a una mezcla de ensayo que contenía membranas (10 µg de proteína) en Tris 50 mM, MgCl₂·x6H₂O 5,0 mM (pH 7,4) suplementado con BSA al 0,05%. La reacción se dejó transcurrir a 30°C durante 90 min y se terminó luego por filtración rápida utilizando filtros GF/B (preimpregnados en PEI al 0,05%) que se lavaron con Tris 50 mM (pH 7,4), MgCl₂·x6H₂O. Los filtros se cubrieron luego con un agente de centelleo y se sometieron a conteo en cuanto a la cantidad de radioligando retenida. La fijación inespecífica se determinó en presencia de SR141716A 200 nM, CP55940 o WIN-55,212-2.

Resultados

Se seleccionaron tres radioligandos cannabinoides (³H]-CP55940 - agonista cannabinoide no selectivo; [³H]-WIN55-212-2 - agonista cannabinoide no selectivo; [³H]-SR141716, agonista selectivo inverso CB1) como herramientas para comprobar la fijación específica en las transfecciones de GPR55 utilizando un exceso sin marcar del mismo ligando para determinar el nivel de fijación inespecífica. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Se obtuvo la fijación inespecífica para las células no transfectadas (no presentada) o células de control negativas transfectadas con vector. EN cambio, la fijación específica se obtuvo, como era de esperar, para las células transfectadas

con el control positivo CB1 con cada uno de los radioligandos. Las membranas preparadas a partir de células transfectadas con cualquiera de GPR55 o GPR55A exhibían una fijación importante para [³H]-CP55940 y [³H]-SR141716, pero poca o ninguna fijación a [³H]-WIN55-212, lo que sugería que GPR55 y GPR55A tienen propiedades de fijación de ligandos semejantes a algunos cannabinoides.

Con objeto de evaluar ulteriormente esta fijación, se generaron curvas competición-fijación para [³H]-SR141716 que competía con la versión sin marcar de sí mismo contra GPR55, GPR55A, CB1 y membranas de control de vector. Los resultados se muestran en la Figura 4. Estos datos demuestran un valor CI_{50} de 0,03 nM para SR141716 en CB1, como era de esperar, y no se observó existencia de fijación específica alguna a las membranas derivadas de células transfectadas con el vector. GPR55 y GPR55A exhibían ambas curvas de desplazamiento por afinidad nanomolar.

Ejemplo 3

GPR55 y GPR55A tienen actividades funcionales de cannabinoides

Para investigar si GPR55 o GPR55A poseían cualquier actividad funcional semejante a los cannabinoides, se testaron membranas celulares que expresaban el receptor en un ensayo de GTP γ S. Las membranas con o sin ligando 20 μ M se ensayaron respecto a su actividad estimuladora o inhibidora de la fijación de GTP γ S. Como control negativo, se prepararon membranas celulares partiendo de células transfectadas con vector vacío, y como control positivo, se prepararon membranas celulares partiendo de células transfectadas con CB1.

Ensayo de fijación de GTP γ S

Se determinó la actividad del receptor utilizando un ensayo de fijación de GTP γ S como sigue: se diluyeron 10 μ g de membranas en 200 μ l de NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, HEPES 50 mM (pH 7,4), DTT 1 mM, BSA al 0,1% y GDP 100 μ M. Se añadió a esto la concentración requerida del compuesto de test y 0,1 μ Ci ³⁵S-GTP γ S en presencia o ausencia de una concentración CE_{80} de agonista (HU210). La reacción se dejó transcurrir a 30°C durante 45 min. Se transfirieron luego las muestras a filtros GF/B utilizando un cosechador de células y se lavaron con tampón de lavado (Tris 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM, NaCl 50 mM). Los filtros se cubrieron luego con agente de centelleo y se sometieron a conteo respecto a la cantidad de ³⁵S-GTP γ S retenida por el filtro. Para determinar el nivel de fijación inespecífica se efectuaron reacciones de control en presencia de GTP γ S 10 μ M.

La actividad funcional de los ligandos en presencia o ausencia de agonistas se determinó como sigue: Se sustrajo la fijación inespecífica de todos los valores determinados. El efecto de los compuestos para diversas concentraciones se representó gráficamente de acuerdo con la ecuación

$$y = A + (B - A) / (1 + ((C/x)^D))$$

y se estimaron CE_{50} o CI_{50} .

Resultados

No se detectó actividad significativa alguna para ningún compuesto contra las membranas preparadas a partir de transfecciones del control de vector. El perfil de los compuestos contra CB1 era como se esperaba para dichos ligandos en los receptores CB1. Los compuestos que actuaban sobre GPR55 (datos no presentados) o GPR55A (véase la Tabla 1) exhibían diversos efectos sobre la fijación de GTP γ S.

