

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 693 201**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **92 08082**

⑤1 Int Cl⁵ : C 07 K 13/00, C 12 N 15/12, C 07 H 21/00, C 12 Q
1/68, G 01 N 33/50, A 61 K 31/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 01.07.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 07.01.94 Bulletin 94/01.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : Amlaiky Nourdine, Boschert Ursula,
Hen René, Plassat Jean-Luc et Ramboz Sylvie.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Rhône-Poulenc Rorer S.A. Direction
Brevets.

⑤4 Nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique, acides nucléiques codant pour ces polypeptides et utilisations.

⑤7 La présente invention concerne de nouveaux polypeptides désignés 5HT6 ayant une activité de récepteur sérotoninergique, le matériel génétique permettant leur expression, toute cellule recombinante exprimant ces polypeptides, et leur utilisation.

FR 2 693 201 - A1



NOUVEAUX POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR
SEROTONINERGIQUE. ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES
POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et le matériel
5 génétique permettant leur expression. Plus particulièrement, elle concerne de
nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique.

La sérotonine est un neuromodulateur capable d'induire et de moduler une
grande variété de comportements tels que le sommeil, l'appétit, la locomotion,
l'activité sexuelle ou encore la contraction vasculaire. Il est admis que l'activité de la
10 sérotonine est médiée par son interaction avec des récepteurs, désignés récepteurs
sérotoninergiques ou récepteurs 5-HT (pour 5-hydroxytryptamine). Des études de
biologie moléculaire ainsi que des études pharmacologiques ont révélé qu'il existait
un grand nombre de sous-types de récepteurs 5-HT. Les récepteurs 5-HT qui ont été
décrits jusqu'à aujourd'hui appartiennent soit à la famille des récepteurs liés à des
15 canaux ioniques (récepteurs 5-HT₃), soit à la famille des récepteurs qui interagissent
avec des protéines G et qui possèdent sept domaines transmembranaires. Par ailleurs,
l'analyse des séquences d'acides aminés a montré que les récepteurs 5-HT
interagissant avec des protéines G peuvent être sous-divisés en deux groupes
distincts : Les récepteurs 5HT₁, comprenant les sous-types mammifères 5HT_{1A},
20 5HT_{1B} et 5HT_{1D} ainsi que trois récepteurs 5HT de drosophile ; et les récepteurs
5HT₂ comprenant les sous-types 5HT₂ et 5HT_{1C}.

Ces récepteurs ne sont sans doute pas les seuls récepteurs 5HT existant, dans
la mesure où des études pharmacologiques ont révélé d'autres sous-types tels que les
récepteurs 5HT₄ ainsi que certains récepteurs apparentés au sous-type 5HT₁
25 (récepteurs "5HT₁ like"). De plus, des études supplémentaires de biologie
moléculaire ont également révélé des hétérogénéités au sein des sous-types
5HT_{1B/1D}.

La présente invention résulte de la mise en évidence de nouveaux
polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Bien qu'appartenant à
30 la famille des récepteurs qui interagissent avec des protéines G, ces nouveaux
polypeptides diffèrent des récepteurs sérotoninergiques déjà décrits (5HT₁, 5HT₂,
5HT₃ et 5HT₄) du point de vue structural comme du point de vue pharmacologique.

Plus particulièrement, l'invention résulte de l'isolement et de la caractérisation de ces nouveaux polypeptides, désignés 5HT6, ainsi que du matériel génétique permettant leur expression ou leur identification.

Un premier objet de l'invention réside donc dans des polypeptides
5 comprenant tout ou partie de la séquence peptidique présentée sur la figure 1 ou d'un dérivé de celle-ci.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique présentée sur la figure 1. Par modification de nature génétique et/ou
10 chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) ligand(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui
15 de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues au polypeptide de la figure 1, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine,
20 ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De tels polypeptides homologues peuvent être obtenus par des expériences d'hybridation comme décrit dans les exemples.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont des polypeptides possédant la capacité de lier la sérotonine. Encore plus préférentiellement, il s'agit de
25 polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Toujours selon un mode préféré, les polypeptides de l'invention sont susceptibles d'être reconnus par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique complète présentée sur la figure 1.

