



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 020**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 5/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01938027 .8**

86 Fecha de presentación : **21.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1276867**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

54 Título: **Uso del receptor acoplado a proteína G de tipo latrofilina en humanos en procedimientos de monitorización.**

30 Prioridad: **22.03.2000 US 191103 P**
12.06.2000 US 210745 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Bayer HealthCare AG.**
51368 Leverkusen, DE

72 Inventor/es: **Ramakrishnan, Shyam**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Uso del receptor acoplado a proteína G de tipo latrofilina en humanos en procedimientos de monitorización.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere al área de los receptores acoplados a proteína G. Más particularmente, se refiere al área de los receptores acoplados a proteína G de tipo latrofilina, en humanos, y su uso en la monitorización de fármacos.

10 **Antecedentes de la invención***Receptores acoplados a proteína G*

Muchos procesos médicos significativos son mediados por vías de transducción de señal que implican la presencia de proteínas G (Lefkowitz, *Nature* 351, 353-354, 1991). La familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) incluye a los receptores de hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, y virus. Ejemplos específicos de GPCR incluyen receptores para agentes tan diversos como la dopamina, calcitonina, hormonas adrenérgicas, endotelina, AMPc, adenosina, acetilcolina, serotonina, histamina, trombina, quinina, hormona estimulante del folículo, opsinas, gen-1 de diferenciación endotelial, rodopsinas, agentes del olor, citomegalovirus, proteínas G en sí mismas, proteínas efectoras como la fosfolipasa C, la adenil ciclasa, y la fosfodiesterasa, y proteínas actuantes como la proteína quinasa A y la proteína quinasa C.

Los GPCR tienen siete dominios que atraviesan la membrana, y conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. Se ha caracterizado a los GPCR (también conocidos como receptores 7TM) como que incluyen a estos siete tramos hidrófobos conservados de entre 20 y 30 aminoácidos, que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. La mayoría de los GPCR tienen residuos sencillos de cisteína conservados en cada uno de los primeros dos bucles extracelulares, que forman enlaces disulfuro, que se cree que estabilizan la estructura funcional de la proteína. Las siete regiones transmembrana se designan como TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 y TM7. TM3 ha sido relacionada con la transducción de señal.

La fosforilación y la lipidación (palmitilación o farnesilación) de los residuos de cisteína pueden influir en la transducción de señal de algunos GPCR. La mayoría de los GPCR contienen sitios potenciales de fosforilación, que contienen el tercer bucle citoplásmico y/o los términos carboxi. Para muchos GPCR, como el receptor β -adrenérgico, la fosforilación por proteína quinasa A y/o quinasas específicas del receptor median en la de-sensibilización del receptor.

Para algunos receptores, se cree que los sitios de unión a ligando de los GPCR comprenden cuencas hidrófilas formadas por varios dominios transmembrana de GPCR. Las cuencas hidrófilas están rodeadas por residuos hidrófobos de los GPCR. Se asume que el lado hidrófilo de cada hélice transmembrana de GPCR se orienta hacia adentro y forma un sitio polar de unión a ligando. TM3 ha sido relacionado en varios GPCR con la posesión de un sitio de unión a ligando, como el residuo de aspartato TM3. Las serinas TM5, una asparragina TM6, y fenilalaninas o tirosinas TM6 o TM7, también están relacionadas con la unión a ligandos.

Los GPCR están acoplados dentro de la célula, mediante proteínas G heterotriméricas, a varias enzimas intracelulares, canales de iones, y transportadores (ver Johnson *et al.*, *Endoc. Rev.* 10, 317-331, 1989). En una célula, distintas subunidades alfa de la proteína G estimulan a efectores particulares para modular varias funciones biológicas. La fosforilación de residuos citoplásmicos de GPCR es un mecanismo importante para la regulación de algunos GPCR. Por ejemplo, en una forma de transducción de señal, el efecto de la unión a hormona es la activación dentro de la célula de la enzima adenilato ciclasa. La activación de enzima por hormonas depende de la presencia del nucleótido GTP. El GTP también influye en la unión a hormonas. Una proteína G conecta el receptor hormonal a la adenilato ciclasa. La proteína G intercambia GTP para enlazar GDP cuando se activa por un receptor hormonal. La forma transportadora de GTP se une entonces a la adenilato ciclasa activada. La hidrólisis de GTP a GDP, catalizada por la proteína G en sí misma, devuelve a la proteína G a su forma inactiva, basal. Por lo tanto, la proteína G cumple una doble función, como un intermediario que retransmite la señal desde un receptor a un efector; y como un reloj que controla la duración de la señal.

Durante los últimos 15 años, se han introducido exitosamente en el mercado cerca de 350 agentes terapéuticos que se dirigen a los receptores GPCR. Esto indica que esos receptores tienen una historia conocida y probada como dianas terapéuticas. Claramente, existe una necesidad actual de caracterizar e identificar más GPCR que pueden jugar un papel importante en la prevención, mejoría, o corrección de disfunciones o enfermedades que incluyen, aunque no quedan limitadas a, infecciones por bacterias, hongos, protozoos y virus; particularmente las causadas por virus VIH, dolor, cánceres, anorexia, bulimia, asma, enfermedades de Parkinson, insuficiencia cardíaca aguda, hipotensión, hipertensión, retención urinaria, osteoporosis, angina de pecho, infarto de miocardio, úlceras, alergias, hipertrofia prostática benigna; y trastornos psicóticos y neurológicos, que incluyen ansiedad, esquizofrenia, depresión maníaca, delirio, demencia, varios retardos mentales, y disquinesias como la enfermedad de Huntington y el síndrome de Tourett.

Latrofilina (receptor de alfa-Latrotoxina)

La alfa-latrotoxina (ALX), una proteína contenida por el veneno de la araña “viuda negra”, estimula una fuerte liberación de neurotransmisores, y la consiguientes degeneración de los terminales nerviosos afectados. Este efecto es mediado por un receptor acoplado a proteína G de unión a ALX llamado latrofilina (Ichchenko *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 5491-98, 1999; Rahman *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 28, 39-86, 1999). Debido al dramático efecto de la ALX en la exocitosis, hay una necesidad en la materia de identificar miembros adicionales de la familia del receptor latrofilina, cuya actividad pueda ser regulada para proporcionar efectos terapéuticos.

La secuencia EST identificada por el nº ALO3J715 [XP002198805] (DATABASE EM_EST (en línea), ID: HSM004151) se clonó a partir de testículo adulto, y desvela la secuencia descrita por ID. SEC. NO: 1.

Resumen de la invención

Es un objetivo de la invención el proporcionar re-agentes y procedimientos para regular un receptor acoplado a proteína G de tipo latrofilina (LT-GPCR) en humanos. Este y otros objetivos de la invención son proporcionados por uno o más de las formas de realización descritas más abajo.

Se desvela un polipéptido LT-GPCR que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en ID. SEQ. NO: 2.

Una forma de realización de la invención, es un procedimiento para monitorizar agentes que disminuyen la actividad del LT-GPCR. Se pone en contacto con un polipéptido LT-GPCR, un compuesto de prueba que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2.

Se detecta la unión entre el compuesto de prueba y el polipéptido LT-GPCR. De este modo se identifica un compuesto de prueba que se une al polipéptido LT-GPCR, como un agente potencial para la disminución de la actividad del LT-GPCR.

Otra forma de realización de la invención es un procedimiento para monitorizar agentes que disminuyen la actividad del LT-GPCR. Se pone en contacto un compuesto de prueba con un polinucleótido que codifica un polipéptido LT-GPCR, donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por: la secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1; o un polinucleótido cuya secuencia se desvía de la secuencia definida por ID. SEC. NO: 1 debido a la degeneración del código genético.

Se detecta la unión del compuesto de prueba con el polinucleótido. Se identifica un compuesto de prueba que se une al polinucleótido, como un agente potencial para la disminución de la actividad del LT-GPCR. El agente puede funcionar disminuyendo la cantidad del LT-GPCR al interactuar con el ARNm del LT-GPCR.

Otra forma de realización de la invención es un procedimiento para monitorizar agentes que regulan la actividad del LT-GPCR. Se pone en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido LT-GPCR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2.

Se detecta una actividad LT-GPCR del polipéptido. De este modo se identifica como agente potencial para aumentar la actividad del LT-GPCR, a un compuesto de prueba que aumenta la actividad LT-GPCR del polipéptido, en relación con la actividad LT-GPCR en ausencia del compuesto de prueba. De este modo se identifica como agente potencial para disminuir la actividad del LT-GPCR, a un compuesto de prueba que disminuye la actividad LT-GPCR del polipéptido, en relación con la actividad LT-GPCR en ausencia del compuesto de prueba.

Incluso otra forma de realización de la invención es un procedimiento para monitorizar agentes que disminuyen la actividad del LT-GPCR. Se pone en contacto un compuesto de prueba con un producto LT-GPCR de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por: la secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1; o un polinucleótido cuya secuencia se desvía de la secuencia definida por ID. SEC. NO: 1 debido a la degeneración del código genético.

Se detecta unión del compuesto de prueba con el producto LT-GPCR. De este modo se identifica como un agente potencial para la disminución de la actividad del LT-GPCR, a un compuesto de prueba que se une al producto LT-GPCR.

Además, existe otra forma de realización de la invención como procedimiento para reducir la actividad del LT-GPCR. Se pone en contacto una célula con un reagente que se une específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido LT-GPCR, o un producto codificado por el polinucleótido, donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo constituido por: la secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1; o un polinucleótido cuya secuencia se desvía de la secuencia definida por ID. SEC. NO: 1 debido a la degeneración del código genético.

De este modo, se disminuye la actividad LT-GPCR en la célula.

La invención proporciona así un receptor acoplado a proteínas G de tipo latrofilina, en humanos, que puede utilizarse para identificar compuestos de prueba que pueden actuar como agonistas o antagonistas en el sitio del receptor. El receptor acoplado a proteínas G de tipo latrofilina, en humanos, y los fragmentos del mismo, son útiles para provocar anticuerpos específicos que pueden bloquear al receptor, y prevenir de manera eficaz la unión del ligando.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de ADN que codifica al polipéptido LT-GPCR.

La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de ADN de la Fig. 1.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere al uso, de un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido LT-GPCR, y se selecciona de un grupo constituido por:

- a) un polinucleótido que codifica un polipéptido LT-GPCR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2;
- b) un polinucleótido que comprende la secuencia ID. SEC. NO: 1;
- c) un polinucleótido cuya secuencia se desvía de las secuencias de polinucleótidos especificadas en (a) y (b), debido a la degeneración del código genético.

Además, el presente solicitante ha desvelado que una proteína receptor acoplado a proteínas G de tipo latrofilina (LT-GPCR), en particular la LT-GPCR humana, puede ser usada en procedimientos terapéuticos para tratar trastornos que implican disfunciones neuronales o endocrinas resultantes de exocitosis aberrantes. La LT-GPCR humana también puede utilizarse para monitorizar agonistas y antagonistas de la LT-GPCR.

Polipéptidos LT-GPCR

Los polipéptidos LT-GPCR según la invención, comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2, una porción de una de esas secuencias, o una variante biológicamente activa de la misma, tal como se define debajo. Un polipéptido LT-GPCR de la invención, puede ser por tanto una porción de una proteína LT-GPCR, una proteína LT-GPCR en toda su longitud, o una proteína de fusión que comprende todas o una porción de una proteína LT-GPCR. Se muestra en ID. SEC. NO: 1 una secuencia que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2.

Variantes biológicamente activas

Las variantes de polipéptidos LT-GPCR que son biológicamente activas, es decir, que mantienen la capacidad de unirse a un ligando para producir un efecto biológico, como es la formación de AMP cíclico, la movilización de calcio intracelular, o el metabolismo fosfoinositido, son también polipéptidos LT-GPCR. El porcentaje de identidad entre una variante de polipéptido LT-GPCR putativo y una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. NO: 2, se determina utilizando el programa de alineamiento Blast2.

Las variaciones en el porcentaje de identidad pueden deberse, por ejemplo, a las sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se definen como reemplazos de aminoácidos, uno por uno. Son conservativos en la naturaleza cuando el aminoácido sustituido tiene estructura y/o propiedades químicas similares. Ejemplos de reemplazos conservativos son la sustitución de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o una treonina con una serina.

Las inserciones o supresiones de aminoácidos son cambios sobre o en una secuencia de aminoácidos. Afectan típicamente a un intervalo de entre 1 y 5 aminoácidos. Utilizando programas bien conocidos en la materia, como el software DNASTAR, puede encontrarse orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o suprimidos, sin que se elimine la actividad biológica o inmunológica de una polipéptido LT-GPCR. Puede determinarse sencillamente si un cambio en un aminoácido da lugar a un polipéptido LT-GPCR biológicamente activo, mediante un estudio del enlace a un ligando, o realizando un estudio funcional, tal como se describe por ejemplo, en los Ejemplos específicos descritos más abajo.

Proteínas de fusión

Las proteínas de fusión pueden comprender al menos 5, 6, 8, 10, 25 o 50, o más aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2. Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra las secuencias de aminoácidos del polipéptido LT-GPCR, y para usar en varios sistemas de ensayo. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden ser usadas para identificar proteínas que interactúan con porciones de un polipéptidos LT-GPCR. Puede utilizarse para esto la cromatografía de afinidad de proteínas, o ensayos basados en bibliotecas para estudiar las interacciones proteína-proteína, como son los sistemas de despliegue de fagos o de doble

híbrido de levadura. Estos procedimientos son bien conocidos en el arte, y también pueden usarse para monitorizar fármacos.

Una proteína de fusión con el polipéptido LT-GPCR comprende dos segmentos de polipéptido fusionados juntos mediante un enlace peptídico. El primer segmento de polipéptido comprende al menos 5, 6, 8, 10, 25 o 50, o más aminoácidos contiguos de ID. SEC. NO: 2, o de una variante biológicamente activa, similar a las descritas anteriormente. El primer segmento de polipéptido puede comprender también una proteína LT-GPCR en toda su longitud.

El segundo segmento de polipéptido puede ser una proteína en toda su longitud, o ser un fragmento de proteína. Las proteínas usadas corrientemente en la construcción de proteínas de fusión incluyen β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteínas auto-fluorescentes, que incluyen la proteína azul fluorescente (BFP), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano (HRP), y cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). Adicionalmente, se usan epítomos etiqueta en las construcciones de proteínas de fusión, incluyendo etiquetas de histidina (His), etiquetas FLAG, etiquetas de hemaglutinina de la gripe (HA), etiquetas Myc, etiquetas VSV-G, y etiquetas tiorredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta-S, fusiones de dominio de unión a ADN (DBD), fusiones de dominio de unión a ADN de GAL4, y proteínas de fusión BP16 de virus de herpes simple (HSV). También se puede someter a ingeniería a una proteína de fusión para que contenga un sitio de corte localizado entre la secuencia de codificación del polipéptido LT-GPCR y la secuencia de la proteína heteróloga, de tal manera que el polipéptido LT-GPCR puede ser cortado y purificado a partir del segmento heterólogo.