Se realizaron determinaciones de CE_{50} para definir ulteriormente las actividades agonistas de los ligandos cannabinoides. Como anteriormente, ninguno de los ligandos exhibía actividad sobre las células transfectadas con el vector de control. Se hace referencia a las figuras 5A-5D para los resultados. Las células transfectadas con CB1 generaban valores CE_{50} comparables a los esperados para cada ligando (datos no presentados). GPR55A exhibía activación dependiente de la concentración en respuesta a los ligandos naturales anandamida, Noladin-éter, 2-aracodonilglicerol, palmitoiletanolamina y Δ 9-tetrahidro-cannabinol. Los datos para estos y otros compuestos se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Actividad de los ligandos en GPR55A(Los datos de antagonistas se generaron en presencia de una concentración CE_{80} de HU210)

COMPUESTO	CE_{50} (nM) (excepto*)	n
Anandamida	$18,4 \pm 4,1$	6
Noladin-Éter	$11,5 \pm 0,5$	2
Palmitoiletanolamida	$3,2 \pm 1,3$	3
Virodhamine	$10,4 \pm 1,4$	7
2-AG	$3,5 \pm 2,4$	2
Oleiletanolamida	424 ± 203	3
$\Delta 9$ -THC	$8,9 \pm 1,1$	3
CP55940	$7,1 \pm 1,3$	5
Win55	NA	3
Hu210	33 ± 12	2
JWH-015	$4,75 \pm 0,2S$	2
JWH-133	NA	2
Cannabidiol	$354 \pm 63^*$	4
Cannabinol	NA	3
Cannabidiol anormal	2780 ± 98	2

NA = inactivo

* Medida de CI_{50}

Ejemplo 4

Evaluación de si GPR55A se acopla o no a las proteínas G G_i o G_s

El uso de las toxinas de tos ferina y cólera permite la inhibición selectiva de la activación de las proteínas G G_i y G_s . Se trataron células HEK293s transfectadas transitoriamente con GPR55a con cualquiera de las toxinas y las membranas generadas se testaron respecto a su capacidad para generar una señal de $GTP\gamma S$. La Figura 6 muestra las curvas de respuesta a la concentración para CP55940 sobre GPR55a expresado en membranas HEK293s tratadas con toxina de la tos ferina, toxina del cólera, o sin tratar. La actividad dependiente de la concentración se mantiene inalterada, en tanto que la actividad de ruido del sistema se reduce. Ninguna de las toxinas era capaz de afectar al ensayo de $GTP\gamma S$, lo que demuestra que GPR55a no se acopla a G_i o G_s en este sistema y por tanto está acoplado probablemente a otra proteína G.

Los ejemplos que anteceden tienen por objeto ilustrar la invención y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la capacidad de un compuesto de test para modular cada uno de un panel de receptores cannabinoides, que comprende medir el efecto modulador de un compuesto de test contra el receptor cannabinoide que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1 o un polipéptido con al menos 90% de identidad de secuencia con el mismo, y al menos otro receptor cannabinoide.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos otro receptor cannabinoide se selecciona del grupo constituido por: CB1, CB1a, CB1b y CB2.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente generar un perfil del compuesto de test.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el receptor tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, método que mide el efecto que el compuesto de test tiene sobre la interacción de fijación del receptor y un ligando.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la interacción de fijación se monitoriza por medida directa de la fijación o por medida de una señal indicativa de la activación del receptor o la actividad estimuladora de las células.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la señal indicativa de la activación del receptor se selecciona del grupo constituido por: actividad de fosfolipasa C intracelular, actividad de fosfolipasa A, actividad de adenilil-ciclasa, nivel de cAMP, actividad de MAP-quinasa, fijación de GTP γ S, y concentración intracelular de calcio.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la determinación de la interacción de fijación implica medir la cantidad de ligando que forma un complejo con el receptor, en donde una alteración en la cantidad de dicho complejo formada en presencia de dicho compuesto de test identifica dicho compuesto como un compuesto que modula la fijación del ligando al receptor.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ligando se selecciona del grupo constituido por: anandamida, virodhamine, noladin-éter, 2-aracodonil-glicerol, palmitoiletanolamina, oleiletanolamina y Δ 9-tetrahidrocannabinol.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en donde los complejos receptor/ligando se aíslan antes de medir la cantidad de ligando en dichos complejos.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde el ligando está marcado detectablemente.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ligando está radiomarcado, marcado por fluorescencia, o marcado por quimioluminiscencia.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ligando está unido a una enzima, y la medida se realiza por ensayo de inmunsorbente unido a enzima (ELISA).
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los receptores son expresados por células.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada receptor del panel se expresa partiendo de una población de células distinta.
16. El método de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15, en donde las células son células de mamífero.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el receptor se expresa a partir de un gen receptor heterólogo.
18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el efecto modulador del compuesto de test contra cada receptor se determina por:
 - (i) puesta en contacto de dichas células que expresan el receptor apropiado con un ligando apropiado, en presencia o ausencia de un compuesto de test;
 - (ii) determinación del efecto que el compuesto de test tiene sobre la interacción de fijación del receptor y el ligando; y

ES 2 304 604 T3

(iii) comparación del resultado en (ii) contra cada receptor en el panel.

19. El uso del receptor GPR55A que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y al menos otro receptor seleccionado del grupo constituido por: CB1, CB1a, CB1b y CB2, en un cribado en panel para testar el efecto modulador de un compuesto de test contra cada uno de los receptores en el panel.