Un mode de réalisation particulier de l'invention est représenté par le polypeptide 5HT6 comprenant toute la séquence peptidique présentée sur la figure 1.
30 Comme indiqué dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé dans différents types cellulaires pour former un récepteur sérotoninergique fonctionnel.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessous, par synthèse chimique, sur la base de la séquence donnée sur la figure 1 en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

5 Dans ce qui suit, les polypeptides de l'invention tels que définis ci-dessus sont désignés par polypeptides 5HT6.

La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide 5HT6. Plus préférentiellement, il s'agit d'une séquence choisie parmi :

10 (a) tout ou partie de la séquence nucléotidique présentée sur la figure 1 ou de son brin complémentaire,

(b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide tel que défini précédemment, et,

15 (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque
20 d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence donnée sur la figure 1. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, notamment selon la méthode des
25 phosphoramidites, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être utilisées pour la production des polypeptides 5HT6 tels que définis précédemment. Dans ce cas, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de
30 signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs

à réplication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à réplication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

5 Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des polypeptides 5HT6 de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*,
10 *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences nucléotidiques de la présente invention sont également utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit pour la réalisation de séquences
15 antisens utilisables dans le cadre d'une thérapie génique, soit encore pour la réalisation de sondes permettant la détection, par des expériences d'hybridation, de l'expression de récepteurs sérotoninergiques dans des échantillons biologiques et la mise en évidence d'anomalies génétiques (polymorphisme, mutations) ou
20 d'expressions aberrantes.

L'inhibition de l'expression de certains gènes par des oligonucléotides antisens s'est avérée être une stratégie prometteuse dans le contrôle de l'activité d'un gène. Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaire du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider
25 spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les oligonucléotides antisens capables d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides 5HT6 tels que définis précédemment. De tels oligonucléotides peuvent être constitués par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments
30 de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides de l'invention. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus à partir de la séquence donnée dans la figure 1, par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hydrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour des polypeptides 5HT6 de l'invention, ou avec les ARNm correspondant. De telles sondes peuvent être utilisées

5 *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT6, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Compte tenu des activités multiples de la sérotonine, les sondes de l'invention peuvent ainsi permettre d'identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme

10 étant liées aux récepteurs 5HT6. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT6 tels que définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 bases,

15 et elles peuvent comporter jusqu'à l'intégralité de la séquence présentée sur la figure 1 ou de son brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont, préalablement à leur utilisation, marquées. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc). Les conditions d'hybridation dans lesquelles ces sondes peuvent être utilisées sont

20 indiquées dans les techniques générales de clonage ci-après ainsi que dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées capables d'exprimer à leur surface un polypeptide 5HT6 tel que défini ci-avant. Ces cellules peuvent être obtenues par introduction d'une séquence nucléotidique telle que définie

25 ci-dessus codant pour un polypeptide de l'invention, puis culture desdites cellules dans des conditions d'expression de ladite séquence.

Les cellules recombinées selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier,

30 s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, CI27, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*,

35 *Bacillus*, ou *Streptomyces*. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées pour

mesurer la capacité de différentes molécules à se comporter comme ligand ou comme modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention. Plus particulièrement, elles peuvent ainsi être utilisées dans un procédé de mise en évidence et d'isolement de ligands ou de modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention, et, plus
5 préférentiellement, d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine.

Un autre objet de l'invention concerne donc un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides 5HT6 de l'invention, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes
10 molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de l'invention et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

15 Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine pour les polypeptides 5HT6.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides 5HT6 de l'invention, selon lequel on
20 réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de
25 l'invention et le 5HT, et,

- on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du 5HT sur ledit polypeptide de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme
30 médicament. De tels ligands ou modulateurs peuvent en effet permettre de traiter certaines affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT6.

L'invention concerne également tout médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide 5HT6 de l'invention. Préférentiellement la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé décrit précédemment.

- 5 D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Séquences nucléotidique et peptidique du récepteur 5HT6 (séquence ID n°1). L'ADNc de 1558 pb a été séquencé sur les 2 brins depuis le site EcoRI jusqu'au
10 site XhoI. Les 92 premiers nucléotides ne sont pas représentés.

Figure 2 : Pourcentages d'homologie de séquence peptidique entre le récepteur 5HT6 présenté sur la figure 1 et d'autres récepteurs de la famille des récepteurs couplés à des protéines G. Les homologies ont été calculées sur les séquences conservées : le domaine transmembranaire et ses boucles de connection.

15 Figure 3 : Courbe de saturation du [¹²⁵I]-LSD aux membranes des cellules Cos-7 exprimant le récepteur 5HT6. Les membranes ont été incubées avec des concentrations de ligand allant de 50 pM à 1,25 nM, avec ou sans 10 µM de 5HT. La liaison spécifique est représentée. L'encart représente l'analyse en Scatchard des résultats.