Una proteína de fusión puede ser sintetizada químicamente, tal como se conoce en el arte. Preferiblemente, se produce una proteína de fusión mediante el enlazado covalente de dos segmentos de polipéptido, o mediante procedimientos estándar en el arte de la biología molecular. Pueden utilizarse procedimientos de ADN recombinante para preparar proteínas de fusión, por ejemplo, para hacer una construcción de ADN que comprenda secuencias codificantes seleccionadas de ID. SEC. NO:1 en un marco de lectura apropiado, con nucleótidos codificantes del segundo segmento de polipéptido, y que la construcción de ADN se exprese en una célula huésped, tal como se conoce en el arte. Muchos kits para construir proteínas de fusión están disponibles en compañías como Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), y Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

Identificación de especies homólogas

Las especies homólogas de polipéptido LT-GPCR humano pueden obtenerse usando polinucleótidos de polipéptido LT-GPCR (descritos más abajo), para hacer sondas o cebadores apropiados para la monitorización de la expresión de bibliotecas de ADNc de otras especies, como el ratón, monos, o levaduras, identificando los ADNc que codifican para los homólogos del polipéptido LT-GPCR, y expresando los ADNc, tal como se conoce en el arte.

Polinucleótidos LT-GPCR

Un polinucleótido LT-GPCR puede ser de cadena simple o de cadena doble, y comprende una secuencia codificante, o el complemento de una secuencia codificante para un polipéptido LT-GPCR. Se muestra en ID. SEC. NO: 1 una secuencia codificante para el polipéptido LT-GPCR humano mostrada en ID. SEC. NO: 2.

El porcentaje de la identidad de secuencia entre las secuencias de dos polinucleótidos se determina usando programas informáticos como el ALIGN, que emplean el algoritmo FASTA, utilizando una búsqueda de espacio afín con una penalización de espacio abierto de -12, y una penalización de extensión de espacio de -2. También son polinucleótidos LT-GPCR las moléculas de ADN complementario (ADNc), las especies homólogas y las variantes de los polinucleótidos LT-GPCR que codifican polipéptidos LT-GPCR biológicamente activos.

Identificación de variantes y homólogos de polinucleótidos LT-GPCR

Las variantes y homólogos de los polinucleótidos LT-GPCR descritos arriba, también son polinucleótidos LT-GPCR. Típicamente, las secuencias de polinucleótido LT-GPCR homólogo pueden identificarse mediante hibridación de polinucleótidos candidatos con polinucleótidos LT-GPCR conocidos, bajo condiciones estrictas, tal como se conoce en el arte. Por ejemplo, utilizando las siguientes condiciones de lavado: SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M, pH 7.0), SDS 0,1%, temperatura ambiente, dos veces, 30 minutos cada vez; después SSC 2X, SDS 0,1%, 50°C una vez, durante 30 minutos; después SSC 2X, temperatura ambiente, dos veces, 10 minutos cada vez; se pueden identificar las secuencias homólogas que contengan como mucho entre el 25 y el 30% de errores en los pares de bases. Más preferiblemente, que las cadenas de ácido nucleico homólogas contengan entre el 15 y el 25% de errores en pares de bases, incluso más preferiblemente entre el 5 y el 15% de errores en pares de bases.

Las especies homólogas de los polinucleótidos LT-GPCR desvelados en este documento, pueden ser también identificadas haciendo sondas o cebadores apropiados, y monitorizando las bibliotecas de expresión de ADNc de otras especies, como son ratones, monos, o levaduras. Las variantes humanas de los polinucleótidos LT-GPCR pueden identificarse, por ejemplo, monitorizando bibliotecas de expresión de ADNc humano. Es bien sabido que la T_m de un ADN de cadena doble, disminuye de 1 a 1,5°C con cada disminución del 1% en la homología (Bonner *et al.*, J.

Mol. Biol. 81, 123 (1973)). Las variantes de los polinucleótidos LT-GPCR humanos, o de los polinucleótidos LT-GPCR de otras especies, pueden identificarse además hibridando un polinucleótido LT-GPCR homólogo putativo, con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de ID. SEC. NO: 1, o el complemento del mismo, para formar un híbrido de prueba. La temperatura de fusión del híbrido de prueba se compara con la temperatura de fusión de un híbrido que comprende polinucleótidos LT-GPCR que tienen secuencias de nucleótidos perfectamente complementarias, y se calcula el número o tanto por ciento de errores de pares de base en el híbrido de prueba.

Las secuencias de nucleótidos que hibridan con los polinucleótidos LT-GPCR, o con sus complementos que siguen condiciones estrictas de hibridación y/o lavado, son también polinucleótidos LT-GPCR. Las condiciones estrictas de lavado son bien conocidas y entendidas en el arte, y se desvelan, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, at pages 9,50-9,51.

Típicamente se debería escoger una combinación de temperatura y concentración salina como condiciones estrictas de hibridación, y deberían estar aproximadamente entre 12 y 20°C bajo la T_m calculada del híbrido bajo estudio. La T_m de un híbrido entre un polinucleótido LT-GPCR que tenga una secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1, o el complemento de la misma, y una secuencia de polinucleótidos que sea idéntica, en al menos un 50%, preferiblemente sobre el 75, 90, 96 o 98%, a aquellas secuencias de nucleótidos, puede calcularse, por ejemplo, utilizando la ecuación de Bolton y McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 \cdot (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 \cdot (\%G + C) - 0,63 \cdot (\% \text{ formamida}) - 600/l$, donde l = la longitud del híbrido en pares de bases.

Las condiciones estrictas de lavado incluyen, por ejemplo, SSC 4X a 65°C, o formamida 50%, SSC 4X a 42°C, o SSC 0,5X, SDS 0,1% a 65°C. Las condiciones de lavado altamente estrictas incluyen, por ejemplo, SSC 0,2X a 65°C.

Preparación de polinucleótidos LT-GPCR

Un polinucleótido LT-GPCR que apareciera naturalmente, puede ser aislado de manera libre a partir de otros componentes celulares como son los componentes de membrana, proteínas y lípidos. Los polinucleótidos pueden hacerse a partir de una célula, y se aíslan usando técnicas de purificación de ácidos nucleicos estándar, o se pueden sintetizar utilizando técnicas de amplificación, como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o usando un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutina, y se conocen en el arte. Cualquier técnica para obtener un polinucleótido puede usarse para obtener polinucleótidos LT-GPCR aislados. Por ejemplo, las enzimas de restricción y las sondas pueden usarse para aislar fragmentos de polinucleótido que comprenden secuencias de nucleótidos LT-GPCR. Los polinucleótidos aislados están en preparaciones libres de otras moléculas, o al menos libres en un 70, 80 o 90%.

Las moléculas de ADNc de LT-GPCR pueden crearse con técnicas de biología molecular estándar, usando ARNm de LT-GPCR como plantilla. Las moléculas de ADNc de LT-GPCR pueden ser replicadas, a partir de entonces, utilizando técnicas de biología molecular conocidas en el arte y desveladas en manuales como el Sambrook *et al.* (1989). Una técnica de amplificación, como la PCR, puede utilizarse para obtener copias adicionales de polinucleótidos de la invención, utilizando como plantilla tanto ADN genómico humano como ADNc.

Alternativamente, pueden utilizarse las técnicas químicas sintéticas para sintetizar polinucleótidos LT-GPCR. La degeneración del código genético permite que se sinteticen secuencias de nucleótidos alternas que codificarán un polipéptido LT-GPCR que tenga, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC. ID. NO: 2, o una variante biológicamente activa de mismo.

Extendiendo polinucleótidos LT-GPCR

La secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1, o su complemento, puede utilizarse para identificar el gen correspondiente en toda su longitud, del cual se derivó. Por ejemplo, secuencias de nucleótidos contiguas seleccionadas del complemento de ID. SEC. NO: 1 pueden traducirse o etiquetarse en su final, con ^{32}P usando polinucleótido quinasa, utilizando procedimientos de etiquetado conocidos por los expertos en la materia (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, eds., Elsevier Press, N.Y., 1986). Por ejemplo, puede monitorizarse directamente una biblioteca lambda preparada a partir de tejido humano, con las secuencias etiquetadas que interesan, o se puede convertir la biblioteca en masa a pBluescript (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037) para facilitar la monitorización de colonias bacterianas (ver Sambrook *et al.*, 1989, pg. 1.20).

Ambos procedimientos son bien conocidos en el arte. Brevemente, se desnaturalizan los filtros con colonias bacterianas que contienen la biblioteca en pBluescript, o los céspedes bacterianos que contienen placas lambda, y se fija el ADN a los filtros. Se hibridan los filtros con la sonda etiquetada, usando las condiciones de hibridación descritas por Davis *et al.*, 1986. Las secuencias parciales, clonadas en lambda o en pBluescript, pueden usarse como controles positivos para valorar los enlaces en el fondo, y para ajustar la hibridación y los rigores necesarios para asegurar la identificación de los clones. Los auto-radiogramas resultantes se comparan para duplicar las placas de colonias; cada punto expuesto se corresponde con una colonia positiva o placa. Las colonias o placas se seleccionan y se expanden, y se aísla el ADN a partir de las colonias, para realizar un análisis y secuenciado posteriores.

Se analizan los clones positivos de ADNc para determinar la cantidad de secuencia adicional que contienen, utilizando PCR con un cebador a partir de la secuencia parcial, y el otro cebador a partir del vector. Los clones con un producto PCR insertado en el vector, mayor que la secuencia parcial original, se analizan mediante digestión por restricción y secuenciado del ADN, para determinar si contienen un inserto del mismo tamaño, o similar, que el tamaño del ARNm determinado a partir del análisis de transferencia Northern.

Una vez que se identifican uno o más de los clones con ADNc solapante, se puede determinar la secuencia completa de los clones, por ejemplo después de la digestión con exonucleasa III (McCombie *et al.*, *Methods* 3, 33-40, 1991). Se genera una serie de clones de supresión, cada uno de los cuales se secuencia. Las secuencias solapantes resultantes se ensamblan en una única secuencia contigua de alta redundancia (normalmente de tres a cinco secuencias solapantes en cada posición de nucleótido), dando lugar a una secuencia final altamente segura.

Pueden usarse varios métodos basados en PCR para extender las secuencias de ácido nucleico codificantes de las porciones descubiertas de LT-GPCR humana, para detectar las secuencias con dirección hacia arriba, tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, los sitios de restricción de PCR usan cebadores universales para salvar una secuencia desconocida adyacente a un locus conocido (Sarkar, *PCR Methods Applic.* 2, 318-322, 1993). El ADN genómico se amplifica primero en presencia de un cebador para una secuencia conectora, y de un cebador específico para la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten después a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador conector y otro cebador específico interno para el primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada, y se secuencian usando transcriptasa inversa.

También se puede usar la PCR inversa para amplificar o extender secuencias, usando cebadores divergentes basados en una región conocida (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Los cebadores pueden diseñarse usando software disponible comercialmente, como el software OLIGO 4.06 Primer Analysis (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), para tener de 22 a 30 nucleótidos de longitud, para tener un contenido de GC del 50% o más, y para templar la secuencia diana a temperaturas de entre 68 y 72°C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento apropiado en la región conocida de un gen. Después se hace al fragmento tomar forma circular mediante ligamiento intramolecular, y se usa como una plantilla para PCR.

Otro procedimiento que puede ser usado es la captura PCR, que implica la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en ADN de cromosoma artificial de humano y de levadura (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic.* 1, 111-119, 1991). En este procedimiento, las digestiones de enzima de restricción múltiple, y los ligamientos, pueden utilizarse también para situar una secuencia de cadena doble creada mediante ingeniería, en un fragmento desconocido de la molécula de ADN, antes de realizar la PCR.

Otro procedimiento que puede usarse para salvar secuencias desconocidas, es el de Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19, 3055-3060, 1991. Adicionalmente, se pueden usar PCR, cebadores anidados, y bibliotecas PROMOTERFINDER (CLONTECH, Palo Alto, Calif.), para desarrollar AND genómico (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) Este proceso evita la necesidad de monitorizar bibliotecas, y es útil para encontrar uniones intrón/exón.

Cuando se monitoriza ADNc en toda su longitud, es preferible usar bibliotecas que hayan sido seleccionadas por su tamaño, para incluir ADNc mayores. Son preferibles las bibliotecas cebadas aleatoriamente, ya que contendrán más secuencias que contengan las regiones 5' de los genes. El uso de una biblioteca cebada aleatoriamente puede ser especialmente preferible para situaciones en las que una biblioteca oligo d(T) no produzca un ADNc en toda su longitud. Las bibliotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de la secuencia en las regiones reguladoras no transcritas 5'.

Para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos del PCR, o de los productos del secuenciado, pueden usarse los sistemas de electroforesis capilar disponibles comercialmente. Por ejemplo, el secuenciado capilar puede emplear polímeros con capacidad de fluir, para la separación electroforética; cuatro tintes fluorescentes distintos (uno para cada nucleótido) que son activados por láser; y la detección de las longitudes de onda emitidas, mediante una cámara con dispositivo de carga acoplada. La intensidad de la señal lumínica puede convertirse en señal eléctrica usando un software apropiado (p.e. GENOTYPER y Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y todo el proceso, desde la carga de muestras hasta el análisis con el ordenador, y el despliegue de datos, puede controlarse mediante ordenador. La electroforesis capilar es preferible especialmente para el secuenciado de pequeñas piezas de ADN que podrían estar presentes en cantidades limitadas en una muestra particular.

Obtención de polipéptidos LT-GPCR

Los polipéptidos LT-GPCR pueden obtenerse, por ejemplo, mediante purificación a partir de células humanas, mediante la expresión de polinucleótidos LT-GPCR, o mediante síntesis química directa.

Purificación de la proteína

Los polipéptidos LT-GPCR pueden purificarse a partir de cualquier célula humana que exprese el receptor, incluyendo células huésped que hayan sido transfectadas con polinucleótidos LT-GPCR. Los testículos de adulto es una fuente útil de polipéptidos LT-GPCR. Un polipéptido LT-GPCR se separa de otros compuestos que normalmente se asocian al polipéptidos LT-GPCR en la célula, como son ciertas proteínas, carbohidratos, o lípidos, utilizando

procedimientos bien conocidos en el arte. Estos procedimientos incluyen, aunque no quedan limitados a, la cromatografía de exclusión por tamaño, el fraccionamiento con sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, y la electroforesis en gel preparativo.

El polipéptido LT-GPCR puede ser aislado convenientemente como un complejo con su proteína G asociada, tal como se describe en los ejemplos específicos, más abajo. Una preparación de polipéptidos LT-GPCR purificados es pura en al menos un 80%; preferiblemente, las preparaciones son puras en un 90%, 95% o 99%. La pureza de las preparaciones puede medirse mediante cualquier método conocido en el arte, como es la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Expresión de polinucleótidos LT-GPCR

Para expresar un polipéptido LT-GPCR, puede insertarse un polinucleótido LT-GPCR en un vector de expresión que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia, para construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes de polipéptidos LT-GPCR, elementos adecuados de control de la transcripción y de la traducción. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, (1989), y en Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Pueden usarse distintos sistemas de expresión vector/huésped para contener y expresar secuencias codificantes del polipéptido LT-GPCR. Estos incluyen, aunque no quedan limitados a, microorganismos, como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos, o vectores de expresión de ADN cósmido; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos (p.e. baculovirus), sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión víricos (p.e. el virus del mosaico del coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (p.e., plásmidos Ti o pBR322), o sistemas de células animales.