20. El uso del receptor GPR55A que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, al menos otro receptor seleccionado del grupo constituido por: CB1, CB1a, CB1b y CB2, y un ligando cannabinoide para fijación a cada receptor en un ensayo de matriz para determinar el efecto modulador de un compuesto de test sobre la fijación del ligando al receptor.

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el ligando cannabinoide se selecciona del grupo constituido por: anandamida, virodhamine, noladin-éter, 2-aracodonilglicerol, palmitoiletanolamina, oleiletanol-amina y Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

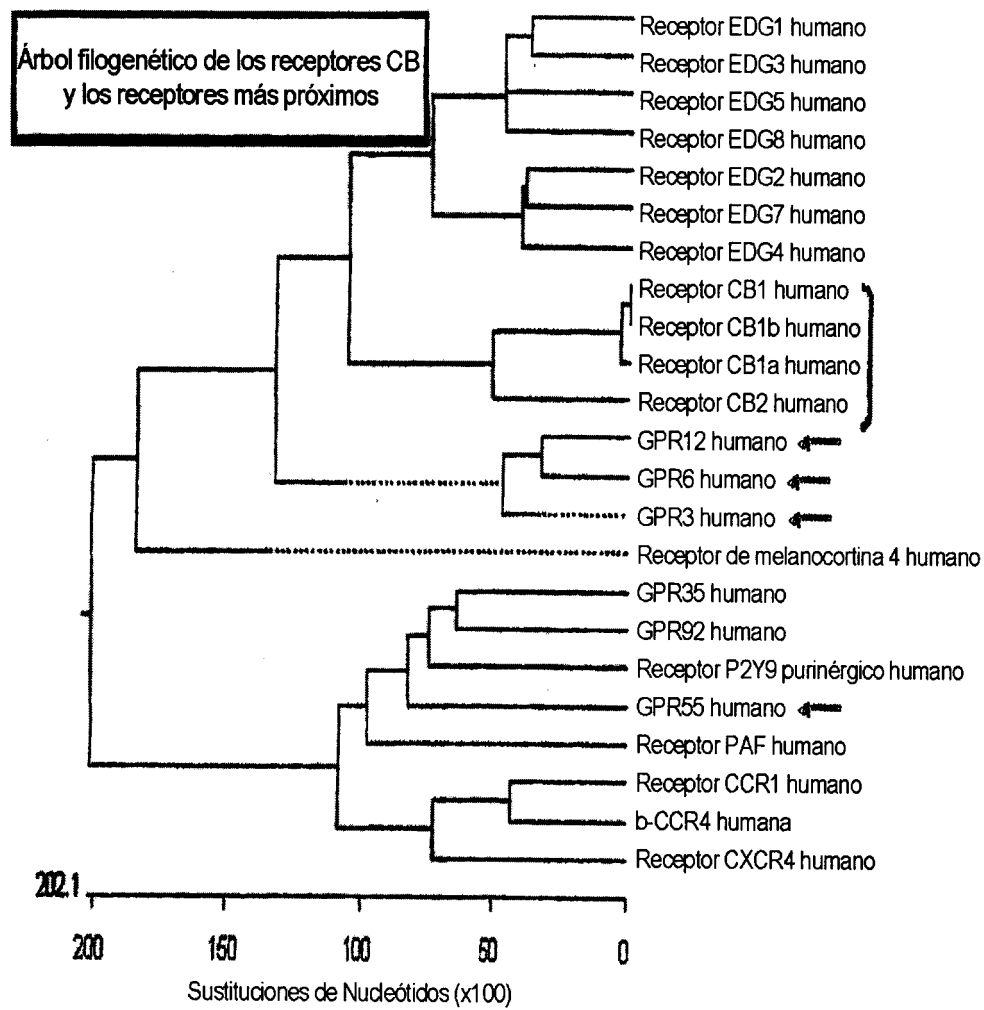


Figura 1

ES 2 304 604 T3

1 80
 TM1-----TM1 IC1 TM2-----TM2
 MSQQNTSGDCCLFDGVNELMKTLOFAVHIPTFVLGLLNLLAIHGFSFPLKNRWPDYAATSIYMINLAVFDLLLVLSPFK

81 160
 EC1 TM3-----TM3 IC2 TM4-----TM4
 MVL9QVQSFPPELCTIVECLYFVSMYGSVFTICFISMRFLAIRYPILLVSHLRSPRKIFGICCTIWVLVWVGSIPIYSFR
 #10 L SGPPGRSLGSA
 #5 Y

161 240
 EC2 TM5-----TM5 IC2 TM6-----TM6
 GKVEKYNCFHNMSDDTWSAKVFFPLEVPGFLLPMGIM3VCCSRSIHILLGRDHTQDWVQOKACTYSLAASLAVFVVSTL
 #12 S