20 Figure 4 : Mise en évidence de séquences homologues par PCR sur des ARN totaux (1 µg) de différents tissus.

Table 1 : Profil pharmacologique du récepteur 5HT6. Les résultats correspondent à des expériences de compétition pour la liaison du [¹²⁵I]-LSD aux membranes des cellules Cos-7 exprimant le récepteur 5HT6 de manière transitoire. Les valeurs
25 d'IC50 (correspondant à la concentration en ligand nécessaire pour déplacer 50 % du [¹²⁵I]-LSD lié) ont été calculées expérimentalement et converties en Ki selon l'équation suivante : $K_i = IC_{50} / (1 + C/K_d)$ dans laquelle C est la concentration en [¹²⁵I]-LSD (150 pM) et Kd est la constante de dissociation du [¹²⁵I]-LSD (980 pM). Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre d'expériences indépendantes
30 réalisées, chaque point étant réalisé en triple.

Techniques générales de clonage

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence normales sont
5 généralement les suivantes : hybridation : 3 x SCC en présence de 5 x Denhart's à 65°C ; lavage : 0,5 x SSC à 65°C.

1. Isolement du récepteur 5HT6

Les comparaisons de séquences entre les différents récepteurs
sérotoninergiques connus font apparaître une certaine conservation, particulièrement
10 dans certaines régions transmembranaires potentielles telles que les domaines III et IV. Dans le but de mettre en évidence et d'isoler un nouveau récepteur, les inventeurs de la présente demande ont utilisé une sonde correspondant à un fragment génomique du récepteur 5HT1B β [Maroteaux et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 3020] pour cribler une banque d'ADN de cerveau de rat. Plus particulièrement, la sonde
15 utilisée correspond au fragment SacI-BglIII de 2,3 kb du récepteur 5HT1B β , préalablement marqué par "random priming" [Feinberg et Vogelstein, Analytical Biochemistry 132 (1984) 6]. Cette sonde a été utilisée pour cribler une banque d'ADNc de cerveau de rat construite dans le phage UniZap (Stratagène), dans des conditions de stringence faible (formamide 30 %, 5 x SSC, 42°C). Parmi les phages
20 positifs obtenus, l'un d'entre-eux, hybridant faiblement à la sonde a été isolé. Ce phage, dénommé λ SR et porté par le plasmide pSR, contenait un insert de 1,6 kb environ qui a ensuite été introduit dans le plasmide Bluescript. La séquence de ce fragment a été déterminée sur les 2 brins en utilisant la technique des dideoxynucléotides au moyen d'oligonucléotides synthétiques.

25 La séquence ainsi obtenue est présentée sur la figure 1. Elle montre que l'ADNc isolé porte une phase de lecture ouverte de 367 acides aminés. Par ailleurs, l'analyse d'hydrophobicité montre que cette protéine porte sept domaines hydrophobes, une particularité rencontrée chez les membres de la famille des récepteurs couplés à des protéines G. L'extrémité N-terminale contient par ailleurs 2
30 sites de N-glycosylation, et le domaine cytoplasmique présumé contient les sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases C et A.

2. Etude d'homologies de séquence

La séquence du récepteur 5HT6 isolé ci-dessus a été comparée avec les séquences des récepteurs couplés à des protéines G suivants : S31, 5HT1B β , 5HT1D α , 5HT1A, 5HT-dro2A, 5HT-dro1, 5HT1C et 5HT2. Ces expériences ont
5 révélé une certaine homologie dans le domaine transmembranaire potentiel et dans les boucles de connection, mais pas dans les régions terminales ni dans la troisième boucle cytoplasmique. La figure 2 donne les % d'homologie au niveau des régions conservées.

Comme il ressort de cette figure, l'homologie, au niveau des régions
10 conservées, avec les récepteurs connus est faible, le meilleur résultat étant obtenu avec les récepteurs sérotoninergiques 5HT1B β et 5HT1D α (54 % d'homologie), et avec le récepteur S31 qui n'est pas encore caractérisé.

3. Expression transitoire du récepteur 5HT6 dans les cellules Cos-7 et caractérisation pharmacologique

15 Le fragment d'ADNc isolé dans l'exemple 1 a été inséré dans un vecteur d'expression eucaryote, qui a été utilisé pour transfecter des cellules Cos-7. Les membranes des cellules transfectées obtenues ont ensuite été préparées et testées pour leur capacité à lier certains ligands sérotoninergiques marqués.

