



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 157**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04717063 .4**

96 Fecha de presentación : **04.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1606633**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Diagnósticos y tratamientos para enfermedades asociadas con el receptor de la dopamina D3 (DRD3).**

30 Prioridad: **17.03.2003 EP 03005465**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

72 Inventor/es: **Golz, Stefan;**
Brüggemeier, Ulf y
Summer, Holger

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 308 157 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnósticos y tratamientos para enfermedades asociadas con el receptor de la dopamina D3 (DRD3).

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de la biología molecular, más particularmente la presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico y a secuencias de aminoácidos de un DRD3 humano y su regulación para el tratamiento de afecciones cardiovasculares en mamíferos, compuestas por el grupo de insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas.

Antecedentes de la invención*Receptores acoplados a proteína G*

El DRD3 es un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteína G (GPCR) [WO920793, WO200177172, Sokoloff y col. (1990), Le Coniat y col. (1991), Crocq y col. (1992), Shaikh y col. (1993), Nthen y col. (1993), Nanko y col. (1993), Spurlock y col. (1998), Ilani y col. (2001), Holzman (2000), Rybakowski y col. (2001), Lohmueller y col. (2003), Accili y col. (1996), Asico y col. (1998), Pilla y col. (1999), Guillin y col. (2001)]. Muchos procesos biológicos médicamente significativos están mediados por vías de transducción de señal que implican a proteínas G [Lefkowitz, (1991)]. La familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) incluye receptores de hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y virus. Ejemplos específicos de GPCR incluyen receptores de agentes tan diversos como dopamina, calcitonina, hormonas adrenérgicas, endotelina, AMPc, adenosina, acetilcolina, serotonina, histamina, trombina, quinina, hormona estimulante de los folículos, opsinas, gen 1 de diferenciación endotelial, rodopsinas, odorantes, citomegalovirus, las propias proteínas G, proteínas efectoras tales como fosfolipasa C, adenil ciclasa y fosfodiesterasa, y proteínas de acción: tales como proteína quinasa A y proteína quinasa C.

Los GPCR poseen siete dominios que atraviesan la membrana conservados que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. Los GPCR, también conocidos como receptores de siete regiones transmembrana, 7TM, se han caracterizado y contienen siete regiones hidrófobas conservadas de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos, que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. La mayoría de los GPCR tienen residuos únicos conservados de cisteína en cada uno de los dos primeros bucles extracelulares, que forman puentes disulfuro que se cree que estabilizan la estructura de la proteína funcional. Las siete regiones transmembrana se denominan TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 y TM7. La TM está implicada en la transducción de señal. La fosforilación y lipidación (palmitilación o farnesilación) de los residuos de cisteína puede influir sobre la transducción de señal de algunos GPCR. La mayoría de los GPCR contienen posibles sitios de fosforilación dentro del tercer bucle citoplásmico y/o el extremo carboxilo. Para varios GPCR, como el receptor beta adrenérgico, la fosforilación por la proteína quinasa A y/o quinasas específicas del receptor media la desensibilización del receptor.

Para algunos receptores, se cree que los sitios de unión al ligando de los GPCR comprenden huecos hidrófilos formados por varios dominios transmembrana del GPCR. Los huecos hidrófilos están rodeados por residuos hidrófobos de los GPCR. Se ha postulado que el lado hidrófilo de cada hélice transmembrana del GPCR mira hacia dentro y forma un sitio de unión al ligando polar. En varios GPCR se ha implicado que la TM3 tiene un sitio de unión al ligando tal como el residuo de aspartato de la TM3. También se ha implicado a los residuos de serina de TN5, una asparagina de TM6 y las fenilalaninas o tirosinas de TM6 o TM7 en la unión al ligando.

Los GPCR se acoplan dentro de la célula mediante proteínas G heterotriméricas a varias enzimas intracelulares, canales iónicos y transportadores. Diferentes subunidades alfa de proteína G estimulan, preferentemente, determinados efectores para modular varias funciones biológicas en una célula. La fosforilación de residuos citoplásmicos de los 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 de la hormona es la activación de la enzima, la adenilato ciclasa, dentro de la célula. La activación de enzimas por hormonas depende de la presencia del nucleótido GTP. El GTP también influye sobre la unión de la hormona. Una proteína G conecta el receptor hormonal con la adenilato ciclasa. La proteína G intercambia GTP por GDP unido cuando está activada por un receptor hormonal. A continuación, la forma portadora de GTP se une a la adenilato ciclasa activada. La hidrólisis del GTP en GDP, catalizada por la propia proteína G, devuelve a la proteína G a su forma basal inactiva. Por tanto, la proteína G desempeña un papel doble, como intermedio que transmite la señal desde el receptor al efector y como reloj que controla la duración de la señal.