241 319
 -----TM6 EC3 TM7-----TM7
 FVHLQFFLQFLVRNSFIVECRAKQSI8FFLQLSMCF8NVNCCLDVFCYYPVKEFRMNIRAHRP8RVQLVLQDTTISR8
 #4 R

Figura 2

CCPM

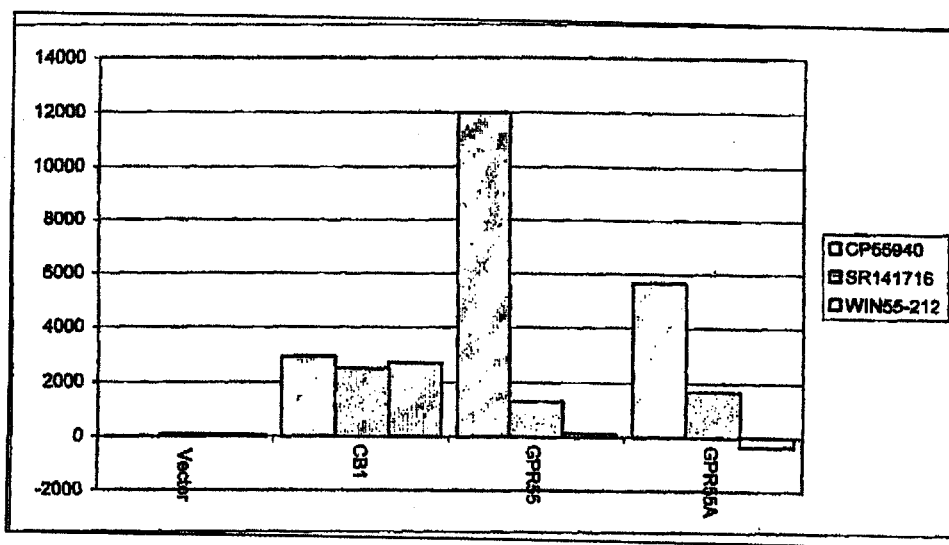


Figura 3

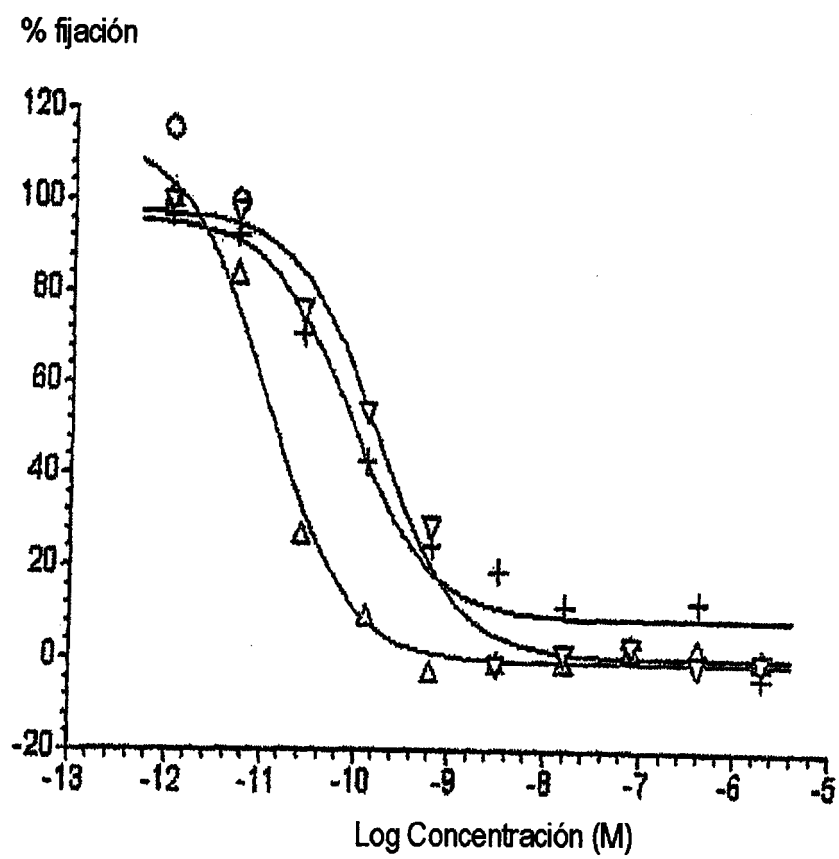


Figura 4

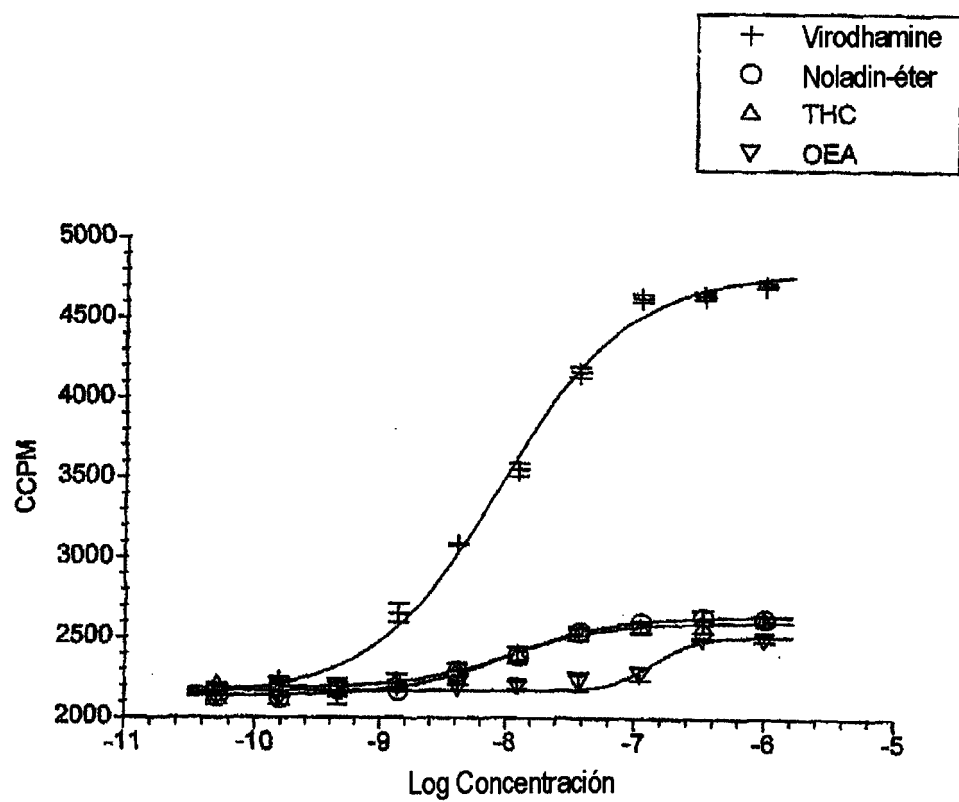


Figura 5A

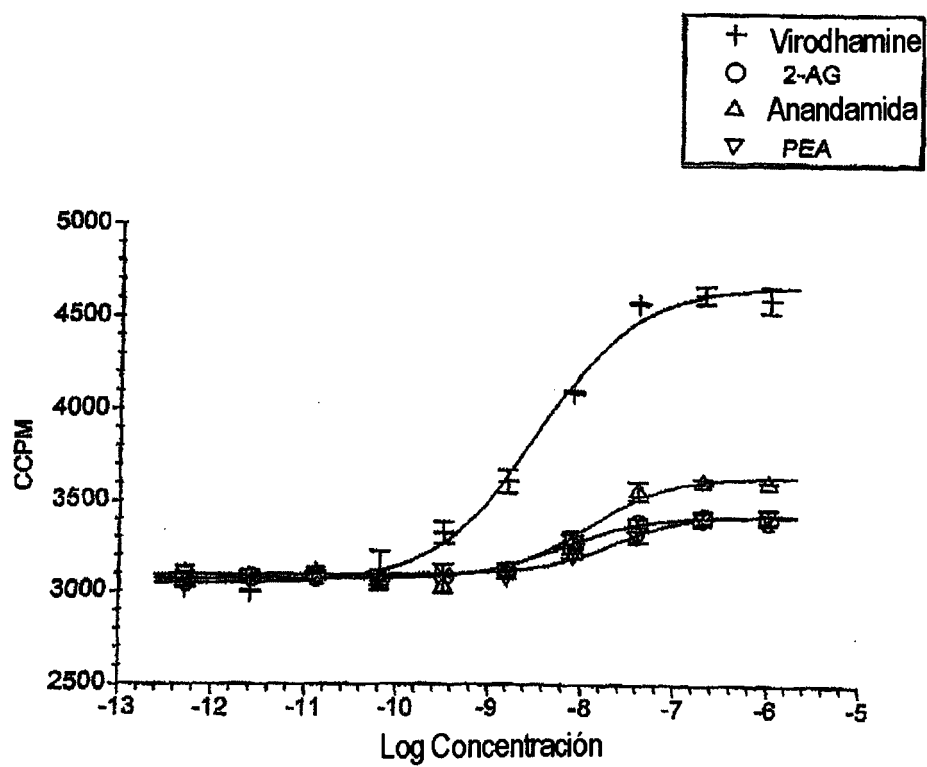


Figura 5B

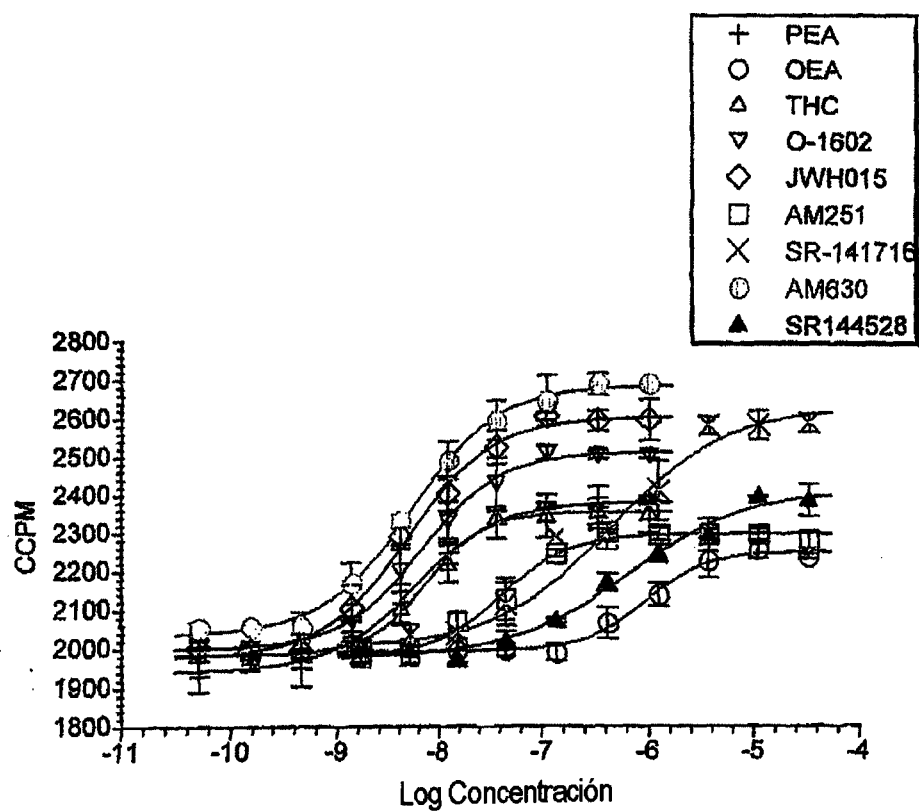


Figura 5C

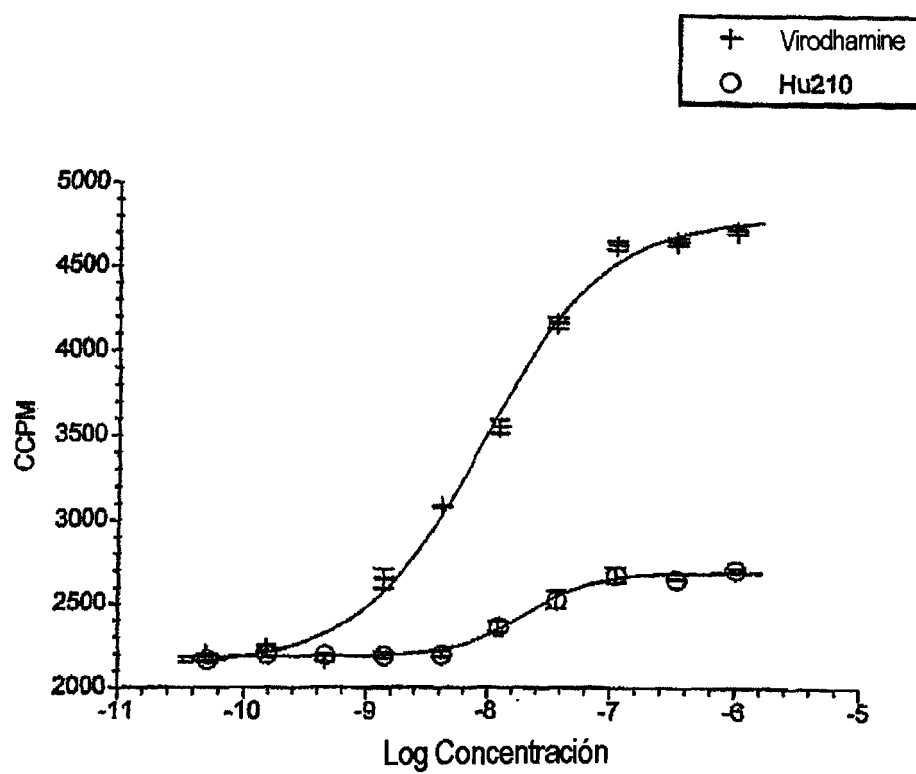


Figura 5D

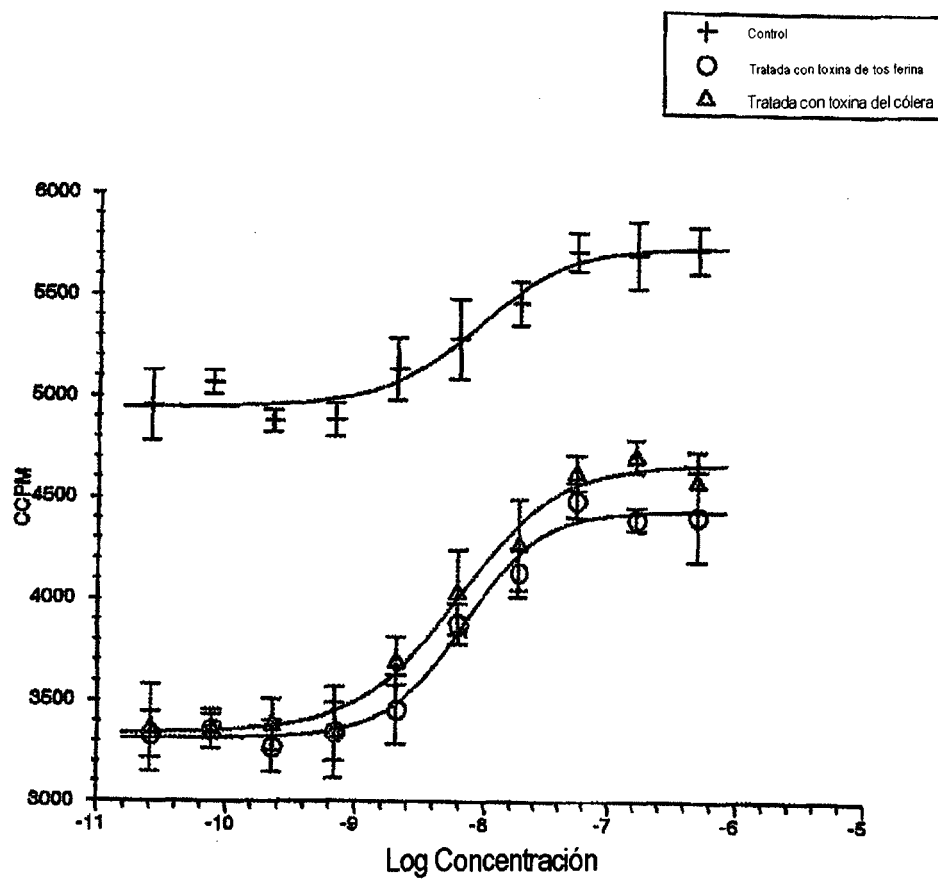


Figura6

ES 2 304 604 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AstraZeneca AB

5 <120> Nuevos Ensayos

<130> LDG/100944-1

10 <150> US 60/448,665

<151> 2003-02-18

<160> 9

15 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

20 <211> 319