L'ADNc de 1,6 kb codant pour le récepteur 5HT6 a été isolé à partir du
20 plasmide pSR sous forme d'un fragment EcoRI-XhoI, puis inséré aux sites correspondants du vecteur p513. Le vecteur p513 dérive du vecteur pSG5 [Green et al., Nucl. Acids Res. 16 (1988) 369] par addition d'un multisite de clonage. Le vecteur recombinant ainsi obtenu désigné p513SR a ensuite été utilisé (20 μ g par plaque de 10 cm) pour transfecter les cellules Cos-7 en présence de phosphate de
25 calcium.

48 heures après la transfection, les cellules recombinantes sont récoltées et les membranes sont préparées selon la technique décrite par Amlaiky et Caron [J. Biol. Chem. 260 (1985) 1983]. Des expériences de liaison à saturation et de compétition ont ensuite été réalisées sur ces membranes en présence des ligands radiomarqués suivants : [¹²⁵I]-LSD; [¹²⁵I]-cyanopindolol; [³H]-8-OH-DPAT et [³H]-spiperone. Pour cela, les échantillons de membrane (10-20 μ g de protéines) ont été
30 incubés 10 minutes à 37°C en présence du ligand dans un volume final de 250 μ l de

tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La réaction est ensuite stopée par filtration sous vide sur filtres en fibre de verre Whatman GF/C, et rinçage 4 fois avec 4 ml de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La liaison non-spécifique a été déterminée en présence de 10 μ M de 5HT. La radioactivité a été mesurée avec un compteur γ .

5 Les résultats obtenus montrent que, bien que le [125 I]-cyanopindolol; le [3 H]-8-OH-DPAT et le [3 H]-spiperone ne lient pas les membranes préparées, le [125 I]-LSD présente un site de liaison saturable avec un $K_d = 980$ pM et un $B_{max} = 2,2$ pmol/mg de protéines membranaires (figure 3). Dans une expérience contrôle, il a par ailleurs été montré que le [125 I]-LSD ne liait pas les cellules Cos-7 transfectées
10 par le plasmide p513.

Pour déterminer le profil pharmacologique de ce récepteur, le [125 I]-LSD lié aux membranes a été déplacé en présence de différentes drogues sérotoninergiques (table 1). Ces différentes drogues montrent l'ordre d'efficacité de déplacement suivant : méthylsergide > bufotenine > sumatriptan > 5HT (table 1). La kétansérine,
15 le (+) cyanopindolol et le 5-CT possèdent une faible affinité, tant dis que la norépinéphrine est inactive.

4. Expression du récepteur 5HT6 dans les cellules NIH-3T3 et étude pharmacologique

L'ADNc cloné dans l'exemple 1 a également été exprimé dans les cellules
20 NIH-3T3, qui n'expriment aucun récepteur sérotoninergique de manière endogène. Pour cela, le vecteur d'expression recombinant décrit en 3. ci-dessus a été utilisé. Il a été introduit (20 μ g par plaque de 10 cm) dans les cellules NIH-3T3 par transfection en présence de phosphate de calcium, en même temps que le vecteur pRSVnéo [Gorman et al., Science 221 (1983) 551], portant le gène de résistance au G418 (1 μ g
25 par plaque de 10 cm). Les clones transformants ont été sélectionnés en présence de 0,5 mg de G418. Les clones isolés ont ensuite été amplifiés et les RNA totaux de ces clones ont été préparés et analysés en Northern Blot pour l'expression d'ARNm du 5HT6. Un clones a ainsi été sélectionné, SR4, exprimant des niveaux élevés d'ARNm du 5HT6.

30 Les membranes des cellules de ce clone ont ensuite été préparées et testées dans les conditions décrites ci-dessus pour leur capacité à lier certains ligands

sérotoninergiques marqués, témoignant de la présence de récepteurs 5HT6 fonctionnels à leur surface.

5. Recherche de séquences homologues dans d'autres tissus

La séquence nucléotidique présentée sur la figure 1 a ensuite été utilisée
5 pour la mise en évidence de séquences homologues à partir d'autres tissus. Pour cela, deux techniques ont été utilisées :

- la PCR
- l'hybridation *in situ*.

Les tissus utilisés pour la recherche de séquences homologues sont les
10 suivants d'origine murine : cerveau, cervelet, rein, foie, moelle épinière, rate, poumon, intestin et coeur.