Durante los últimos 15 años, se han introducido con éxito en el mercado casi 350 agentes terapéuticos dirigidos a receptores 7TM. Esto indica que estos receptores tienen una historia probada y establecida como dianas terapéuticas. Claramente existe una necesidad de identificar y caracterizar más receptores que puedan desempeñar un papel en la prevención, alivio o corrección de disfunciones o enfermedades, incluidas, entre otras, infecciones tales como infecciones bacterianas, fúngicas, de protozoos y víricas, particularmente las causadas por virus VIH, tipos de cáncer, alergias, incluido el asma, enfermedades cardiovasculares incluidos insuficiencia cardíaca, hipotensión, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, enfermedades hematológicas, enfermedades genitorinarias incluidas la incontinencia urinaria y la hiperplasia prostática benigna, osteoporosis, y trastornos del sistema nervioso periférico y central incluido el dolor, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Tecnología TaqMan/perfil de expresión

TaqMan es una técnica desarrollada recientemente en la que la liberación de un colorante indicador fluorescente a partir de una sonda de hibridación en tiempo real durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es proporcional a la acumulación del producto de la PCR. La cuantificación se basa en la parte temprana lineal de la reacción y mediante la determinación del ciclo umbral (CU), al cual se detecta primero la fluorescencia por encima del fondo.

Las tecnologías de expresión génica pueden ser útiles en varias áreas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, tales como la identificación de la diana, la optimización líder y la identificación de mecanismos de acción.

La tecnología TaqMan se puede usar para comparar las diferencias entre los perfiles de expresión de tejido normal y de tejido enfermo. El perfil de expresión se ha usado en la identificación de genes, regulados por aumento o por disminución en diversas enfermedades. Una aplicación interesante del perfil de expresión es la monitorización temporal de los cambios en la expresión génica durante la progresión de la enfermedad y el tratamiento farmacológico o en pacientes frente a individuos sanos. La premisa en este enfoque es que los cambios en el patrón de expresión génica en respuesta a estímulos fisiológicos o ambientales (p. ej., fármacos) puede servir como pistas indirectas de los genes causantes de la enfermedad o como dianas del fármaco. Además, los efectos de los fármacos con una eficacia establecida sobre los patrones de la expresión génica global pueden proporcionar una guía, o una firma genérica, frente a la que se puede comparar un nuevo candidato a fármaco.

El documento WO 03094856 describe dianas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardíaca y el infarto de miocardio.

DRD3

Se puede acceder a la secuencia nucleotídica del DRD3 en bases de datos públicas mediante el número de registro NM_000796 y se proporciona en la SEC ID N° 1. La secuencia de aminoácidos del DRD3 se representa en la SEC ID N° 2.

Los receptores acoplados a proteína G desempeñan un papel en la comunicación celular. Se caracterizan por un extremo N extracelular, 7 regiones transmembrana y un extremo C intracelular.

Sokoloff y col. (1990) caracterizaron un receptor dopaminérgico que difiere en su farmacología y su sistema de señalización de los receptores D1 y D2 y representa un autorreceptor y un receptor postsináptico. Denominado el receptor dopaminérgico D3, se localiza en las áreas límbicas del cerebro, que están relacionadas con las funciones cognitivas, emocionales y endocrinas. Mediante detección selectiva en las bibliotecas de ADNc y genómicas usando una combinación de transcripción inversa y PCR, Sokoloff y col. (1990) clonaron el gen del DRD3.

Sokoloff y col. (1990) descubrieron que el gen del DRD3, como el gen de DRD2 pero al contrario que la mayoría de los demás miembros de esta superfamilia, contiene 5 intrones. La posición de 2 de los intrones corresponde a la de los intrones en DRD2.

Le Coniat y col. (1991) asignaron el gen de DRD3 al cromosoma 3 mediante hibridación de una sonda genómica a cromosomas aislados por citometría de flujo y lo localizaron en la banda 3q13.3 mediante hibridación *in situ*.

Sokoloff y col. (1990) observaron que el receptor de D3 parecía mediar algunos de los efectos de los fármacos antipsicóticos y de los fármacos usados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que anteriormente se pensaba que sólo interactuaban con los receptores de D2.

Crocq y col. (1992) presentaron datos de 2 estudios independientes llevados a cabo en el Reino Unido y Francia, en los que se determinaron las frecuencias de un polimorfismo Ball en el gen de DRD3 en pacientes con esquizofrenia. En ambos estudios, más pacientes que controles eran homocigotos ($p = 0,005$, $p = 0,008$). Cuando se analizaron los datos agrupados, esta diferencia fue altamente significativa ($p = 0,0001$), con un riesgo relativo de esquizofrenia en homocigotos de 2,61 (IC 95% = 1,60-4,26). Shaikh y col. (1993) no encontraron resultados similares cuando estudiaron el trastorno afectivo bipolar.