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Met Ser Gln Gln Asn Thr Ser Gly Asp Cys Leu Phe Asp Gly Val Asn
1 5 10 15

30 Glu Leu Met Lys Thr Leu Gln Phe Ala Val His Ile Pro Thr Phe Val
20 25 30

35 Leu Gly Leu Leu Leu Asn Leu Leu Ala Ile His Gly Phe Ser Thr Phe
35 40 45

40 Leu Lys Asn Arg Trp Pro Asp Tyr Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Met Ile
50 55 60

Asn Leu Ala Val Phe Asp Leu Leu Leu Val Leu Ser Leu Pro Phe Lys
65 70 75 80

45 Met Val Leu Ser Gln Val Gln Ser Pro Phe Pro Ser Leu Cys Thr Leu
85 90 95

50 Val Glu Cys Leu Tyr Phe Val Ser Met Tyr Gly Ser Val Phe Thr Ile
100 105 110

Cys Phe Ile Ser Met Asp Arg Phe Leu Ala Ile Arg Tyr Pro Leu Leu
115 120 125

55 Val Ser His Leu Arg Ser Pro Arg Lys Ile Phe Gly Ile Cys Cys Thr
130 135 140

60 Ile Trp Val Leu Val Trp Thr Gly Ser Ile Pro Ile Tyr Ser Phe His
145 150 155 160

Gly Lys Val Glu Lys Tyr Met Cys Phe His Asn Met Ser Asp Asp Thr
165 170 175

65 Trp Ser Ala Lys Val Phe Phe Pro Leu Glu Val Phe Gly Phe Leu Leu
180 185 190

ES 2 304 604 T3

Pro Met Gly Ile Met Gly Phe Cys Cys Ser Arg Ser Ile His Ile Leu
 195 200 205
 5 Leu Gly Arg Arg Asp His Thr Gln Asp Trp Val Gln Gln Lys Ala Cys
 210 215 220
 10 Ile Tyr Ser Ile Ala Ala Ser Leu Ala Val Phe Val Val Ser Phe Leu
 225 230 235 240
 Pro Val His Leu Gly Phe Phe Leu Gln Phe Leu Val Arg Asn Ser Phe
 245 250 255
 15 Ile Val Glu Cys Arg Ala Lys Gln Ser Ile Ser Phe Phe Leu Gln Leu
 260 265 270
 20 Ser Met Cys Phe Ser Asn Val Asn Cys Cys Leu Asp Val Phe Cys Tyr
 275 280 285
 25 Tyr Phe Val Ile Lys Glu Phe Arg Met Asn Ile Arg Ala His Arg Pro
 290 295 300
 Ser Arg Val Gln Leu Val Leu Gln Asp Thr Thr Ile Ser Arg Gly
 305 310 315
 30 <210> 2
 <211> 319
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 40 Met Ser Gln Gln Asn Thr Ser Gly Asp Cys Leu Phe Asp Gly Val Asn
 1 5 10 15
 45 Glu Leu Met Lys Thr Leu Gln Phe Ala Val His Ile Pro Thr Phe Val
 20 25 30
 Leu Gly Leu Leu Leu Asn Leu Leu Ala Ile His Gly Phe Ser Thr Phe
 35 40 45
 50 Leu Lys Asn Arg Trp Pro Asp Tyr Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Met Ile
 50 55 60
 55 Asn Leu Ala Val Phe Asp Leu Leu Leu Val Leu Ser Leu Pro Phe Lys
 65 70 75 80
 60 Met Val Leu Ser Gln Val Gln Ser Pro Phe Pro Ser Leu Cys Thr Leu
 85 90 95
 Val Glu Cys Leu Tyr Phe Val Ser Met Tyr Gly Ser Val Phe Thr Ile
 100 105 110