5.1. Recherche par PCR

Pour la recherche par PCR, les sondes suivantes ont été utilisées :

Sonde (i) : AAGAATTGGTTGTTAATGTC

15 Sonde (ii) : TACATTCATTTAATTATCC

La sonde (i) correspond à la position 1174 sur la figure 1 et la sonde (ii) à la position 1394.

Les ARN totaux ont été préparés à partir des différents tissus étudiés, en utilisant la technique décrite par Cathala et al. (DNA 2(4) (1983)). 1 µg de ces ARN a
20 été soumis à une transcription inverse en présence de 200 unités de transcriptase inverse MMLV et de 300 ng de la sonde (i), pendant 1 heure à 37°C. La moitié du produit de cette réaction a ensuite été amplifiée (20 cycles) en présence de 5 unités de la polymérase Taq (Cetus) et de 500 ng des sondes (i) et (ii). Les produits ainsi
25 obtenus ont ensuite été transférés sur filtres de nitro-cellulose et hybridés dans les conditions de stringence élevée suivantes : 42°C, dans un tampon phosphate de sodium 20 mM (pH 6,5) contenant 50 % de formamide, 5 x SSC, 1 x Denhardt's, 0,1 % de SDS et 100 µg/ml d'ARNt. Les lavages ont été effectués à 60°C dans un tampon 0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

Cette étude a permis de mettre en évidence des fragments d'ADN spécifiques homologues dans la moelle épinière et le cerveau (figure 4).

5.2. Recherche par hybridation *in situ*

5 Les expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur des sections cryostatées de cerveau de rat adulte (8 semaines environ) selon la technique décrite par Hafen et al. [EMBO J. 2 (1983) 617]. La sonde utilisée pour ces expériences est un ARN simple brin obtenu par transcription en présence de polymérase T7, de [35S]-CTP en utilisant le plasmide PSR comme matrice.

10 Cette étude a permis de mettre en évidence des séquences homologues selon l'invention dans les couches CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe. Une expérience contrôle réalisée dans les mêmes conditions avec différentes sondes d'ARN de même longueur mais non spécifique des récepteurs de l'invention n'a révélé aucun signal positif.

15 Il est entendu que les mêmes expériences peuvent être répétées en utilisant d'autres tissus et notamment des tissus d'origine humaine, et d'autres sondes. Par ailleurs, les séquences homologues mises en évidence lors de ces expériences peuvent évidemment être ensuite isolées et/ou amplifiées par les techniques classiques de biologie moléculaire.

TABLE 1

	5HT6 (cellules Cos-7)	5HT1E (cortex humain)	5HT1D (Calf caudate)
5-HT	6.9 (2)	8.5	8.4
5-CT	5.5 (4)	6.0	8.6
RU24969	6.8 (2)		7.3
TFMPP	6.1 (2)	6.2	6.2
8-OH-DPAT	5.8 (2)	6.1	5.9
Sumatriptan	7.1 (2)		7.5
Bufotenine	7.5 (2)		8.1
Methysergide	8.2 (2)	7.2	8.4
Ergotamine	7.3 (2)	6.8	7.6
Yohimbine	7.2 (2)		7.1
(±) Cyanopindolol	5.4 (2)		6.9
Ketanserin	5.5 (2)	< 5	5.7
Mianserin	7.0 (2)		6.4
Spiperone	6.0 (2)		5.3
Dopamine	3.8 (2)		
(-)Norepinephrine	3.3 (2)		

REVENDICATIONS

1. Polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence peptidique présentée sur la figure 1 ou d'un dérivé de celle-ci.
2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il possède la
5 capacité de lier la sérotonine.
3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il possède une activité de récepteur sérotoninergique.
4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il peut être reconnu par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique complète
10 présentée sur la figure 1.
5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend toute la séquence peptidique présentée sur la figure 1.
6. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Séquence selon la revendication 6 caractérisée en ce qu'elle est choisie
15 parmi :
 - (a) tout ou partie de la séquence nucléotidique présentée sur la figure 1 ou de son brin complémentaire,
 - (b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un
20 polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, et,
 - (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.
8. Séquence selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, les séquences hybrides ou les
25 séquences synthétiques ou semi-synthétiques.
9. Séquence selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisée en ce que la partie codant pour ledit polypeptide est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