Los elementos de control, o secuencias reguladoras, son aquellas regiones sin traducir de los vectores -regiones potenciadoras, promotoras, 5' y 3', sin traducir- que interactúan con proteínas de la célula huésped, para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Estos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema del vector y del huésped utilizado, puede utilizarse cualquier cantidad de elementos apropiados de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles como el promotor híbrido lacZ del fagómido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.), o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies), y similares. En células de insectos puede usarse el promotor de la poliedrina de baculovirus. Pueden clonarse en el vector los promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (p.e., genes del choque térmico, RUBISCO y proteína de almacenamiento), o de virus vegetales (p.e., secuencias líder o de promotores virales). En sistemas de células de mamífero, son preferibles los promotores de genes de mamífero, o de virus de mamífero. Si es necesario generar una línea celular que contenga copias múltiples de una secuencia de nucleótidos codificantes de un polipéptido LT-GPCR, pueden usarse vectores basados en SV40 o EBV, con un marcador seleccionable indicado.

Sistemas de expresión bacterianos y de levaduras

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse distintos vectores de expresión, dependiendo del uso intencionado para el polipéptido LT-GPCR. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de un polipéptido LT-GPCR para la inducción de anticuerpos, se pueden usar vectores con un alto nivel de expresión directa de proteínas de fusión, que son fácilmente purificadas. Estos vectores incluyen, aunque no quedan limitados a, vectores multifuncionales de expresión y clonación de *E. coli*, como es el BLUESCRIPT (Stratagene). En un vector BLUESCRIPT, se puede ligar una secuencia codificante del polipéptido LT-GPCR, dentro del vector, en un marco con secuencias para la Met amino-terminal, y los consiguientes 7 residuos de β -galactosidasa, de tal manera que se produce una proteína híbrida. También pueden usarse los vectores pIN (Van Heeke & Shcuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) o pGEX (Promega, Madison, Wis.), para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión, con glutatión S-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles, y pueden ser purificadas sencillamente a partir de células lisadas, mediante la adsorción a gotas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas creadas en estos sistemas, pueden ser diseñadas para incluir sitios de corte por heparina, trombina, o proteasa del factor Xa, de tal modo que el polipéptido clonado que nos interesa puede ser liberado a voluntad a partir del segmento GST.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden usarse distintos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como el factor alfa, la alcohol oxidasa, y el PGH. Para revisiones, ver Ausubel *et al.*, (1989) y Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

Sistemas de expresión en plantas e insectos

Si se usan vectores de expresión en plantas, la expresión de secuencias codificantes de polipéptidos LT-GPCR puede ser dirigida por distintos promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales como son los promotores 35S y 19S del CaMV, solos o en combinación con la secuencia omega líder del TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-

311, 1987). Alternativamente, pueden usarse promotores vegetales como son la pequeña subunidad de promotores de RUBISCO o de choque térmico (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). Estas construcciones pueden ser introducidas en células vegetales mediante transformación directa del ADN, o mediante transfección mediada por patógenos. Estas técnicas se describen en distintas revisiones generalmente disponibles (p.e., Hobbs o Murray, en MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

También puede usarse un sistema de insecto para expresar un polipéptido LT-GPCR. Por ejemplo, en un sistema semejante se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larva de *Trichoplusia*. Las secuencias codificantes de polipéptidos LT-GPCR pueden clonarse en una región no-esencial del virus, tal como es el gen de la poliedrina, y pueden situarse bajo control del promotor de la poliedrina. La inserción exitosa de polipéptidos de LT-GPCR ayudará a inactivar el gen de la poliedrina, y producirán virus recombinantes a los que les faltará la proteína de cobertura. Los virus recombinantes pueden usarse entonces para infectar células de *S. frugiperda* o larva de *Trichoplusia*, en las que pueden expresarse los polipéptidos LT-GPCR (Engelhardt *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Sistemas de expresión en mamíferos

Pueden usarse distintos sistemas de expresión basados en virus, para expresar polipéptidos LT-GPCR en células huésped de mamífero. Por ejemplo, si se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias codificantes de polipéptidos LT-GPCR pueden ser ligadas dentro de un complejo de transcripción/traducción del adenovirus, que comprende el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no-esencial del genoma viral, puede usarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar un polipéptido LT-GPCR en células huésped infectadas (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). Si se desea, se pueden usar potenciadores de la transcripción, como es el virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

También pueden usarse los cromosomas humanos artificiales (HAC), para llevar grandes fragmentos de ADN que pueden ser contenidos y expresados en un plásmido. Se construyen HAC de 6M a 10M, y se liberan en células mediante métodos convencionales de liberación (p.e. liposomas, polímeros amino policatiónicos, o vesículas).

También pueden usarse señales de iniciación específicas, para alcanzar una traducción más eficaz de las secuencias codificantes de los polipéptidos LT-GPCR. Estas señales incluyen al codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que las secuencias codificantes del polipéptido LT-GPCR, su codón de iniciación, y las secuencias con dirección hacia arriba, se inserten en el vector de expresión adecuado, pueden no necesitarse señales adicionales de control de la transcripción y de la traducción. Sin embargo, en casos en los que solamente se inserte la secuencia codificantes, o un fragmento de la misma, deberían proporcionarse señales exógenas de control de la traducción (incluyendo el codón de iniciación ATG). El codón de iniciación debería encontrarse en el marco de lectura correcto, para asegurar la traducción de todo el inserto. Los elementos de traducción exógenos, y los codones de iniciación, pueden tener distintos orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se use (ver Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

Células huésped

Una cepa de células huésped puede elegirse por su habilidad para modular la expresión de las secuencias insertadas, o para procesar el polipéptido LT-GPCR expresado del modo deseado. Estas modificaciones del polipéptido incluyen, aunque no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. También puede usarse procesamiento post-traducciona, que corte una forma "prepro" del polipéptido, para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctos. Están disponibles distintas células huésped que tienen maquinaria celular específica, y mecanismos característicos para las actividades post-traduccionales (p.e. CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38), a partir de la American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), y pueden escogerse para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína foránea.

Se prefiere la expresión estable para la producción a largo plazo, y con alto rendimiento, de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan polipéptidos LT-GPCR de manera estable, pueden ser transformadas usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos, y un gen marcador seleccionable en el mismo o en otro vector. Tras la introducción del vector, se deja crecer a las células durante 1 o 2 días en un medio enriquecido, antes de que sean trasladadas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable, es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresan exitosamente las secuencias LT-GPCR introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas establemente, pueden ser proliferados usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular. Ver, por ejemplo, ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986.

Pueden usarse muchos sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas.

Estos incluyen, aunque no quedan limitados a, los genes de la timidín quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977), y de la adenin-fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980), que pueden

emplearse en células *tk⁻* o *aprt⁻*, respectivamente. También pueden usarse como base para la selección, la resistencia a antimetabolitos, antibióticos, o herbicidas. Por ejemplo, *dhfr* confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *npt* confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981), y *als* y *pat* confieren resistencia al clorsulfurón y a la fosfotricin acetiltransferasa, respectivamente (Murray, 1992, *supra*). Se han descrito genes seleccionables adicionales. Por ejemplo, *trpB* permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o *hisD*, que permite a las células usar histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Pueden usarse marcadores visibles como son las antocianinas, la β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y la luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes, y para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a una sistema vector específico (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

Detección de la expresión de polipéptidos LT-GPCR

Aunque la presencia de la expresión de un gen marcador sugiere que al polinucleótido LT-GPCR también está presente, su presencia y expresión han de ser confirmados. Por ejemplo, si una secuencia codificante de un polipéptido LT-GPCR se inserta con una secuencia de un gen marcador, las células transformadas que contienen las secuencias que codifican un polipéptido LT-GPCR pueden ser identificadas por la ausencia de función del gen marcador. Alternativamente, puede situarse un gen marcador en tándem con una secuencia codificante de un polipéptido LT-GPCR, bajo el control de un promotor único. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección, normalmente indica la expresión del polinucleótido LT-GPCR.

Alternativamente, las células huésped que contienen un polinucleótido LT-GPCR y que expresan un polipéptido LT-GPCR, pueden identificarse mediante distintos procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN, y técnicas de bioensayo o inmuno-ensayo de proteínas, que incluyen tecnologías de membrana, de solución o basadas en chip, para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia de polinucleótido codificante de un polipéptido LT-GPCR, puede detectarse mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN, o por amplificación, usando sondas o fragmentos de polinucleótidos codificantes de un polipéptido LT-GPCR. Los ensayos basados en amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados de secuencias codificantes de un polipéptido LT-GPCR, para detectar transformantes que contengan un polinucleótido LT-GPCR.

Se conocen en el arte distintos protocolos para detectar y medir la expresión de un polipéptido LT-GPCR, usando anticuerpos específicos para el polipéptido, tanto monoclonales como policlonales. Los ejemplos incluyen enzima-inmunoensayo (ELISA), radio-inmunoensayo (RIA), y separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Puede utilizarse un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales, sobre dos sitios, usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos que no interfieren, sobre un polipéptido LT-GPCR; o se puede emplear un ensayo de enlace competitivo. Estos y otros ensayos son descritos en Hampton *et al.*, *SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL*, APS Press, St. Paul, Minn., 1990; y en Maddox *et al.* *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983.

Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de etiquetas y técnicas de conjugación, que pueden usarse en distintos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación etiquetada o sondas PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos codificantes de polipéptidos LT-GPCR, incluyen el oligomarcado, el desplazamiento de mella, el etiquetado del final, o la amplificación PCR utilizando un nucleótido etiquetado. Alternativamente, se pueden clonar las secuencias codificantes de un polipéptido LT-GPCR en un vector, para producir una sonda ARNm. Estos vectores son conocidos en el arte, están disponibles comercialmente, y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de nucleótidos etiquetados, y de una ARN polimerasa adecuada, como es la T7, T3 o la SP6. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo usando varios kits disponibles comercialmente (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Las moléculas o etiquetas de reporte apropiadas que pueden usarse para la detección, incluyen radionucleidos, enzimas, y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, o cromogénicos, además de sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Expresión y purificación de polipéptidos LT-GPCR

Las células huésped transformadas con secuencias de nucleótidos codificantes de un polipéptido LT-GPCR, pueden ser cultivadas bajo condiciones indicadas para la expresión y recuperación del polipéptido del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transformada puede ser secretado o contenido intracelularmente, dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Tal como comprenderán los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican polipéptidos LT-GPCR, pueden ser diseñados para contener secuencias señal que dirijan la secreción de polipéptidos LT-GPCR solubles, a través de una membrana celular procariota o eucariota, o que dirijan la inserción en la membrana de un polipéptido LT-GPCR de unión a membrana.

Tal como se discutió arriba, pueden usarse otras construcciones para unir una secuencia codificante de un polipéptido LT-GPCR a una secuencia codificante de un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles. Estos dominios que facilitan la purificación incluyen, aunque no quedan limitados a, péptidos quelantes de metales, como son los módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; dominios de proteína A, que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad, FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). También se puede usar para facilitar la purificación, la inclusión de secuencias ligadoras cortables, como son aquellas específicas para el Factor Xa

o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA), entre el dominio de purificación y el polipéptido LT-GPCR. Un vector de expresión semejante, proporciona un sitio de corte para la enteroquinasa o la tiorredoxina, para la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido LT-GPCR y 6 residuos de histidina precedentes. Los residuos de histidina facilitan la purificación mediante IMAC (cromatografía de afinidad ión-metal inmovilizado, tal como describe Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), mientras que el sitio de rotura por enteroquinasa proporciona una manera de purificar el polipéptido LT-GPCR a partir de la proteína de fusión. Los vectores que contienen proteínas de fusión se desvelaron en Kroll *et al.*, *DAN Cell Biol.* 12, 441-453, 1993.

Síntesis química

Las secuencias codificantes de un polipéptido LT-GPCR pueden ser sintetizadas, totalmente o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en el arte (ver Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.* *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternativamente, puede producirse un polipéptido LT-GPCR en sí mismo, utilizando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, así como mediante síntesis directa de péptidos, usando técnicas de fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). La síntesis de proteínas puede ser realizada usando técnicas manuales, o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando Applied Biosystems 413^a Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Opcionalmente, pueden sintetizarse de manera separada los fragmentos de polipéptidos LT-GPCR, y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula en toda su extensión.

Los péptidos sintetizados recientemente pueden ser sustancialmente purificados mediante cromatografía líquida preparativa de alta eficacia (p.e. Greighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido LT-GPCR sintético puede ser confirmada mediante análisis o secuenciado de aminoácidos (p.e. el procedimiento Edman de degradación; ver Creighton, *supra*). Adicionalmente, puede alterarse cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido LT-GPCR, durante la síntesis directa y/o el uso combinado de procedimientos químicos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante, o una proteína de fusión.

Producción de polipéptidos LT-GPCR alterados

Tal como comprenderán los expertos en la materia, puede ser ventajoso el producir secuencias de nucleótidos codificantes del polipéptido LT-GPCR, que tengan codones que no aparecen naturalmente. Por ejemplo, pueden seleccionarse codones preferidos por un huésped procariota o eucariota en particular, para aumentar la tasa de expresión de proteína, o para producir ARN transcrito que tenga propiedades deseables, como es una semivida mayor que la de un transcrito generado a partir de una secuencia que aparece de manera natural.

Las secuencias de nucleótidos desveladas en este documento, pueden ser sometidas a ingeniería utilizando procedimientos, generalmente conocidos en el arte, para alterar las secuencias codificantes del polipéptido LT-GPCR por distintas razones, que incluyen, aunque no están limitadas a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, y/o expresión del polipéptido o del producto de ARNm. La transposición de ADN por fragmentación aleatoria y la reunión de los fragmentos de genes, y de oligonucleótidos sintéticos, mediante PCR, pueden usarse para manipular las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida a un sitio puede usarse para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glicosilación, cambiar la preferencia de codón, producir variantes de empalme, introducir mutaciones, etc.

Anticuerpos

Cualquier tipo de anticuerpo conocido en el arte puede ser generado para unirse específicamente a un epítipo de un polipéptido LT-GPCR. "Anticuerpo", tal como se usa en este documento, incluye moléculas intactas de inmunoglobulina, además de fragmentos de las mismas, como Fab, F(ab')₂, y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de un polipéptido LT-GPCR. Típicamente, se requieren al menos 6, 8, 10 o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. Sin embargo, los epítipos que implican aminoácidos no contiguos, pueden requerir más, p.e. al menos 15, 25 o 50 aminoácidos.

Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de un polipéptido LT-GPCR, puede ser utilizado terapéuticamente, además de en ensayos inmuno químicos, como las transferencias Western, los ELISA, los radio-inmunoensayos, ensayos inmuno-istoquímicos, inmuno-precipitaciones, u otros ensayos inmuno-químicos conocidos en el arte. Se pueden usar varios inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Se conocen bien en el arte numerosos protocolos para la unión competitiva, o para los ensayos inmuno-radiométricos. Estos inmunoensayos implican típicamente la medición de la formación de complejos entre un inmunogen y un anticuerpo que se une específicamente al inmunogen.

Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido LT-GPCR, proporciona una señal de detección al menos 5, 10 o 20 veces más alta que una señal de detección proporcionada por otras proteínas que se usan en un ensayo inmuno-químico. Preferiblemente, los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos LT-GPCR, no detectan otras proteínas en ensayos inmuno-químicos, y pueden inmuno-precipitar un polipéptido LT-GPCR a partir de una solución.

Los polipéptidos LT-GPCR pueden utilizarse para inmunizar a un mamífero, como un ratón, rata, conejo, cerdo de guinea, mono o humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, se puede conjugar un polipéptido LT-GPCR a una proteína transportadora, como es la albúmina de suero bovina, la tiroglobulina, y la hemocianina de lapa. Dependiendo de las especies huésped, se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Estos adyuvantes incluyen, aunque no quedan limitados a, adyuvante de Freund, geles minerales (p.e. hidróxido de aluminio), y sustancias activas de superficie (p.e. lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en humanos, son especialmente útiles el BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) y la *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido LT-GPCR, pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en un cultivo. Estas técnicas incluyen, aunque no quedan limitadas a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de célula B en humano, y la técnica de hibridoma EBV (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cel Biol.* 62, 109-120, 1984).

Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos”, el empalme de genes de anticuerpo de ratón sobre genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad antigénica y actividad biológica apropiadas (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Los anticuerpos monoclonales, y otros anticuerpos, también pueden ser “humanizados” para prevenir que un paciente desarrolle una respuesta inmune contra el anticuerpo cuando este se usa terapéuticamente. Estos anticuerpos pueden ser suficientemente similares en la secuencia a los anticuerpos humanos, como para ser utilizados directamente en la terapia, o pueden requerir la alteración de unos pocos residuos claves. Las diferencias entre las secuencias de anticuerpos de roedor y las secuencias de humano pueden ser minimizadas mediante el reemplazo de residuos que difieren de los que hay en secuencias humanas, mediante mutagénesis dirigida a un sitio, de los residuos individuales, o mediante el rallado de todas las regiones determinantes de la complementariedad. Alternativamente, los anticuerpos humanizados pueden producirse usando procedimientos recombinantes, tal como se describe en el documento GB2188638B. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido LT-GPCR pueden contener sitios de unión a antígeno que estén parcial o totalmente humanizados, tal como se desveló en el documento U.S. 5,565,332.

Alternativamente, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, usando procedimientos conocidos en el arte, para producir anticuerpos de cadena única que se unan específicamente a polipéptidos LT-GPCR. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, pueden ser generados por transposición de cadena a partir de bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias al azar (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

Los anticuerpos de cadena única también pueden construirse usando un procedimiento de amplificación de ADN, como es el PCR, usando hibridoma de ADNc como plantilla (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer. Prev.* 5, 507-11). Los anticuerpos de cadena única pueden ser mono- o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de cadena única tetravalentes, biespecíficos, se enseña, por ejemplo, en Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. La construcción de anticuerpos de cadena única bivalentes, biespecíficos, se enseña en Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

Una secuencia de nucleótidos codificante de un anticuerpo de cadena sencilla, puede ser construida mediante síntesis de nucleótidos manual o automatizada, puede ser clonada en una construcción de expresión usando procedimientos estándar de ADN recombinante, y puede ser introducida en una célula para expresar la secuencia codificante, tal como se describe abajo. Alternativamente, los anticuerpos de cadena única pueden ser producidos directamente usando, por ejemplo, tecnología de fago filamentoso (Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

Los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos LT-GPCR también pueden ser producidos por inducción *in vivo* de la producción en la población de linfocitos, o mediante la monitorización de bibliotecas de inmunoglobulina, o de paneles de reagentes de unión altamente específica, tal como se desvela en la bibliografía (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

Otros tipos de anticuerpos pueden ser contruidos y usados terapéuticamente en procedimientos de la invención. Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos quiméricos tal como se desvela en el documento WO 93/03151. También se pueden preparar proteínas de unión que se derivan de inmunoglobulinas, y que son multivalentes y multispecíficas, como son los “diabodies” descritos en el documento WO 94/13804.

Los anticuerpos según la invención, pueden ser purificados mediante procedimientos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados por afinidad, al pasarlos por una columna a la que está unido un polipéptido LT-GPCR. Los anticuerpos unidos pueden ser después eluidos de la columna usando un tampón con una alta concentración salina.

Oligonucleótidos de sentido contrario

Los oligonucleótidos de sentido contrario son secuencias de nucleótidos que son complementarias a la secuencia de ADN o ARN específica. Una vez que se introducen en la célula, los nucleótidos complementarios se combinan con las secuencias naturales producidas por la célula, para formar complejos y bloquear tanto la transcripción como la traducción. Preferiblemente, un oligonucleótido de sentido contrario tiene al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede ser de al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50, o más, nucleótidos de longitud. Las secuencias más largas también pueden usarse. Las moléculas de oligonucleótidos de sentido contrario pueden ser proporcionadas en una construcción de ADN, pueden ser introducidas en una célula tal como se describió antes, para disminuir el nivel de productos del gen LT-GPCR en la célula.

Los oligonucleótidos de sentido contrario pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos pueden ser sintetizados manualmente o mediante un sintetizador automatizado, mediante la unión covalente del final 5' de un nucleótido, con el final 3' de otro nucleótido, con uniones no-fosfodiéster entre nucleótidos, como son los alquilfosfonatos, fósforotioatos, fósforoditioatos, alquilfosfonotioatos, alquilfosfonatos, fosforamidatos, fosfato ésteres, carbamatos, acetamidato, carboximetil ésteres, carbonatos y fosfato triésteres. Ver Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem Rev.* 90, 543-583, 1990.

Las modificaciones de la expresión del gen LT-GPCR pueden obtenerse mediante el diseño de oligonucleótidos de sentido contrario que formarán formas dobles para el control, 5', o las regiones reguladoras del gen LT-GPCR. Se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, p.e. entre las posiciones -10 y +10 a partir del sitio de inicio. Similarmente, se puede alcanzar la inhibición usando metodología de pares de bases de triple hélice. El emparejamiento de triple hélice es útil porque provoca la inhibición de la capacidad de la doble hélice de abrirse lo suficiente como para unirse a las polimerasas, factores de transcripción, o chaperonas. Los avances terapéuticos usando triples hélices de ADN han sido descritos en la bibliografía (p.e. Gee *et al.*, en Huber & Carr, *MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES*, Futura Publishing, Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). También puede diseñarse un oligonucleótido de sentido contrario para bloquear la traducción de ARNm, al prevenir la unión del transcrito a los ribosomas.

No se requiere una complementariedad precisa para la formación exitosa de complejos entre un oligonucleótido de sentido contrario y la secuencia complementaria de un polinucleótido LT-GPCR. Los oligonucleótidos de sentido contrario que comprenden, por ejemplo 2, 3, 4 o 5, o más tramos de nucleótidos contiguos que son precisamente complementarios a un polinucleótido LT-GPCR, cada uno separado por un tramo de nucleótidos contiguos que no son complementarios a los nucleótidos LT-GPCR adyacentes, pueden proporcionar suficiente especificidad al apuntar hacia el ARNm de LT-GPCR. Preferiblemente, cada tramo de nucleótidos contiguos complementarios es de al menos 4, 5, 6, 7 u 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias no complementarias que intervienen, son preferiblemente de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos de longitud. Alguien experto en la materia puede fácilmente usar el punto de fusión calculado de un par sentido normal-sentido contrario, para determinar el grado de error en pares de bases que será tolerado entre un oligonucleótido de sentido contrario en particular, y una secuencia de polinucleótido LT-GPCR en particular.

Los oligonucleótidos de sentido contrario pueden ser modificados sin afectar su capacidad de hibridar con un polinucleótido LT-GPCR. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno, o ambos finales de la molécula de sentido contrario. Por ejemplo, las uniones de fosfato internucleósido pueden ser modificadas añadiendo segmentos de colesteril o diamina, con distintas cantidades de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. También se pueden emplear en un oligonucleótido de sentido contrario modificado, las bases modificadas y/o los azúcares, como la arabinosa en lugar de la ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5', en el que el grupo hidroxilo 3', o el grupo fosfato 5', son sustituidos. Estos oligonucleótidos modificados pueden ser preparados por procedimientos bien conocidos en el arte. Ver, p.e., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica. Ver, p.e., Cech, *Science* 236, 1532-1539, 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568, 1990; Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609, 1992; Couture & Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996. Las ribozimas pueden usarse para inhibir la función del gen, al cortar una secuencia de ARN, tal como se conoce en el arte (p.e. Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). El mecanismo de la acción de la ribozima implica una hibridación de secuencia específica de la molécula de ribozima con un ARN complementario diana, seguido de un corte endonucleolítico. Los ejemplos incluyen moléculas de ribozima "cabeza de martillo" manipuladas, que pueden catalizar específica y eficazmente el corte endonucleolítico de secuencias específicas de nucleótidos.

La secuencia codificante de un polinucleótido LT-GPCR, como es la secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1, puede ser utilizada para generar ribozimas que se unirán específicamente con ARNm transcrito a partir del polinucleótido LT-GPCR. Los métodos de diseño y construcción de ribozimas que pueden cortar otras moléculas de ARN en trans, de una manera altamente específica, han sido desarrollados y descritos en el arte (ver Haseloff *et al.*, *Nature* 334, 585-591, 1988). Por ejemplo, la actividad de corte de las ribozimas puede ser dirigida hacia RNAs específicos mediante la manipulación de una región discreta de hibridación en la ribozima. La región de hibridación

contiene una secuencia complementaria al ARN diana, y por tanto hibrida específicamente con la diana (ver, p.e., Gerlach *et al.*, EP 321,201).

Los sitios específicos de corte por ribozima en un ARN de LT-GPCR diana, pueden identificarse mediante una monitorización de la molécula diana, para buscar sitios de corte por la ribozima que incluyan las siguientes secuencias: GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del ARN diana que contiene el sitio de corte, pueden ser evaluadas para encontrar características estructurales secundarias que puedan volver inoperable a la diana. También puede evaluarse la idoneidad de los ARN LT-GPCR diana mediante la evaluación de la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando ensayos de protección de ribonucleasa. La secuencia de nucleótidos mostrada en ID. SEC. NO: 1 y su complemento, proporcionan una fuente de secuencias de regiones apropiadas para la hibridación. Las secuencias complementarias más largas pueden usarse para aumentar la afinidad de la secuencia de hibridación por la diana. Las regiones de hibridación y de corte de la ribozima pueden estar integralmente relacionadas, de tal modo que al hibridar con el ARN diana en las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede cortar la diana.

Las ribozimas pueden ser introducidas en las células como parte de una construcción de ADN. Pueden usarse métodos mecánicos, como la microinyección, la transfección mediada por liposomas, la electroporación, o la precipitación de fosfato cálcico, para introducir una construcción de ADN que contenga ribozima en las células en las que se desea disminuir la expresión de LT-GPCR. Alternativamente, si se desea que las células retengan de manera estable la construcción de ADN, la construcción puede ser suministrada en un plásmido, y mantenida como un elemento separado, o integrado en el genoma de las células, tal como se conoce en el arte. Una construcción de ADN codificante para ribozima, puede incluir elementos reguladores de la transcripción, como es un elemento promotor, un potenciador o un elemento UAS; y una señal terminadora de la transcripción, para controlar la transcripción de ribozimas en las células.

Tal como se enseña en Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, las ribozimas pueden ser manipuladas para que la expresión de la ribozima ocurra como respuesta a factores que inducen la expresión de un gen diana. Las ribozimas también pueden ser manipuladas para proporcionar un grado adicional de regulación, de tal modo que la destrucción de ARNm solamente suceda cuando se induzca en las células tanto una ribozima como un gen diana.

Métodos de monitorización

La invención proporciona ensayos para monitorizar los compuestos de prueba que se unen o modulan la actividad de un polipéptido LT-GPCR o de un polinucleótido LT-GPCR. Un compuesto de prueba se une preferiblemente a un polipéptido LT-GPCR o a un polinucleótido. Más preferiblemente, un compuesto de prueba disminuye o aumenta un efecto biológico mediado por el LT-GPCR humano en al menos un 10%, preferiblemente en un 50%, más preferiblemente sobre el 75, 90 o 100%, en relación con la ausencia del compuesto de prueba.

Compuestos de prueba

Los compuestos de prueba pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en el arte, o pueden ser compuestos previamente desconocidos que tienen cualquier actividad farmacológica. Los compuestos pueden aparecer de modo natural, o pueden ser diseñados en el laboratorio. Pueden ser aislados a partir de microorganismos, animales o plantas, y pueden ser producidos mediante recombinación, o sintetizados mediante procedimientos químicos conocidos en el arte. Si se desea, se pueden obtener los compuestos de prueba usando cualquiera de los numerosos procedimientos combinatorios de biblioteca conocidos en el arte, incluyendo, aunque no quedando limitados a, bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase de solución o de fase sólida paralelas espacialmente direccionables; procedimientos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el procedimiento de biblioteca "una gota un compuesto"; y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. La aproximación por la biblioteca biológica está limitada a bibliotecas de polipéptidos, mientras que las otras cuatro aproximaciones son aplicables al polipéptido, al oligómero no peptídico, o a bibliotecas de pequeñas moléculas de los compuestos. Ver Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Los procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares son bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (ver, p.e., Houghten, *Biotechniques* 13, 412-421, 1992), o en gotas (Lam, *Nature*, 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacterias o esporas (Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), o fagos (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990; Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; y Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

Monitorización de alto rendimiento

Los compuestos de prueba pueden ser monitorizados para comprobar la capacidad de unión de polipéptidos LT-GPCR o polinucleótidos LT-GPCR, o la capacidad de afectar a la actividad del LT-GPCR o de la expresión del gen LT-GPCR, usando una monitorización de alto rendimiento. Usando monitorización de alto rendimiento, muchos

compuestos discretos pueden ser probados en paralelo, de tal modo que pueden monitorizarse rápidamente grandes cantidades de compuestos de prueba. Las técnicas establecidas de manera más amplia utilizan placas microtiter de 96 pocillos. Los pocillos de las placas microtiter requieren típicamente volúmenes de ensayo en un intervalo de 50 a 500. Además de las placas, muchos instrumentos, materiales, pipetas, robotics, lavadoras de placa, y lectoras de placa, están disponibles comercialmente para ajustarse al formato de 96 pocillos.

Alternativamente, se pueden usar los “ensayos de formato libre”, o ensayos que no tienen barrera física entre las muestras. Por ejemplo, un ensayo utilizando células pigmentarias (melanocitos) en un estudio simple homogéneo para bibliotecas combinatorias de péptidos, es descrito por Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). Las células se colocan bajo agarosa en placas petri, y después se sitúan sobre la superficie de la agarosa gotas que llevan compuestos combinatorios. Los compuestos combinatorios están siendo liberados parcialmente desde las gotas. Los compuestos activos pueden visualizarse como áreas de pigmento oscuro porque, a medida que los compuestos se difunden localmente en la matriz del gel, los compuestos activos provocan el cambio de color de las células.

Otro ejemplo de un ensayo de formato libre es descrito por Chelsky, “Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches”, tal como se informa en la First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening, en Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky colocó un ensayo de enzima homogénea simple para estudiar la anhidrasa carbónica dentro de un gel de agarosa, de tal modo que la enzima en el gel provocaría un cambio de color en el gel. A partir de ese momento, las gotas que llevan compuestos combinatorios a través de un foto-enlace, se colocaron en el gel, y los compuestos se liberaron parcialmente mediante luz UV. Los compuestos que inhibieron la enzima se observaron como zonas locales de inhibición donde el cambio de color era menor.

Se describe incluso otro ejemplo, por Salmon *et al.*, *Molecular diversity* 2, 57-63 (1996). En este ejemplo, las bibliotecas combinatorias fueron monitorizadas para estudiar los compuestos que tenían efectos citotóxicos sobre células de cáncer, en cultivo en agar.

Otro método de monitorización de alto rendimiento es descrito por Beutel *et al.*, U.S. Patent 5,976,813. En este método, las muestras de prueba se colocan en una matriz porosa. Uno o más componentes del ensayo se colocan en la misma, sobre, o debajo de una matriz que es un gel, una lámina de plástico, un filtro, u otra forma de soporte sólido fácilmente manipulable. Cuando las muestras se introducen en la matriz porosa, se difunden de manera suficientemente lenta, de tal modo que los ensayos se pueden realizar sin que las muestras de prueba corran juntas.