ES 2 304 604 T3

Cys Phe Ile Ser Met Asp Arg Phe Leu Ala Ile Arg Tyr Pro Leu Leu
 115 120 125
 5 Val Ser His Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ser Leu Gly Ser Ala Cys Thr
 130 135 140
 10 Ile Trp Val Leu Val Trp Thr Gly Ser Ile Pro Ile Tyr Ser Phe His
 145 150 155 160
 Gly Lys Val Glu Lys Tyr Met Cys Phe His Asn Met Ser Asp Asp Thr
 165 170 175
 15 Trp Ser Ala Lys Val Phe Phe Pro Leu Glu Val Phe Gly Phe Leu Leu
 180 185 190
 20 Pro Met Gly Ile Met Gly Phe Cys Cys Ser Arg Ser Ile His Ile Leu
 195 200 205
 Leu Gly Arg Arg Asp His Thr Gln Asp Trp Val Gln Gln Lys Ala Cys
 210 215 220
 25 Ile Tyr Ser Ile Ala Ala Ser Leu Ala Val Phe Val Val Ser Phe Leu
 225 230 235 240
 30 Pro Val His Leu Gly Phe Phe Leu Gln Phe Leu Val Arg Asn Ser Phe
 245 250 255
 35 Ile Val Glu Cys Arg Ala Lys Gln Ser Ile Ser Phe Phe Leu Gln Leu
 260 265 270
 Ser Met Cys Phe Ser Asn Val Asn Cys Cys Leu Asp Val Phe Cys Tyr
 275 280 285
 40 Tyr Phe Val Ile Lys Glu Phe Arg Met Asn Ile Arg Ala His Arg Pro
 290 295 300
 45 Ser Arg Val Gln Leu Val Leu Gln Asp Thr Thr Ile Ser Arg Gly
 305 310 315

<210> 3

<211> 27

50 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

55 <223> Iniciador oligonucleotídico

<400> 3

60 atgagtcagc aasacaccag tggggac

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

65 <213> Artificial

<220>

ES 2 304 604 T3

<223> Iniciador oligonucleotídico

<400> 4

5 ttagcccccgg gagatcgtgg tgtc 24

<210> 5

10 <211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

15 <220>

<223> Iniciador oligonucleotídico

<400> 5

20 caagctagct atgccaccat ggactacaag gacgacgatg acaagagtoa gcaaaacacc 60
agtggggac 69

25 <210> 6
<211> 36

<212> DNA

30 <213> Artificial

<220>

<223> Iniciador oligonucleotídico

35 <400> 6

40 cctggatcca aattagcccc gggagatcgt ggtgtc 36

<210> 7

<211> 11

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

50 Leu Arg Ser Pro Arg Lys Ile Phe Gly Ile Cys
1 5 10

55 <210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 8

65 Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ser Leu Gly Ser Ala
1 5 10

<210> 9

ES 2 304 604 T3

<211> 960

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

	atgagtcagc aaaacaccag tggggactgc ctgtttgacg gtgtcaacga gctgatgaaa	60
10	accctacagt ttgcagtoea catcccccacc ttctgtcctgg gcctgctcct caacctgctg	120
	gccatccatg gcttcagcac cttccttaag aacagggtggc cagattatgc tgccacctcc	180
	atctacatga tcaacctggc agtctttgac ctgctgctgg tgcctcctcc cccattcaag	240
15	atgggtcctgt cccagggtaca gtccccccttc cctgcctgtg gcacctgggt ggagtgccct	300
	tacttcgtca gcatgtacgg aagcgtcttc accatctgct tcatcagcat ggaccgggttc	360
	ttggccatcc gttaccgct actgggtgagc cactccggtc ccccaggaag atctttggga	420
20	tctgcatgca caatctgggt cctgggtgtgg acoggaagca tccctatcta cagtttccat	480
	gggaaagtgg aaaatacat gtgtctccac aacatgtctg atgatacctg gagcgccaag	540
25	gtcttcttcc cgtggaggt gtttggcttc ctcttccca tgggcatcat gggcttctgc	600
	tgctccagga gcatccacat cctgctgggc cgcgagagac acaccagga ctgggtgcag	660
	cagaagcct gcatctacag categcagcc agcctggctg tattcgtggt ctcttctctc	720
30	ccagtccacc tggggttctt cctgcagttc ctgggtgagaa acagctttat cgtagagtgc	780
	agagccaagc agagcatcag cttcttcttg caattgtcca tgtgtttctc caatgtcaac	840
	tgotgcctgg atgttttctg ctactacttt gtcacaaag aattccgcat gaacatcagg	900
35	gccacccggc cttccaggtt ccagctggtc ctgcaggaca ccacgatctc ccggggctaa	960

40

45

50

55

60

65