10. Oligonucléotide antisens capable d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.
11. Oligonucléotide selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il est constitué par tout ou partie d'une séquence nucléotidique selon la revendication 7.
- 5 12. Sonde nucléotidique capable de s'hydrider avec une séquence selon la revendication 6 ou avec l'ARNm correspondant.
- 13 Sonde selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 bases.
- 10 14. Sonde selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comporte l'intégralité de la séquence présentée sur la figure 1 ou de son brin complémentaire.
- 15 15. Sonde selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences suivantes : AAGAATTGGTTGTTAATGTC, TACATTCATTTAATTATCC.
- 20 16. Utilisation d'une sonde selon l'une des revendications 12 à 15 pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT₆; ou pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc); ou pour identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT₆; ou encore pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT₆.
17. Cellule recombinée capable d'exprimer à sa surface un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.
18. Cellule selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules eucaryotes ou procaryotes.
- 25 19. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :
- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la

revendication 17 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 5 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

5 - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

20. Procédé selon la revendication 19 pour la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes ou d'antagonistes de la sérotonine.

21. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on
10 réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 17 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 5, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction
15 entre ledit polypeptide et le 5HT, et,

- on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du 5HT sur ledit polypeptide.

22 Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 5, susceptible d'être obtenu selon les procédés des revendications
20 19 à 21.

23. Utilisation d'un ligand ou modulateur identifié et/ou obtenu selon les procédé des revendications 19 à 21 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT6.

25 24. Médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

25. Médicament selon la revendication 24 caractérisé en ce que la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé des revendications 19 à 21.

1/5

SEQ ID NO : 1

TYPE DE SEQUENCE : Nucléotide et sa protéine correspondante
LONGUEUR : 1558 paires de bases
NOMBRE DE BRINS : 1
CONFIGURATION : Linéaire
TYPE DE MOLECULE : ADNc
ORIGINE : Souris

```

1   GTCGGCCTCGAGTGGACTGGCGTCTGGAACCCGCCCTAGAGCTGCGCCCCAAGCTGCAGCGCGCATTTCAGCTCGCCA
78  CCCAAGAGGCAGCCGGGACGCGCTGTTGTGCCAGAGAACGACCGCGGGCGGGCTAGGGACCAGAGCCCCCTTAGCTTCGC
157 TCTGGGGAAGCTGAGTTGAGATGGCATTGAACTGTGAATGGCTGACTAATTTCTCACCAGATCAGGAGGTGAAGTGAGA
236 ATGAAGACCAACAGTTGAGCCTGCCACACCACGGTATTCATTTCTTCAACTATATTAACATTTTAACAAAAAAA  ATG
                                                                M           1
313 GAT TTT TTA AAC GCA TCA GAC CAA AAC TTG ACC TCT GAG GAA CTG TTA AAC CGA ATG CCA
    D F L N A S D Q N L T S E E L L N R M P           21
373 TCC AAA ATT CTG GTA TCC CTC ACT CTG TCT GGG CTG GCA TTG ATG ACA ACC ACC ATC AAC
    S K I L V S L T L S G L A L M T T T I N           41
433 TCC CTC GTG ATC GCT GCG ATC ATT GTG ACT CGG AAG CTG CAC CAC CCA GCC AAC TAT TTA
    S L V I A A I I V T R K L H H P A N Y L           61
493 ATT TGT TCC TTG GCA GTT ACA GAT TTT CTT GTA GCT GTC CTG GTG ATG CCC TTC AGT ATT
    I C S L A V T D F L V A V L V M P F S I           81
553 GTG TAC ATT GTG AGA GAG AGC TGG ATT ATG GGA CAA GTA CTC TGT GAC ATT TGG CTG AGT
    V Y I V R E S W I M G Q V L C D I W L S           101
613 GTC GAC ATC ATC TGT TGT ACG TGT TCC ATC TTG CAT CTG TCG GCT ATA GCC TTG GAT AGG
    V D I I C C T C S I L H L S A I A L D R           121
673 TAC CGC GCC ATC ACA GAT GCA GTT GAA TAC GCC AGG AAG AGG ACT CCC AGG CAT GCC GGC
    Y R A I T D A V E Y A R K R T P R H A G           141
733 ATC ATG ATC ACG ATC GTG TGG GTT ATA TCT GTG TTC ATC TCT ATG CCT CCT CTC TTC TGG
    I M I T I V W V I S V F I S M P P L F W           161
793 AGG CAC CAA GGA ACT AGC CGT GAT GAT GAG TGT GTC ATC AAA CAT GAC CAC ATT GTT TCC
    R H Q G T S R D D E C V I K H D H I V S           181
853 ACA ATT TAC TCC ACG TTT GGA GCT TTC TAC ATC CCG CTT GTA TTG ATA TTG ATC CTC TAC
    T I Y S T F G A F Y I P L V L I L I L Y           201
913 TAC AAA ATA TAC AGA GCA GCA AGG ACA CTG TAC CAC AAG AGA CAA GCG AGT CGG ATG ATA
    Y K I Y R A A R T L Y H K R Q A S R M I           221
973 AAG GAG GAG CTG AAC GGT CAA GTC TTC TTG GAG AGC GGT GAG AAG AGC ATT AAA CTG GTC
    K E E L N G Q V F L E S G E K S I K L V           241
1033 TCC ACA TCC TAC ATG TTA GAA AAA TCC TTG TCC GAT CCA TCA ACG GAC TTT GAT AGA ATT
    S T S Y M L E K S L S D P S T D F D R I           261
  