Ensayos de unión

Para los ensayos de unión, el compuesto de prueba es preferiblemente una molécula pequeña que se une a, y ocupa el sitio activo del polipéptido LT-GPCR, haciendo de ese modo que el sitio de unión al ligando sea inaccesible al sustrato, así que se previene la actividad biológica normal. Ejemplos de estas pequeñas moléculas incluyen, aunque no quedan limitados a, pequeños péptidos o moléculas similares a péptidos. Los ligandos potenciales que se unen a un polipéptido de la invención incluyen, aunque no están limitados a, los ligandos naturales de los LT-GPCR conocidos, y análogos o derivados de los mismos. Los ligandos naturales de los LT-GPCR incluyen adrenomedulina, amilina, proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP), calcitonina, anandamida, serotonina, histamina, adrenalina, noradrenalina, factor de activación de plaquetas, trombina, C5a, bradiquinina, y quemoquinas.

En los ensayos de unión, tanto el compuesto de prueba como el polipéptido LT-GPCR pueden comprender una etiqueta detectable, como una etiqueta enzimática, quimioluminiscente, radioisotópica, o fluorescente, como la peroxidasa del rábano, la alcalin fosfatasa, o la luciferasa. La detección de un compuesto de prueba que está unido al polipéptido LT-GPCR, puede conseguirse, por ejemplo, mediante el conteo directo de la radioemisión, mediante conteo de centelleo, o mediante la determinación de la conversión de un sustrato indicado en un producto detectable.

Alternativamente, la unión de un compuesto de prueba a un polipéptido LT-GPCR puede determinarse sin etiquetar ninguno de los que interactúan. Por ejemplo, puede usarse un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de prueba con un polipéptido LT-GPCR. Un microfisiómetro (p.e. Cytosensor™) es un instrumento analítico que mide la tasa a la que una célula acidifica su entorno, utilizando un sensor potenciométrico con luz dirigible (LAPS). Los cambios en esta tasa de acidificación pueden ser utilizados con un indicador de la interacción entre un compuesto de prueba y un polipéptido LT-GPCR (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

La determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para unirse a un polipéptido LT-GPCR puede llevarse a cabo también usando una tecnología como es el análisis de interacción molecular (BIA) en tiempo real (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991; y Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin necesidad de etiquetado de ninguno de los que interactúan (p.e. BIAcore™). Los cambios en los fenómenos ópticos de la resonancia de plasmón superficial (SPR) pueden usarse como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

En otro aspecto más de la invención, se puede usar un polipéptido LT-GPCR como una “proteína cebo” en un ensayo de doble híbrido, o en un ensayo de triple híbrido (ver, p.e. U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *Biotechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; y Brent W094/10300), para identificar otras proteínas que se unan o interactúen con el polipéptido LT-GPCR y modulen su actividad.

El sistema de doble híbrido está basado en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que constan de dominios separables de activación y unión a ADN. Brevemente, el ensayo utiliza dos construcciones de ADN distintas. Por ejemplo, en una construcción, el polinucleótido codificante de un polipéptido LT-GPCR puede ser fusionado con un polinucleótido codificante del dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (p.e. GAL-4). En la otra construcción, una secuencia de ADN que codifica una proteína sin identificar (“presa” o “muestra”) puede ser fusionada con un polinucleótido que codifica para el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y la “presa” son capaces de interactuar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de activación y de unión a ADN del factor de transcripción se colocan de manera muy próxima. Esta proximidad permite la transcripción de un gen informador (p.e. LacZ) que está ligado operativamente a un sitio regulador de la transcripción que es sensible al factor de transcripción. Puede detectarse la expresión del gen informador, y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional pueden ser aisladas y utilizadas para obtener la secuencia de ADN codificante de la proteína que interactúa con el polipéptido LT-GPCR.

Puede ser deseable inmovilizar tanto el polipéptido LT-GPCR (o el polinucleótido) como el compuesto de prueba, para facilitar la separación de las formas enlazadas de las no enlazadas, y de uno o de ambos de los que interactúan, además de la automatización acomodada del ensayo. Por tanto, tanto el polipéptido LT-GPCR (o el polinucleótido) como el compuesto de prueba, pueden ser unidos a un soporte sólido. Los soportes sólidos indicados incluyen, aunque no quedan limitados a, portaobjetos de cristal o plástico, placas de cultivo tisular, pocillos microtiter, tubos, chips de silicio, o partículas como gotas (incluyendo, aunque sin quedar limitados a, látex, poliestireno, o gotas de cristal). Cualquier procedimiento conocido en el arte puede ser usado para sujetar al polipéptido LT-GPCR (o polinucleótido), o el compuesto de prueba, a un soporte sólido, incluyendo el uso de ligamientos covalentes y no covalentes, absorción pasiva, o pares de segmentos de enlace sujetos respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o al compuesto, y al soporte sólido. Los compuestos de prueba se unen preferiblemente al soporte sólido en una matriz, de tal modo que se puede trazar la ubicación de los compuestos de prueba. La unión de un compuesto de prueba a un polipéptido LT-GPCR (o el polinucleótido) puede llevarse a cabo en cualquier vasija apropiada para contener a los reactantes. Ejemplos de esas vasijas incluyen placas microtiter, tubos de test, y tubos de centrífuga.

En una forma de realización, el polipéptido LT-GPCR es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite al polipéptido LT-GPCR unirse a un soporte sólido. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión S-transferasa pueden ser adsorbidas en gotas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), o en placas microtiter con glutatión, que son combinadas después con compuesto de prueba, o con el compuesto de prueba y con el polipéptido LT-GPCR no adsorbido; la mezcla se incuba después bajo condiciones propicias para la formación del complejo (p.e. en condiciones fisiológicas para la salinidad y el pH). Tras la incubación, las gotas o los pocillos de las placas microtiter son lavados y se quita cualquier componente sin unir. La unión de los que interactúan puede determinarse bien directa o bien indirectamente, tal como se describe más arriba. Alternativamente, los complejos pueden estar disociados del soporte sólido antes de que la unión sea determinada.

Pueden usarse también otras técnicas para la inmovilización de proteínas o polinucleótidos sobre soporte sólido, en los ensayos de monitorización de la invención. Por ejemplo, tanto un polipéptido LT-GPCR (o el polinucleótido) como un compuesto de prueba, pueden ser inmovilizados usando conjugación de biotina y estreptavidina. Los polipéptidos (o polinucleótidos) LT-GPCR, o los compuestos de prueba, biotinilados pueden prepararse a partir de la biotina-NHS(N-hidroxisuccinimida), usando técnicas bien conocidas en el arte (p.e. kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), y pueden inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina. Alternativamente, los anticuerpos que se unen específicamente con un polipéptido LT-GPCR, un polinucleótido, o un compuesto de prueba, pero que no interfieren con el sitio de enlace deseado, como es el sitio activo del polipéptido LT-GPCR, pueden ser derivados hacia los pocillos de la placa. La diana o la proteína sin unir pueden ser atrapadas en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos.

Los procedimientos para detectar estos complejo, adicionalmente a aquellos descritos más arriba para los complejos GST-inmovilizados, incluyen la inmunodetección de complejos mediante anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido LT-GPCR o al compuesto de prueba; los ensayos de enlace a enzima, que dependen de la detección de una actividad del polipéptido LT-GPCR; y la electroforesis en gel SDS bajo condiciones no reductoras.

La monitorización de compuestos de prueba que se unen a un polipéptido o polinucleótido LT-GPCR, puede llevarse a cabo también en una célula intacta. Cualquier célula que comprenda un polipéptido o polinucleótido LT-GPCR, puede usarse en un sistema de ensayo basado en células. Un polinucleótido LT-GPCR puede aparecer de manera natural en la célula, o puede ser introducido usando técnicas similares a las descritas más arriba. La unión del compuesto de prueba a un polipéptido o polinucleótido LT-GPCR se determina tal como se describió más arriba.

60 *Ensayos funcionales*

Los compuestos de prueba pueden ser probados para averiguar la capacidad de aumentar o disminuir el efecto biológico de un polipéptido LT-GPCR. Estos efectos biológicos pueden ser determinados usando los ensayos funcionales descritos en los ejemplos específicos, más abajo. Los ensayos funcionales pueden llevarse a cabo tras provocar el contacto entre un polipéptido LT-GPCR purificado, una preparación de membrana celular, o una célula intacta, con un compuesto de prueba. Un compuesto de prueba que disminuye una actividad funcional de un LT-GPCR en al menos el 10%, preferiblemente sobre el 50%, más preferible sobre el 75%, 90% o el 100%, se identifica como un agente potencial para disminuir la actividad LT-GPCR. Un compuesto de prueba que aumenta la actividad funcional

de un LT-GPCR en al menos el 10%, preferiblemente sobre el 50%, más preferible sobre el 75%, 90% o el 100%, se identifica como un agente potencial para aumentar la actividad LT-GPCR.

Un procedimiento de monitorización semejante implica el uso de melanóforos, que son transfectados para expresar un polipéptido LT-GPCR. Una técnica de monitorización como esta se describe en el documento WO 92/01810 publicado el 6 de febrero de 1992. Así, por ejemplo, puede usarse un ensayo como este para monitorizar un compuesto que inhiba la activación del polipéptido receptor, mediante el contacto de las células melanóforas que comprenden al receptor, con el ligando del receptor y un compuesto de prueba a ser monitorizado. La inhibición de la señal generada por el ligando indica que un compuesto de prueba es un antagonista potencial para el receptor, es decir, que inhibe la activación del receptor. La monitorización puede emplearse para identificar un compuesto de prueba que active al receptor mediante el contacto de esas células con compuestos a ser monitorizados, y para determinar si cada compuesto de prueba genera una señal, es decir, que activa el receptor.

Otras técnicas de monitorización incluyen el uso de células que expresan un polipéptido LT-GPCR humano (por ejemplo, células CHO transfectadas) en un sistema que mida los cambios extracelulares de pH causados por la activación del receptor (ver, p.e., *Science* 246, 181-296, 1989). Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden ponerse en contacto con una célula que expresa un polipéptido LT-GPCR humano, y una segunda respuesta mensajera, p.e., la señal de transducción o los cambios de pH pueden ser medidos para determinar si los compuestos de prueba activan o inhiben al receptor.

Otra técnica similar de monitorización implica el introducir ARN codificante de un polipéptido LT-GPCR humano, dentro de oocitos de *Xenopus*, para expresar el receptor de manera transitoria. Los oocitos transfectados pueden ponerse en contacto con el ligando del receptor y con un compuesto de prueba para ser monitorizados, seguido de la detección de inhibición o activación de una señal de calcio en el caso de la monitorización de compuestos de test que se cree que inhiben la activación del receptor.

Otra técnica de monitorización implica la expresión de un polipéptido LT-GPCR humano en células en los que el receptor está unido a fosfolipasa C o D. Estas células incluyen células endoteliales, células del músculo liso, células de riñón de embrión, etc. La monitorización puede conseguirse tal como se describe más arriba, mediante la cuantificación del grado de activación del receptor a partir de los cambios en la actividad fosfolipasa.

Los detalles de los ensayos funcionales similares a los descritos arriba, se proporcionan en los ejemplos específicos, más abajo.

Expresión del gen LT-GPCR

En otra forma de realización, se identifican los compuestos de prueba que aumentan o disminuyen la expresión del gen LT-GPCR. Se pone en contacto un polinucleótido LT-GPCR con un compuesto de prueba, y se determina la expresión de un ARN o de un producto de polipéptido del polinucleótido LT-GPCR. El nivel de expresión del ARNm apropiado o del polipéptido en presencia del compuesto de prueba, se compara con el nivel de expresión del ARNm o del polipéptido en ausencia del compuesto de prueba. De acuerdo con esta comparación, el compuesto de prueba puede ser identificado, entonces, como un modulador de la expresión. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm o del polipéptido es mayor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un estimulador o potenciador de la expresión del ARNm o del polipéptido. Alternativamente, cuando la expresión de ARNm o del polipéptido es menor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un inhibidor de la expresión de ARNm o del polipéptido.

El nivel de expresión del ARNm o del polipéptido LT-GPCR en las células, puede ser determinado mediante métodos bien conocidos en el arte, para detectar ARNm o polipéptido. Se pueden usar tanto métodos cualitativos como cuantitativos. Se puede determinar la presencia de productos de polipéptido de un polinucleótido LT-GPCR, por ejemplo, usando distintas técnicas conocidas en el arte, incluyendo métodos inmunoquímicos como son el radioinmunoensayo, la transferencia Western, y la inmunohistoquímica. Alternativamente, la síntesis de polipéptidos puede determinarse *in vivo*, en un cultivo celular, o en un sistema de traducción *in vitro*, mediante la detección de la incorporación de aminoácidos etiquetados en un polipéptido LT-GPCR.

Esta monitorización puede realizarse tanto en un sistema de ensayo libre de células, como en una célula intacta. Cualquier célula que exprese un polinucleótido LT-GPCR, puede usarse en un sistema de ensayo basado en células. El polinucleótido LT-GPCR puede aparecer en la célula de manera natural, o puede ser introducido mediante técnicas como las descritas más arriba. Pueden usarse tanto un cultivo primario como una línea celular establecida, como son las 293 células de riñón embrionario humano, o CHO.

Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que pueden ser administradas al paciente para alcanzar un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, por ejemplo, un polipéptido LT-GPCR, polinucleótido LT-GPCR, anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido LT-GPCR, o imitadores, agonistas, antagonistas o inhibidores de actividad de un polipéptido LT-GPCR. Las composiciones pueden ser administradas solas o en combinación con al menos otro agente, como es un compuesto estabilizador,

que puede ser administrado mediante cualquier vehículo farmacéutico biocompatible, estéril, incluyendo, aunque no quedando limitados a, líquido salino, tampón salino, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse solas a un paciente, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

5 Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos apropiados farmacéuticamente aceptables, que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos, en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por distintas vías, incluyendo, aunque no quedando limitadas a, vía oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral, tópica, sublingual, o rectal. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el arte, en dosis apropiadas para la administración oral. Estos vehículos permiten a las composiciones farmacéuticas el ser formuladas como tabletas, píldoras, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, compuestos acuosos, suspensiones, y similares, para ser ingeridas por el paciente.

15 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse mediante la combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente, dando una mezcla, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares apropiados, si se desea, para obtener núcleos de tabletas o pastillas. Los excipientes indicados son cargas de proteína o carbohidrato, como son azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón del maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, como la metil celulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa, o la carboximetilcelulosa sódica; gomas que incluyen la arábica y el tragacanto; y proteínas como la gelatina y el colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes o solubilizantes, como la polivinilpirrolidona, agar, ácido algínico, o sales de los mismos, como el alginato sódico.

25 Los núcleos de pastillas pueden usarse junto con coberturas apropiadas, como son las soluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilén glicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes orgánicos apropiados, o mezclas de solventes. Pueden añadirse tintes o pigmentos a las coberturas de tabletas o pastillas, para la identificación del producto, o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosis.

30 Las preparaciones farmacéuticas que pueden ser utilizadas de manera oral incluyen cápsulas blandas hechas de gelatina, además de cápsulas suaves, selladas, hechas de gelatina y una cobertura de glicerol o sorbitol. Las cápsulas blandas pueden contener ingredientes activos mezclados con un agente de relleno o aglutinante, como es la lactosa o almidones; lubricantes, como el talco o el estearato magnésico; y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas suaves, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos apropiados, como son ácidos grasos, líquido, o polietilén glicol líquido, con o sin estabilizadores.

35 Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración parenteral pueden ser formuladas en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente, como es la solución de Hank, la solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, como es la carboximetil celulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden ser preparadas como suspensiones de inyección oleosa. Los solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen ácidos grasos como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como el etil oleato o los triglicéridos, o los liposomas. También pueden usarse amino polímeros policationicos no lipídicos para el transporte. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores indicados, o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Para la administración tópica o nasal, se usan penetrantes apropiados en la formulación, para permear a través de la barrera particular. Estos penetrantes son generalmente conocidos en el arte.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser fabricadas de un modo conocido en el arte, p.e. por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de pastillas, molienda, emulsificación, encapsulado, atrapado, o liofilización. La composición farmacéutica puede ser proporcionada en forma de sal, y puede formarse con muchos ácidos, incluyendo, aunque no quedando limitada a, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en agua u otros solventes protónicos, de lo que lo son las correspondientes formas de base libres. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener algo, o todo, de lo siguiente: histidina 1-50 mM, sacarosa 0,1%-2%, y manitol 2-7%, en un intervalo de pH de 4.5 a 5.5, que se combina con un tampón antes del uso.

55 Se pueden encontrar detalles más avanzados sobre las técnicas de formulación y administración, en la última edición de REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). Después de que se hayan preparado las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un contenedor apropiado, y se pueden etiquetar para el tratamiento de una condición indicada. Este etiquetado incluirá la cantidad, frecuencia y método de la administración.

65 *Indicaciones y procedimientos terapéuticos*

Los GPCR son ubicuos en los huéspedes mamíferos, y son responsables de muchas funciones biológicas, incluyendo muchas patologías. De acuerdo con esto, es deseable encontrar compuestos y fármacos que por una parte estimulen un GPCR, y que por otra parte puedan inhibir la función de un GPCR. Por ejemplo, compuestos que activen un GP-

CR puede emplearse con propósitos terapéuticos, como es el tratamiento del asma, de la enfermedad del Parkinson, de la insuficiencia cardíaca aguda, de retención urinaria y de osteoporosis. En particular, los compuestos que activan los GPCR son útiles en el tratamiento de varias enfermedades cardiovasculares como son las causadas por la falta de riego sanguíneo en los pulmones, o la hipertensión. Además, esos compuestos pueden usarse también para tratar

En general, los compuestos que inhiben la activación de un GPCR pueden ser usados para distintos propósitos terapéuticos, por ejemplo, para el tratamiento de hipotensión y/o hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, úlceras, asma, alergias, hipertrofia prostática benigna, y trastornos psicóticos y neurológicos que incluyen la esquizofrenia, excitación maníaca, depresión, delirio, demencia o varios retardos mentales, disquinesias, como la enfermedad de Huntington o el síndrome de Tourette, entre otros. Los compuestos que inhiben los GPCR son útiles también en la inversión de la anorexia endógena, en el control de la bulimia, y en el tratamiento de varias enfermedades cardiovasculares causadas por riego sanguíneo pulmonar excesivo, o por hipotensión.

La regulación del LT-GPCR puede usarse para regular la exocitosis. Por ejemplo, pueden usarse antagonistas de LT-GPCR para disminuir la exocitosis de hormonas, por ejemplo, a partir de tumores benignos de las glándulas endocrinas, como es el adenoma pituitario de acromegalia, adenoma tóxico que produce hipertiroidismo; adenoma de paratiroides de hiperparatiroidismo; adenoma de los islotes secretores de insulina del páncreas; feocromocitoma benigno, y adenoma cortical adrenal del síndrome de Cushing; tumores malignos que secretan hormonas del tiroides y la pituitaria anterior; cánceres de las glándulas paratiroides, islotes, médula adrenal, y cortex adrenal. También se pueden tratar otros estados hiperfuncionales, como es la enfermedad de Graves; bocio difuso tóxico; síndrome de Cushing no asociado a tumor adrenal; síndrome de Zollinger-Ellison; hipertiroidismo asociado con sobre-producción de TSH por parte de los tumores pituitarios.

Los agonistas del LT-GPCR pueden usarse para tratar trastornos caracterizados por una baja función endocrina, como son el hipotiroidismo de la tiroiditis de Hashimoto; hipoparatiroidismo; enfermedad de Addison; diabetes mellitus; tumores que destruyen o dañan la función de una glándula endocrina, incluyendo los cánceres con metástasis, como son el cáncer de mama y el linfoma, el adenoma cromóforo, y la hipofisitis.

También se pueden tratar defectos en la neurotransmisión al regular los niveles de LT-GPCR en el sistema nervioso central y periférico.

Esta invención incluso se refiere al uso de nuevos agentes identificados mediante los ensayos de monitorización descritos más arriba. Según esto, entra dentro del alcance de esta invención el uso de un compuesto de prueba identificado tal como se describe en este documento, en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, puede usarse en un modelo animal, un agente identificado tal como se describió en este documento (p.e. un agente modulador, una molécula de ácidos nucleicos de sentido contrario, un anticuerpo específico, ribozimas, o una molécula de unión al polipéptido LT-GPCR), para determinar la eficacia, toxicidad, o los efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente identificado tal como se ha descrito aquí, puede usarse en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, esta invención se refiere al uso de nuevos agentes identificados mediante los ensayos de monitorización, para tratamientos como los mencionados arriba.

Puede administrarse a una célula humana un re-agente que afecta a la actividad de LT-GPCR, tanto *in vitro* como *in vivo*, para reducir la actividad de LT-GPCR. El re-agente se une preferiblemente a un producto de la expresión de un gen LT-GPCR humano. Si el producto de expresión es una proteína, el re-agente es preferiblemente un anticuerpo. Para el tratamiento de células humanas *ex vivo*, puede añadirse un anticuerpo a una preparación de células madre que han sido extraídas del cuerpo. Las células pueden ser reemplazadas después, en el mismo o en otro cuerpo humano, con o sin propagación de clones, tal como se conoce en el arte.

En una forma de realización, el re-agente es liberado usando un liposoma. Preferiblemente, el liposoma es estable en el animal en el que ha sido liberado, durante al menos 30 minutos, más preferiblemente durante al menos 1 hora, e incluso más preferiblemente, durante al menos 24 horas. Un liposoma comprende una composición de lípidos que es capaz de apuntar a un re-agente, particularmente un polinucleótido, hacia un sitio en particular en un animal, como es el hombre. Preferiblemente, la composición de lípidos del liposoma es capaz de apuntar hacia un órgano específico de un animal, como es el pulmón, el hígado, el bazo, corazón, cerebro, nodos linfáticos, y piel.

Un liposoma útil en la presente invención comprende una composición de lípidos que sea capaz de fusionarse con la membrana plasmática de la célula diana, para liberar su contenido en la célula. Preferiblemente, la eficacia en la transfección de un liposoma es de aproximadamente 0,5 μ g de ADN por 16 nmole de liposomas liberados en 10^6 células, más preferiblemente está sobre los 2,0 mg de ADN por 16 nmol de liposomas liberados en unas 10^6 células. Preferiblemente, un liposoma se encuentra entre los 100 y 500 nm, más preferiblemente entre los 150 y 450 nm, e incluso más preferiblemente entre los 200 y los 400 nm de diámetro.

Los liposomas apropiados para su uso en la presente invención incluyen a aquellos liposomas usados de modo estándar en, por ejemplo, métodos de liberación de genes conocidos por los expertos en la materia. Los liposomas más preferidos incluyen liposomas que tienen una composición lipídica policatiónica y/o liposomas que tienen una columna de colesterol conjugada con polietilen glicol. Opcionalmente, un liposoma comprende un compuesto capaz

de apuntar al liposoma hacia una célula tumoral, como es un ligando a célula tumoral expuesto sobre la superficie externa del liposoma.

Se puede conseguir crear un complejo con un liposoma y un re-agente, como es un oligonucleótido de sentido contrario o una ribozima, usando procedimientos que son estándar en el arte (ver, por ejemplo, el documento U.S. Patent 5,705,151). Preferiblemente, se combinan entre 0,1 μg y 10 μg del polinucleótido, con unos 8 nmol de liposomas, más preferiblemente entre 0,5 μg y 5 μg de polinucleótidos se combinan con unos 8 nmol de liposomas, e incluso más preferiblemente, unos 10 μg de polinucleótidos se combinan con unos 8 nmol de liposomas.

En otra forma de realización, los anticuerpos se pueden liberar sobre tejidos específicos *in vivo* usando liberación apuntada mediada por receptor. Las técnicas de liberación de ADN mediada por receptor se enseñan en, por ejemplo, Findeis *et al. Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

Determinación de una dosis terapéuticamente eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz es sencilla con la habilidad de los expertos en la materia. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de ingrediente activo que aumenta o disminuye la actividad del LT-GPCR en relación con la actividad del LT-GPCR que ocurre en ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser estimada inicialmente tanto en ensayos de cultivo celular como en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también puede ser usado para determinar el intervalo apropiado de concentración y la vía de administración. Esta información puede ser usada entonces, para determinar las dosis y las vías útiles para la administración en humanos.

La eficacia y la toxicidad terapéuticas, p.e. ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población), pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales. La proporción de dosis con efectos que van desde lo tóxico a lo terapéutico, es el índice terapéutico, y se expresa como la proporción $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$.

Se prefieren las composiciones terapéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de ensayos con cultivos celulares, y a partir de estudios con animales, se usan en la formulación de un intervalo de dosis para el uso en humanos. La dosis contenida en estas composiciones se encuentra preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el ED_{50} con poca toxicidad, o sin ella. Las dosis varían en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, de la sensibilidad del paciente, y de la vía de administración.

La dosis exacta será determinada por el practicante, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar suficientes niveles del ingrediente activo, o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tomarse en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso, y género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de la administración, la combinación de fármacos, las reacciones por sensibilidades, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de larga actuación pueden ser administradas de 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas, dependiendo de la semivida y la tasa de evacuación de la formulación particular.

Las cantidades normales de dosificación pueden variar de los 0,1 a los 100000 microgramos, hasta llegar a una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. Se proporciona una guía sobre las dosificaciones en particular, y los métodos de suministro, en la bibliografía, y está disponible normalmente para los practicantes. Aquellos expertos en la materia emplearán distintas formulaciones para los nucleótidos, que las que usarán para las proteínas o sus inhibidores. De manera similar, la entrega de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células, condiciones, ubicaciones, etc., en particular.

Si el re-agente es un anticuerpo de cadena simple, los polinucleótidos que codifican el anticuerpo pueden ser contruidos e introducidos en la célula tanto *ex vivo* como *in vivo*, usando técnicas bien conocidas que incluyen, aunque no quedan limitadas a, la transferencia de ADN mediada por transferrina-policación, la transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de gotas de látex recubiertas con ADN, fusión de protoplasto, infección viral, electroporación, pistola génica, y transfección mediada por DEAE, o fosfato cálcico.

La dosificación eficaz *in vivo* de un anticuerpo está en el intervalo entre los 5 μg y los 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, entre los 50 μg y los 5 mg/kg , entre los 100 μg y los 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente, y entre los 200 y los 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente. Para la administración de polinucleótidos que codifican los anticuerpos de cadena simple, la dosificación eficaz *in vivo* se encuentra en el intervalo entre los 100 ng y los 200 ng, entre los 500 ng y los 50 ng, entre 1 μg y los 2 mg, entre los 5 μg y los 500 μg , y entre los 20 μg y los 100 μg de ADN.

Si el producto de expresión es ARNm, el re-agente es preferiblemente un oligonucleótido de sentido contrario o una ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos de sentido contrario o ribozimas, pueden ser introducidos en las células mediante distintos métodos, tal como se describió arriba.

- 5 Preferiblemente, un re-agente reduce la expresión de un gen LT-GPCR, o la actividad de un polipéptido LT-GPCR, en al menos el 10%, preferiblemente sobre el 50%, más preferiblemente sobre el 75%, 90% o el 100% en relación con la ausencia del re-agente. La efectividad del mecanismo escogido para disminuir el nivel de expresión de un gen LT-GPCR, o la actividad de un polipéptido LT-GPCR, puede calcularse usando métodos bien conocidos en el arte, como es la hibridación de sondas de nucleótido con ARNm específico de LT-GPCR; RT-PCR cuantitativo; detección
10 inmunológica de un polipéptido LT-GPCR; o medida de la actividad de LT-GPCR.

- En cualquiera de las formas de realización descritas más arriba, se puede administrar cualquier composición farmacéutica de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos apropiados. La selección de los agentes apropiados para el uso en terapia de combinación, puede realizarse por alguien corriente en el arte, de acuerdo con
15 principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o prevención de los distintos trastornos descritos arriba. Usando esta aproximación, uno puede alcanzar una eficacia terapéutica con dosis bajas de cada agente, reduciendo así el potencial de efectos secundarios adversos.

- 20 Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos arriba, pueden aplicarse a cualquier sujeto que necesite dicha terapia, por ejemplo mamíferos que pueden ser perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y más preferiblemente, humanos.

Métodos de diagnóstico

- 25 Los GPCR pueden usarse también en ensayos diagnósticos para detectar enfermedades y anormalidades, o susceptibilidad a enfermedades y anormalidades, en relación con la presencia de mutaciones en las secuencias de ácido nucleico que codifiquen para GPCR. Estas enfermedades, por medio del ejemplo, se relacionan con la transformación celular, como sucede en cánceres y tumores, y en distintos trastornos cardiovasculares, incluyendo hipertensión e hipotensión, además de enfermedades que surgen debido a un flujo sanguíneo anormal, a secreción anormal de aldosterona
30 inducida por angiotensina, y otros controles anormales de la homeostasis de fluidos y electrolitos.

- Pueden determinarse diferencias entre el ADNc o la secuencia genómica codificante de un GPCR en individuos afectados por una enfermedad, y el ADNc o la secuencia genómica codificante de un GPCR en individuos normales.
35 Si se observa una mutación en alguno, o en todos los individuos afectados, pero ninguna en los individuos normales, entonces la mutación es probablemente el agente que causa la enfermedad.

- Las diferencias en las secuencias entre un gen referencia y un gen que tiene mutaciones, pueden ser reveladas por el método de secuenciado directo de ADN. Además, los segmentos de ADN clonado pueden usarse como sondas para detectar segmentos de ADN específicos. La sensibilidad de este procedimiento se potencia mucho cuando se
40 combina con PCR. Por ejemplo, puede usarse un cebador secuenciante, con un producto de PCR de cadena doble, o con una molécula plantilla de cadena simple, generados por una PCR modificada. La determinación de la secuencia se realiza mediante procedimientos convencionales, usando nucleótidos radiomarcados, o mediante procedimientos de secuenciado automático usando etiquetas fluorescentes.