```

FIGURE 1 (a)

1093 CAC AGC ACC GTG AAA AGT CCC AGA TCG GAA CTG AAG CAT GAG AAA TCT TGG AGA AGA CAG
 H S T V K S P R S E L K H E K S W R R Q 281

1153 AAA ATC TCA GGC ACC AGA GAA CGC AAA GCA GCC ACT ACC CTG GGA TTG ATC TTG GGT GCA
 K I S G T R E R K A A T T L G L I L G A 301

1213 TTT GTA ATA TGT TGG CTG CCC TTT TTT GTA AAA GAA TTG GTT GTT AAT GTC TGT GAA AAA
 F V I C W L P F F V K E L V V N V C E K 321

1273 TGT AAA ATT TCT GAA GAA ATG TCA AAC TTT TTG GCA TGG CTT GGT TAC CTG AAT TCC CTT
 C K I S E E M S N F L A W L G Y L N S L 341

1333 ATA AAT CCA CTG ATT TAT ACC ATC TTT AAT GAA GAC TTC AAG AAA GCT TTC CAA AAA CTT
 I N P L I Y T I F N E D F K K A F Q K L 361

1393 GTA CGA TGC CGA TAT TAG GATAAAAGAAACCTAATTTTAAAGTGCGGAGGCTTTATTTGTTGGGGGGAGGGGC
 V R C R Y * 367

1466 AGGGATAATTAAATGAATGTAAGTAAGAAAACATTTAAATTTTGTAGAGAAAATATATTAAACTGCTAAAATTNAAAA

1545 AAAAAAAAAAAAAA

FIGURE 1 (b)

3/5

5HT6 souris	100									
S31	61	100								
5HT1B β souris	53	54	100							
5HT1D α humain	55	53	71	100						
5HT1A rat	45	43	49	48	100					
5HT-dro2A	43	39	42	41	44	100				
5HT-dro1	41	38	39	42	45	42	100			
5HT1C rat	31	34	30	32	29	29	31	100		
5HT2 rat	29	31	31	30	29	29	28	69	100	
5HT6 souris										
S31										
5HT1B β souris										
5HT1D α humain										
5HT1A rat										
5HT-dro2A										
5HT-dro1										
5HT1C rat										
5HT2 rat										