- 45 Las pruebas genéticas basadas en diferencias en las secuencias de ADN, pueden llevarse a cabo mediante la detección de la alteración en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN en geles, con o sin agentes desnaturizantes. Pueden visualizarse las pequeñas supresiones e inserciones en las secuencias, por ejemplo mediante electroforesis de alta resolución en gel. Los fragmentos de ADN de las distintas secuencias pueden distinguirse sobre
50 geles con gradiente de formamida desnaturizante, en los que las movilidades de los distintos fragmentos de ADN se retardan en el gel, en distintas posiciones, según sus temperaturas específicas o parciales de fusión (ver, p.e., Myers *et al.*, *Science* 230, 1242, 1985). Los cambios en las secuencias en ubicaciones específicas pueden revelarse también mediante ensayos de protección de nucleasa, como es la protección de S1 y RNasa, o el método de corte químico (p.e. Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4397-4401, 1985). De este modo, la detección de una secuencia específica
55 de ADN puede realizarse mediante procedimientos como son la hibridación, la protección RNasa, el corte químico, el secuenciado directo de ADN, o el uso de enzimas de restricción y transferencia Southern de ADN genómico. Además de los métodos directos como la electroforesis en gel y el secuenciado de ADN, también se pueden detectar las mutaciones mediante análisis *in situ*.

- 60 Pueden detectarse también los niveles alterados de un GPCR en distintos tejidos. Los ensayos utilizados para detectar los niveles de los polipéptidos del receptor en una muestra corporal, como puede ser la sangre o una biopsia de tejido, derivados de un huésped, son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen radio-inmunoensayos, ensayos de enlace competitivo, análisis de transferencia Western, y ensayos ELISA.

65

Ejemplo 1

Detección de actividad de proteína LT-GPCR

5 El polinucleótido de ID. SEC. NO:1 se inserta en el vector de expresión pCEV4, y el polipéptido LT-GPCR del vector de expresión pCRV4 obtenido se transfecta en un riñón embrionario humano de 293 células. Las células se pasan de un frasco de cultivo a 5 ml de Tris HCl, EDTA 5 mM, pH 7.5, y se lisan por sonicación. Los lisados celulares se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se centrifuga el sobrenadante a 30000 g durante 20 minutos a 4°C. Se suspende el sedimento en tampón de unión, que contiene Tris HCl 50 mM, MgSO₄ 5 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, complementado con BSA 0,1%, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 0,5 mg/ml, y fosforamidón 10 µg/ml. Se añaden a placas microtiter de polipropileno de 96 pocillos, que contienen el ligando, péptidos no etiquetados, y tampón de enlace, hasta llegar a un volumen final de 250 µl, las diluciones de suspensión óptima de membrana, definida como la concentración de proteína requerida para unir menos del 10% de un radioligando añadido, es decir, alfa-latrotóxina (ALX) etiquetada con ¹²⁵I.

15 En ensayos de equilibrio en la saturación de enlaces, las preparaciones de membrana se incuban en presencia de concentraciones en aumento (0,1 nM hasta 0,4 nM) de ligando ¹²⁵I.

20 Las mezclas de reacción de enlace se incuban durante una hora a 30°C. La reacción se detiene por filtración a través de filtros GF/B tratados con polietilénimina 0,5%, utilizando una recolectora de células. La radioactividad se mide mediante conteo de centelleo, y los datos se analizan mediante un programa de regresión no lineal computarizada. El enlace no específico se define como la cantidad de radioactividad que se mantiene tras la incubación de la proteína de membrana, en presencia de 100 nM de péptido sin etiquetar. La concentración de proteína se mide mediante el método Bradford usando un re-agente Bio-Rad, con suero bovino como estándar. Se demuestra la actividad de la proteína LT-GPCR del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. NO: 2.

Ejemplo 2

Ensayos de unión de radioligandos

30 Las 293 células de riñón embrionario humano transfectadas con un polinucleótido que expresa el GPCR de tipo latrofilina humana, se pasan de un frasco de cultivo a 5 ml de Tris HCl, EDTA 5 mM, pH 7.5, y se lisan por sonicación. Los lisados celulares se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se centrifuga el sobrenadante a 30000 g durante 20 minutos a 4°C. Se suspende el sedimento en tampón de enlace que contiene Tris HCl 50 mM, MgSO₄ 5 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, complementado con BSA 0,1%, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 0,5 mg/ml, y fosforamidón 10 µg/ml. Se añaden a placas microtiter de polipropileno de 96 pocillos, que contienen el ligando marcado con ¹²⁵I o un compuesto de prueba, péptidos no etiquetados, y tampón de enlace, hasta llegar a un volumen final de 250 µl, las diluciones de suspensión óptima de membrana, definida como la concentración de proteína requerida para unir menos del 10% del radioligando añadido, es decir, alfa-latrotóxina (ALX) etiquetada con ¹²⁵I.

40 En ensayos de equilibrio en la saturación de enlaces, las preparaciones de membrana se incuban en presencia de concentraciones en aumento (0,1 nM hasta 0,4 nM) de ligando etiquetado con ¹²⁵I, o del compuesto de prueba (actividad específica de 2200 Ci/mmol). Las afinidades de unión de los distintos compuestos de prueba se determinan mediante ensayos de equilibrio en la competición de enlaces, usando péptido 0,1 nM marcado con ¹²⁵I, en presencia de doce concentraciones diferentes de cada compuesto de prueba.

50 Las mezclas de reacción de enlace se incuban durante una hora a 30°C. La reacción se detiene mediante filtración a través de filtros GF/B tratados con polietilénimina 0,5%, usando una recolectora de células. La radioactividad se mide mediante un conteo de centelleo, y los datos se analizan con un programa de regresión no lineal computarizada.

55 El enlace no específico se define como la cantidad de radioactividad que se mantiene tras la incubación de la proteína de membrana en presencia de 100 nM de péptido sin etiquetar. La concentración de proteína se mide mediante el método Bradford, usando un re-agente Bio-Rad, con suero bovino como estándar. Se identifica un compuesto de prueba que aumenta la radioactividad de la proteína de membrana en al menos un 15% en relación con la radioactividad de la proteína de membrana que no se ha incubado con el compuesto de prueba, como un compuesto que se une al polipéptido LT-GPCR humano.

Ejemplo 3

Efecto de un compuesto de prueba sobre la formación de AMP cíclico mediada por LT-GPCR humana

60 La inhibición de la formación de AMPc mediada por el receptor, puede ser ensayada en células huésped que expresan LT-GPCR humana. Las células se ubican en placas de 96 pocillos, y se incuban en tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS), complementado con HEPES 10 mM, teofilina 5 mM, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 0,5 mg/ml y fosforamidón 10 µg/ml, durante 20 minutos a 37°C en CO₂ 5%. Se añade un compuesto de prueba, y se incuba durante otros 10 minutos a 37°C. Se aspira el medio, y la reacción se detiene mediante la adición de HCl 100 mM. Las placas se almacenan a 4°C durante 15 minutos. Se mide el contenido de AMPc en la solución de detención mediante radioinmunoensayo.

La radioactividad se cuantifica mediante un contador gamma equipado con software de reducción de datos. Se identifica como un inhibidor potencial de la formación de AMPc, a un compuesto de prueba que reduce la radioactividad de los contenidos de un pocillo, en relación con la radioactividad de los contenidos de un pocillo en ausencia del compuesto de prueba. Se identifica como un potenciador potencial de la formación de AMPc, a un compuesto de prueba que aumenta la radioactividad de los contenidos de un pocillo en relación con la radioactividad de los contenidos de un pocillo en ausencia del compuesto de prueba.

Ejemplo 4

Efecto de un compuesto de prueba sobre la movilización de calcio intracelular

La concentración de calcio intracelular libre se puede medir mediante microspectro-fluorometría, utilizando el tinte indicador fluorescente Fura-2/AM (Bush *et al.*, *J. Neurochem.* 57, 562-74, 1991). Las células transfectadas de manera estable se siembran en un plato de cultivo de 35 mm que contiene un cubreobjetos de cristal insertado. Las células se lavan con HBS, se incuban con un compuesto de prueba, y se cargan con 100 μ l de Fura-2/AM (10 μ M) durante 20-40 minutos. Tras lavar con HBS para eliminar la solución Fura-2/AM, se equilibran las células en HBS durante 10-20 minutos. Después se visualizan bajo el objetivo 40x de un microscopio Leitz Fluovert FS.

Se determina la emisión de fluorescencia a 510 nm, con excitación de las longitudes de onda que alternan entre los 340 nm y los 380 nm. Los datos de fluorescencia en bruto se convierten a concentraciones de calcio usando curvas de concentración de calcio estándar y técnicas de análisis por software. Se identifica como un compuesto que moviliza calcio intracelular, a un compuesto de prueba que aumenta la fluorescencia en al menos un 15% en relación con la fluorescencia que existe en ausencia del compuesto de prueba.

Ejemplo 5

Efecto de un compuesto de prueba sobre el metabolismo fosfoinosítido

Las células que expresan de manera estable ADNc de LT-GPCR humano, se sitúan en placas de 96 pocillos, y se cultivan hasta la confluencia. El día anterior al ensayo, se cambia el medio de cultivo por 100 μ l de medio que contiene suero 1% y 3 H myoinositol 0,5 μ Ci. Las placas se incuban durante toda la noche en una incubadora CO₂ (CO₂ 5% a 37°C). Inmediatamente antes del ensayo, se elimina el medio y se reemplaza con 200 μ l de PBS que contiene LiCl 10 mM, y se equilibran las células con el nuevo medio durante 20 minutos. Durante este intervalo, las células también se equilibran con antagonista, añadido como una alícuota de 10 μ l de una solución concentrada 20 veces en PBS.

La acumulación de inositol fosfato 3 H a partir del metabolismo del fosfolípido inositol, comienza al añadir 10 μ l de una solución que contiene un compuesto de prueba. Se añaden 10 μ l al primer pocillo, para medir la acumulación basal. Se prueban once concentraciones distintas del compuesto de prueba en los siguientes once pocillos de cada fila de la placa. Todos los ensayos se realizan por duplicado, repitiendo las mismas adiciones en dos filas consecutivas.

Las placas se incuban en una incubadora CO₂ durante una hora. La reacción se finaliza al añadir 15 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 50% v/v, seguido de una incubación de 40 minutos a 4°C. Tras neutralizar el TCA con 40 μ l de Tris 1 M, el contenido de los pocillos se transfiere a una placa con filtro Multiscreen HV (Millipore) que contiene Dowex AG1-X8 (malla 200-400, forma de formato). Las placas con filtro se preparan añadiendo 200 μ l de suspensión Dowex AG1-X8 (50% v/v, agua:resina) a cada pocillo. Las placas con filtro se sitúan en un colector al vacío para lavar o eluir el lecho de resina. Cada pocillo se lava 2 veces con 200 μ l de agua, seguido de 2 x 200 μ l de tetraborato sódico 5 mM/formato de amonio 60 mM.

Se eluyen los IP- 3 H en placas de 96 pocillos vacías, con 200 μ l de formato de amonio 1,2 M/ácido fórmico 0,1. El contenido de los pocillos se añade a 3 ml de cocktail de centelleo, y se determina la radioactividad mediante conteo de centelleo líquido.

Ejemplo 6

Métodos de unión a receptor

Ensayos de unión estándar. Los ensayos de unión se llevan a cabo en un tampón de enlace que contiene HEPES 50 mM, pH 7.4, BSA 0,5%, y MgCl₂ 5 mM. El ensayo estándar para la unión de radioligando con fragmentos de membrana que contienen polipéptidos LT-GPCR, se lleva a cabo tal como sigue, en placas microtiter de 96 pocillos (p.e. placas Dynatech Immulon II Removawell). Se diluye el radioligando en tampón de enlace con PMSF/Baci hasta llegar al cpm deseado por 50 μ l, luego se le añaden a los pocillos alícuotas de 50 μ l. Para muestras con enlace no específico, también se añaden por pocillo 5 μ l de ligando frío 40 μ M. Se inicia la unión al añadir 150 μ l, por pocillo, de membrana diluida hasta la concentración deseada (10-30 μ g proteína de membrana/pocillo), en tampón de unión + PMSF/Baci. Las placas se cubren después con selladores de placa Linbro Mylar (Flow Labs), y se colocan en un Dynatech Microshaker II. Se permite que suceda la unión a temperatura ambiente durante 1-2 horas, y se detiene mediante centrifugación de la placa durante 15 minutos a 2000 g. Se decantan los sobrenadantes, y los sedimentos de membrana se lavan una vez añadiendo 200 μ l de tampón de enlace helado, se agita brevemente, y se re-centrifuga. Se colocan los pocillos individuales en tubos de 12 x 75 mm, y se realiza un conteo en un contador LKB Gamma-

master (78% de eficacia). La unión específica mediante este procedimiento es idéntica a la medida cuando se eliminó el ligando libre mediante filtración rápida (3-5 segundos), y se lava sobre filtros de fibra de vidrio cubiertos con polietilenimina.

5 También se usan tres variaciones del ensayo de unión estándar.

1. Se llevan a cabo ensayos de unión competitiva a radioligando, con un intervalo de concentración de ligando frío frente a ligando etiquetado con ^{125}I , tal como se describe más arriba, con una modificación. Todas las diluciones de ligandos que se están sometiendo a ensayo, están hechas en 40X PMSF/Baci, a una concentración 40X de la concentración final del ensayo. Las muestras de péptido (5 μl cada una) se añaden después por pocillo microtiter. Se diluyen las membranas y el radioligando en tampón de enlace, sin inhibidores de proteasa. Se añade el radioligando, y se mezcla con ligando frío, y se inicia la unión al añadir las membranas.

2. La unión cruzada química de radioligando con el receptor, se lleva a cabo tras un paso de enlace idéntico al del ensayo estándar. Sin embargo, el paso del lavado se realiza con tampón de enlace menos el BSA, para reducir la posibilidad de unión cruzada no específica de radioligando con BSA. El paso de la unión cruzada se lleva a cabo tal como se describe abajo.

3. También se llevan a cabo ensayos de unión a gran escala para obtener sedimentos de membrana, para estudios de solubilización del complejo receptor:ligando, y para la purificación del receptor. Estos son idénticos a los ensayos estándar, excepto que (a) la unión se lleva a cabo en tubos de polipropileno en volúmenes de 1 a 250 ml; (b) la concentración de la proteína de membrana es siempre de 0,5 mg/ml; (c) para la purificación del receptor, la concentración de BSA en el tampón de enlace se reduce a 0,25%, y el paso del lavado se realiza con tampón de enlace sin BSA, lo que reduce la contaminación con BSA del receptor purificado.

25 Ejemplo 7

Unión cruzada química de radioligando con el receptor

30 Tras un paso de unión a radioligando similar al descrito arriba, los sedimentos de membrana se resuspenden en 200 μl , por pocillo de placa microtiter, de tampón de enlace helado sin BSA. Después se añaden 5 μl , por pocillo, de N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida 4 mM (ANB-NOS, Pierce) en DMSO, y se mezcla. Se mantienen las muestras en hielo y se irradian con UV durante 10 minutos con una lámpara Mineralight R-52G (UVP Inc., San Gabriel, Calif.), a una distancia de 5-10 cm. Después se transfieren las muestras a tubos Eppendorf, se sedimentan las membranas mediante centrifugación, se eliminan los sobrenadantes, y se solubilizan las membranas en tampón de muestra SDS Laemmli, para electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Se lleva a cabo la PAGE tal como se describe más abajo. Las proteínas radiomarcadas se visualizan por autorradiografía de los geles secados, con película Kodak XAR y pantallas intensificadoras de imagen Dupont.

40 Ejemplo 8

Solubilización de membrana

45 La solubilización de membrana se lleva a cabo en tampón que contiene Tris 25 mM, pH 8, glicerol 10% (p/v) y CaCl_2 0,2 mM (tampón de solubilización). Los detergentes altamente solubles, que incluyen al Triton X-100, al deoxicolato, al deoxicolato:lisolecitina, el CHAPS, y el zwittergent, se preparan en tampón de solubilización a concentraciones del 10%, y se almacenan como alícuotas líquidas. La lisolecitina se prepara en el momento debido a la insolubilidad en hielo derretido, y la digitonina se prepara en el momento a bajas concentraciones, debido a su solubilidad más limitada.

50 Para solubilizar membranas, se resuspenden los sedimentos lavados tras el paso de la unión, libres de partículas visibles, mediante pipeteo y agitación con vórtex, en tampón de solubilización, a 100000 g durante 30 minutos. Se extraen los sobrenadantes y se mantienen en hielo, y se descartan los sedimentos.

55 Ejemplo 9

Ensayo de receptores solubilizados

60 Tras la unión con ligandos ^{125}I , y la solubilización de las membranas con detergente, el complejo R:L intacto puede ser sometido a ensayo mediante cuatro procedimientos distintos. Todos se llevan a cabo sobre hielo, o en una habitación enfriada a 4-10°C.

1. Cromatografía en columna (Knuhtsen *et al.*, *Biochem. J.* 254, 641-647, 1988). Se equilibran columnas Sephadex G-50 (8 x 250 mm), con tampón de solubilización que contiene detergente a la concentración utilizada para solubilizar membranas, y con albúmina de suero bovina 1 mg/ml. Las muestras de membranas solubilizadas (0,2-0,5 ml) se aplican sobre las columnas, y se eluye a una tasa de flujo de unos 0,7 ml/minuto. Se recolectan las muestras (0,18 ml). Se determina la radioactividad en un contador gamma. Se determinan los volúmenes vacíos de las columnas mediante el volumen de elución del dextrano azul. La elución de la radioactividad en el volumen vacío se considera enlace a

proteína. La elución tardía de la radioactividad, en el mismo volumen que los ligandos ^{125}I libres, se considera no enlazado.

2. Precipitación de polietilenglicol (Cuatrecasas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 318-322, 1972). Para una muestra de 100 μl de membranas solubilizadas en un tubo de polipropileno (12 x 75 mm), se añaden 0,5 ml de gamma globulina bovina 1% (p/v) (Sigma) en tampón fosfato sódico 0,1 M, seguido de 0,5 ml de polietilenglicol 25% (p/v) (Sigma), y se mezcla. La mezcla se mantiene en hielo durante 15 minutos. Después se añaden 3 ml de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4, por cada muestra. Las muestras se filtran rápidamente (1-3 segundos) sobre filtros Whatman de fibra de vidrio GF/B, y se lavan con 4 ml del tampón fosfato. Se determina el complejo Receptor PEG-precipitado:ligando etiquetado con ^{125}I , mediante conteo gamma de los filtros.

3. Unión al filtro GFB/PEI (Bruns *et al.*, *Analytical Biochem.* 132, 74-81, 1983). Los filtros Whatman de fibra de vidrio GF/B son empapados en polietilenimina 0,3% (PEI, Sigma) durante 3 horas. Las muestras de membranas solubilizadas (25-100 μl) se reemplazan en tubos de polipropileno (12 x 75 ml). Después se añaden 4 ml de tampón de solubilización sin detergente, por muestra, y las muestras se filtran inmediatamente a través de filtros GFB/PEI (1-3 segundos), y se lavan con 4 ml de tampón de solubilización. Se determina el complejo CPM del receptor:ligando etiquetado con ^{125}I adsorbido a los filtros, usando conteo gamma.

4. Carbon/Dextrano (Paul and Said, *Peptides* 7 [Suppl. 1], 147-149, 1986). El dextrano T70 (0,5 g, Pharmacia) se disuelve en 1 litro de agua, y después se añaden 5 g de carbón activado (Norit A, alcalino; Fischer Scientific). Se remueve la suspensión durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se almacena a 4°C hasta su uso. Para medir el complejo R:L, se añaden 4 partes por volumen de suspensión carbón/dextrano a 1 parte por volumen de membrana solubilizada. Las muestras se mezclan y se mantienen en hielo durante 2 minutos, y luego se centrifugan durante 2 minutos a 11000 g en una microfuga Beckman. El radioligando libre es adsorbido por el carbón/dextrano, y se descarta con el sedimento. Los complejos receptor: ligando etiquetado con ^{125}I se conservan en el sobrenadante, y se determinan mediante conteo gamma.

Ejemplo 10

30 Purificación del receptor

La unión del biotilil-receptor con las membranas GH₄C1 se lleva a cabo tal como se describe arriba. Las incubaciones son durante 1 hora a temperatura ambiente. En el protocolo de purificación estándar, las incubaciones de los enlaces contienen Bio-S29 10 nM. Se añade ligando con ^{125}I como trazador, a niveles de 5000-100000 cpm por mg de membrana de proteína. Las incubaciones control contienen ligando frío 10 mM para saturar el receptor con ligando no biotililado.

La solubilización del complejo receptor:ligando también se lleva a cabo tal como se describe más arriba, con deoxicolato:lisolecitina en tampón de solubilización que contiene MgCl_2 0,2 mM, para obtener sobrenadantes 100000 g que contienen el complejo R:L solubilizado.

La estreptavidina inmovilizada (unión cruzada de estreptavidina con gota de agarosa 6%, Pierce Chemical Co.; "SA-agarosa") se lava en tampón de solubilización, y se añade a las membranas solubilizadas como un 1/30 del volumen final. Se incuba esta mezcla con agitación constante mediante una rotación de final sobre final durante 4-5 horas a 4-10°C. Después se aplica la mezcla a una columna, y se lava a través de la misma el material que no se haya enlazado. La unión del radioligando a la SA-agarosa se determina mediante comparación de cpm en el sobrenadante 100000 g respecto al del efuente de la columna tras la adsorción a la SA-agarosa. Finalmente, se lava la columna con 12-15 volúmenes de columna con tampón de solubilización+ deoxicolato:lisolecitina 0,15% + 1/500 (vol/vol) 100 x 4pase.

La columna de estreptavidina es eluída con tampón de solubilización + EDTA 0,1 mM + EGTA 0,1 mM + GTP-gamma-S 0,1 mM (Sigma) + deoxicolato:lisolecitina 0,15% (p/v) + 1/1000 (vol/vol) 100 veces 4pase. Primero, se pasa un volumen de columna de elución de tampón, y se detiene el flujo durante 20-30 minutos. Después se pasan 3-4 volúmenes de columna más de tampón de elución. Todos los eluídos se juntan.

Se incuban todos los eluídos de la columna de estreptavidina durante toda la noche (12-15 horas) con aglutinina de semilla de trigo inmovilizada (WGA agarosa, Vector Labs), para adsorber el receptor mediante la interacción de enlace carbohidrato covalente con la WGA lectina. La proporción (vol/vol) de la WGA-agarosa respecto con el eluído de la columna de estreptavidina es de 1:400. Puede usarse también un intervalo de entre 1:1000 y 1:200. Tras el paso del enlace, se sedimenta la resina mediante centrifugación, se extrae y salva el sobrenadante, y se lava la resina 3 veces (durante unos 2 minutos cada vez) en tampón que tiene HEPES 50 mM, pH 8, MgCl_2 5 mM y deoxicolato:lisolecitina 0,15%. Para eluir el receptor unido a WGA, se extrae la resina tres veces mediante mezclado repetido (mezclador vórtex a baja velocidad) durante un período de 15-30 minutos en hielo, con 3 columnas de resina cada vez, de N-N'-N"-triacetilquitotriosa 10 mM en el mismo tampón HEPES usado para lavar la resina. Tras cada paso de elución, se centrifuga la resina y se extrae cuidadosamente el sobrenadante, libre de sedimentos de WGA-agarosa. Los tres eluídos reunidos contienen el receptor final purificado. El material no enlazado a WGA contiene subunidades de proteína G específicamente eluídas a partir de la columna de estreptavidina, además de contaminantes no específicos. Todas estas fracciones se almacenan congeladas a -90°C.

Ejemplo 11

Identificación de los compuestos de prueba que se unen a polipéptidos LT-GPCR

5 Los polipéptidos LT-GPCR purificados que comprenden una proteína glutatión-S-transferasa, y que están adsorbidos a pocillos derivatizados con glutatión, de placas microtiter con 96 pocillos, se ponen en contacto con compuestos de prueba de una pequeña biblioteca molecular a pH 7.0, en una solución tampón de fisiológica. Los polipéptidos LT-GPCR comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEC. NO: 2. Los compuestos de prueba comprenden una etiqueta fluorescente. Las muestras se incuban de 5 minutos a 1 hora. Las muestras control se incuban en
10 ausencia del compuesto de prueba.

La solución tampón que contiene los compuestos de prueba se lava y quita de los pocillos. La unión de un compuesto de prueba con un polipéptido LT-GPCR se detecta mediante mediciones de fluorescencia de los contenidos de los pocillos. Se identifica un compuesto de prueba que aumenta la fluorescencia en un pocillo en al menos un 15% en
15 relación con la fluorescencia de un pocillo en el que no se incubó ningún compuesto de prueba, como un compuesto que se une a un polipéptido LT-GPCR.

Ejemplo 12

Identificación de un compuesto de prueba que disminuye la expresión del gen LT-GPCR

Se administra un compuesto de prueba a un cultivo de células gástricas humanas, y se incuba a 37°C de 10 a 45 minutos. Se incuba un cultivo del mismo tipo de células incubadas, durante el mismo tiempo, pero sin el compuesto de prueba, para tener un control negativo.

25 Se aísla el ARN de los dos cultivos tal como se describe en Chirgwin *et al.*, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979). Se preparan transferencias Northern usando de 20 a 30 µg de ARN total, y se hibrida con una sonda específica LT-GPCR marcada con ³²P, a 65°C, en Express-hyb (CLONTECH). La sonda comprende al menos 11 nucleótidos contiguos seleccionados del complemento de ID. SEC. NO: 1. Se identifica como inhibidor de la expresión del gen LT-GPCR,
30 un compuesto de prueba que disminuye la señal específica de LT-GPCR en relación con la señal obtenida en ausencia del compuesto de prueba.

Ejemplo 13

Tratamiento del síndrome de Zollinger-Ellison con un re-agente que se une específicamente con un producto del gen LT-GPCR

La síntesis de los oligonucleótidos LT-GPCR de sentido contrario, que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos seleccionados del complemento de ID. SEC. NO: 1, se lleva a cabo en un sintetizador Pharmacia Gene Assembler series, usando el procedimiento de fosforamidita (Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev. 90*, 534-83, 1990). Tras el ensamblaje y la desprotección, se precipitan los oligonucleótidos dos veces en etanol, se secan, y se suspenden en tampón fosfato salino (PBS), a la concentración deseada. La pureza de estos oligonucleótidos se analiza mediante electroforesis de capilaridad en gel, y mediante HPLC de intercambio catiónico. Los niveles de endotoxina en la preparación de oligonucleótidos se determina usando el ensayo de amebocito *Limulus* (Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105*, 361-
45 362, 1953).

Los oligonucleótidos de sentido contrario se administran al paciente con síndrome de Zollinger-Ellison. Se disminuye la gravedad del síndrome Zollinger-Ellison del paciente.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para monitorizar agentes que disminuyen la actividad de un LT-GPCR, que comprende los pasos de:

- i) poner en contacto un compuesto de prueba, con el polipéptido LT-GPCR codificado por cualquier polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:
 - a) un polinucleótido que codifica un polipéptido LT-GPCR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en ID. SEQ NO: 2; y
 - b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ID. SEC. NO: 1;
 - c) un polinucleótido cuya secuencia se desvía de las secuencias de polinucleótidos especificadas en (a) y en (b) debido a la degeneración del código genético; y
- ii) detectar la unión del compuesto de prueba con el polipéptido LT-GPCR, en el que un compuesto de prueba que se une al polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de un LT-GPCR.

2. Un procedimiento para monitorizar agentes que regulan la actividad de un LT-GPCR, que comprende los pasos de:

- i) poner en contacto un compuesto de prueba, con el polipéptido LT-GPCR codificado por cualquier polinucleótido especificado en la Reivindicación 1; y
- ii) detectar una actividad LT-GPCR del polipéptido, en el que un compuesto de prueba que aumenta la actividad LT-GPCR, se identifica como un agente terapéutico potencial para aumentar la actividad del LT-GPCR, y en el que un compuesto de prueba que disminuye la actividad LT-GPCR del polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad del LT-GPCR.

3. Un procedimiento para monitorizar agentes que disminuyen la actividad de un LT-GPCR, que comprende los pasos de:

- i) poner en contacto un compuesto de prueba con cualquier polinucleótido especificado en la Reivindicación 1 y
- ii) detectar el enlace del compuesto de prueba con el polinucleótido, en el que un compuesto de prueba que se une con el polinucleótido se identifica como un agente potencial terapéutico para disminuir la actividad de LT-GPCR.

Fig. 1

```
gcttcctcct tcccttttct caccaaagca aaaaagagaa ctcagacca ctgatgactc
tctttacaag cttcaactca ttgcattccg caatggaaag ctttttccaa gccactggaa
attcaacaaa tttggctgat gatggaaaac gacgtactgt ggttaccct gtgattctca
ccaaaataga tgggtgtgaat gtagataccc accacatccc tgттаатgtg aсactgcgtc
gaattgcaca tggagcagat gctgttgcag cccgggtggga tttcgatttg ctgaacggac
aaggaggctg gaagtcagat gggtgccata tactctattc agatgaaaat atcactacga
ttcagtgcta ctcccttagt aactatgcag ttttaatgga tttgacggga tctgaactat
acaccaggc ggcagcctc ctgcatcctg tggtttatac taccgccatc attctcctc
```

Fig. 2

```
FLLPFSHQSK KENSQQLMTL FTSFNSLHSA MESFFQATGN STNLADDGKR RTVVTFVILT
KIDGVNVDTH HIPVNVTLRR IAHGADAVAA RWDFDLLNGQ GGWKSDGCHI LYSDENITTI
QCYSLSNYAV LMDLTGSELY TQAXSLLHPV VYTTAIIILL
```

ES 2 271 020 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bayer AG

<120> REGULACION DEL RECEPTOR ACOPLADO A PROTEINA G DE TIPO LATROFILINA EN HUMANOS

<130> Lio027 Países extranjeros

<140>

<141>

<150> Documento US 60/191,103

<151> 22-3-2000

<150> Documento US 60/210,745

<151> 12-6-2000

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 479

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
gcttcctcct tcccttttct caccaaagca aaaaagagaa ctgagaccaa ctgatgactc 60
tctttacaag cttcaactca ttgcattccg caatggaaag ctttttccaa gccactggaa 120
attcaacaaa tttggctgat gatggaaaac gacgtactgt gggtaccctc gtgattctca 180
ccaaaataga tgggtggaat gtagataccc accacatccc tgtaaatgtg aactgcgctc 240
gaattgcaca tggagcagat gctgttcgag cccggtggga ttctgatttg ctgaacggac 300
aaggaggctg gaagtcagat gggtgccata tactctattc agatgaaaat atcactacga 360
ttcagtgcga ctcccttagt aactatgcag ttttaatgga ttgacggga tctgaactat 420
acaccagggc ggcagcctc ctgcatctg tggtttatac taccgccatc attctcctc 479
```

<210> 2

<211> 159

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Phe Leu Leu Pro Phe Ser His Gln Ser Lys Lys Glu Asn Ser Asp Gln
1           5           10           15

Leu Met Thr Leu Phe Thr Ser Phe Asn Ser Leu His Ser Ala Met Glu
```

ES 2 271 020 T3

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