FIGURE 2

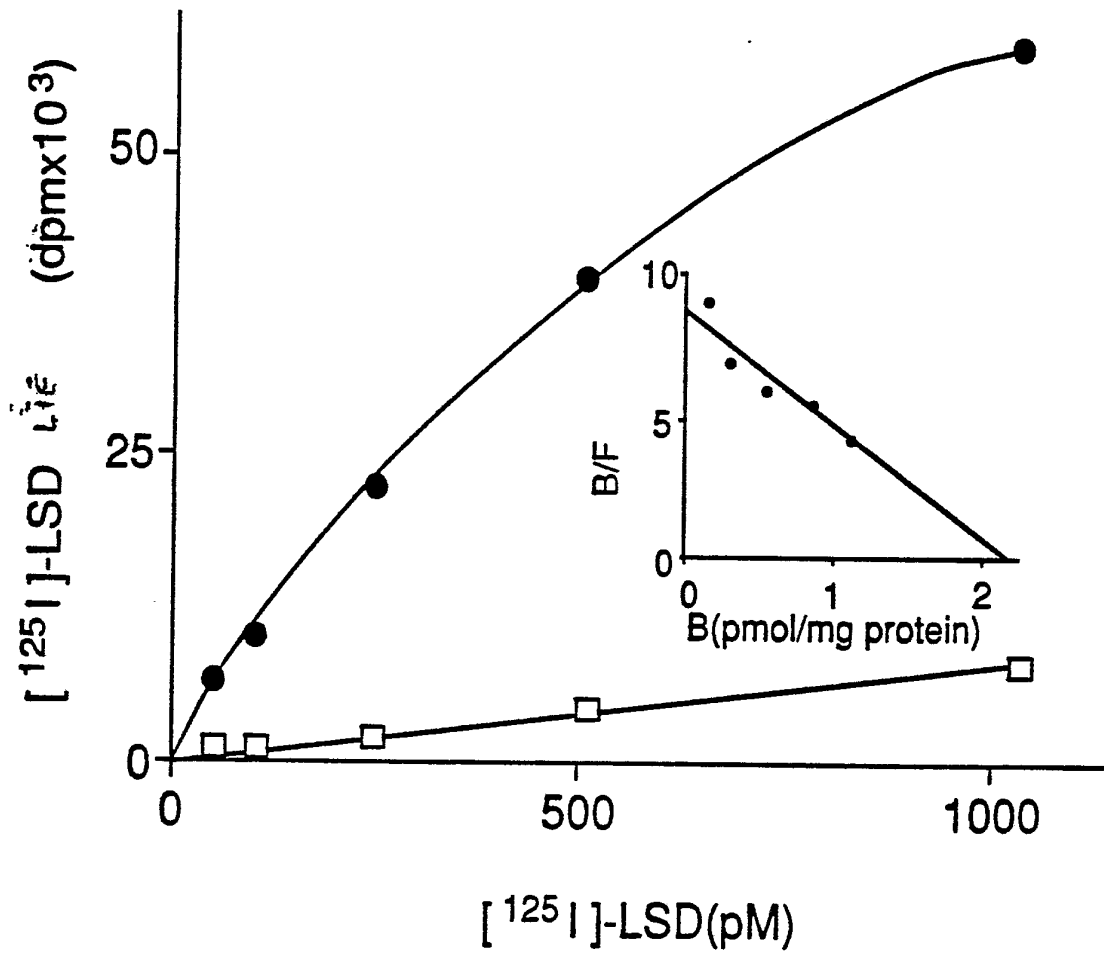


FIGURE 3

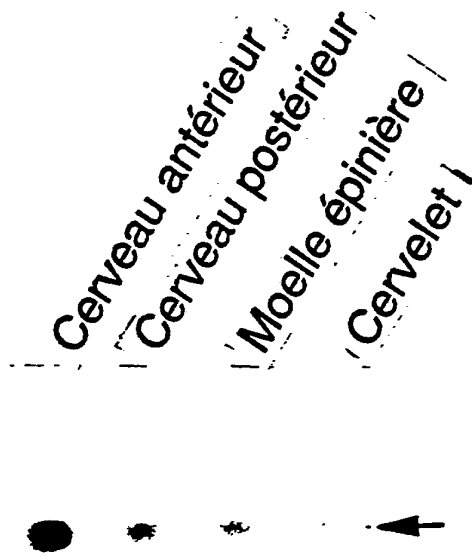


FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9208082
FA 476963
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-9 117 174 (NEUROGENETIC CORP) 14 Novembre 1991 * Revendications, figure 3 * ---	1-3,6,7, 9-13, 17-25
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89, no. 12, 15 Juin 1992, WASHINGTON US pages 5517 - 5521 McAllister G;Charlesworth A;Snodin C;Beer MS;Noble AJ;Middlemiss DN;Iversen LL;Whiting P; 'Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype.' * le document en entier * ---	1-3,6,7, 9-13, 17-25
X	DE-A-4 041 464 (BASF AG) 25 Juin 1992 * le document en entier * ---	1-3,6,7, 9-13, 7-25
X	EMBO JOURNAL. vol. 10, no. 13, 1991, EYNSHAM, OXFORD GB pages 4017 - 4023 VOIGT, M.M. ET AL.; 'Molecular cloning and characterization of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine1B receptor' * le document en entier * ---	1,3,6,7, 9-13, 17-25
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12N C07K
		-/--
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur NAUCHE S.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant

2

EPO FORM 1503 (01.82) (P0413)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9208082
FA 476963
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	<p>FEBS LETTERS. vol. 296, no. 2, 20 Janvier 1992, AMSTERDAM NL pages 201 - 206 LEVY FO;GUDERMANN T;BIRNBAUMER M;KAUMANN AJ;BIRNBAUMER L 'Molecular cloning of a human gene (S31) encoding a novel serotonin receptor mediating inhibition of adenylyl cyclase.' * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-3,6,7, 9-13, 17-25</p>
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur NAUCHE S.A.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2