Pensaron que esto indicaba una distinción genética entre los dos trastornos, que algunos habían pensado que eran expresiones diferentes de la misma alteración subyacente. Nothen y col. (1993) no pudieron confirmar el hallazgo de Crocq y col. (1992) de una asociación entre la esquizofrenia y la característica de homocigoto en el locus del receptor DRD3. Apuntaron que había una sobrerepresentación de heterocigotos en los grupos control estudiados por Crocq y col. (1992). En un estudio de 91 pacientes japoneses y 90 controles, Nanko y col. (1993) tampoco pudieron confirmar los hallazgos de Crocq y col. (1992). No obstante, Spurlock y col. (1998) sí duplicaron los hallazgos de Crocq y col. (1992) como parte del Estudio Multicéntrico de la Asociación Europea de esquizofrenia. Un exceso de homocigotos para ambos alelos de polimorfismo DRD3 se observó en pacientes esquizofrénicos ($\chi^2(2)$, 8,54, $P = 0,003$; cociente de posibilidades, 1,64, IC 95%, 1,18-2,29).

Aunque la fisiopatología precisa de la esquizofrenia se desconoce, la hipótesis dopaminérgica supone que la enfermedad es el resultado de una actividad excesiva en las sinapsis de dopamina del cerebro. Dado que el diagnóstico

de esquizofrenia depende de la información conductual descriptiva y sintomática, un marcador periférico mensurable podría permitir un diagnóstico más sencillo, más rápido y más exacto y su monitorización. Se ha descubierto que los linfocitos de sangre periférica expresan varios receptores de dopamina: D3, D4 (DRD4) y D5 (DRD5). Además se ha sugerido que estos receptores dopaminérgicos encontrados sobre los linfocitos reflejan los receptores encontrados en el cerebro. Ilani y col. (2001) demostraron una correlación entre el receptor dopaminérgico D3 sobre los linfocitos y la esquizofrenia, y demostraron una elevación significativa de al menos el doble en el nivel del ARN, del receptor dopaminérgico D3, pero no del D4, en pacientes esquizofrénicos. El incremento no se vio afectado por los diferentes tratamientos con fármacos antipsicóticos. Además, los pacientes no medicados exhibieron el mismo patrón, lo que indica que este cambio no era un resultado del tratamiento médico. Ilani y col. (2001) propusieron que el incremento del ARNm del receptor D3 sobre los linfocitos sanguíneos se pueden usar como marcador para la identificación y seguimiento de la esquizofrenia.

En la mayoría de los pacientes con esquizofrenia y en muchos de sus parientes sanos de primer grado se producen alteraciones de los movimientos oculares (Holzman, 2000).

Rybakowski y col. (2001) estudiaron las anomalías oculares de la fijación y de búsqueda suave en 119 pacientes esquizofrénicos y en 94 sujetos control no relacionados en asociación con el polimorfismo ser9-a-gly del gen de DRD3. Encontraron que ambos tipos de anomalías de los movimientos oculares fueron superiores en individuos con un genotipo homocigoto ser9. El genotipo ser9/ser9 era más prevalente en pacientes con una intensidad mayor de las alteraciones de la fijación (58,1 frente a 23,9%, P inferior a 0,001) y de la persecución suave (52,3 frente a 25,8%, P inferior a 0,02) y la frecuencia del genotipo ser9/gly9 fue menor en pacientes con mayores alteraciones de la fijación (37,0 frente a 60,9%, P inferior a 0,02).

De igual modo, la frecuencia del genotipo de ser9/ser9 fue superior en sujetos con cualquier grado de alteraciones del movimiento ocular que en los sujetos control. Rybakowski y col. (2001) sugirieron que el polimorfismo ser9/ser9 puede contribuir a las alteraciones de los movimientos oculares, que se usan como marcador de esquizofrenia.

Lohmueller y col. (2003) realizaron un metanálisis de 301 estudios de asociación genética publicados que cubren 25 asociaciones diferentes con trastornos habituales. Para 8 de estas asociaciones, el análisis agrupado de los estudios de seguimiento dieron una replicación estadísticamente significativa del primer informe, con modestos efectos genéticos estimados. Una de estas 8 fue la asociación DRD3/esquizofrenia (S/S del polimorfismo S9G) como comunicaron primero Crocq y col. (1992).

El papel del receptor de D3 es difícil de estudiar por su baja abundancia (aproximadamente 1% de los receptores de D2) y la ausencia de ligandos selectivos. Usando una estrategia de objetivo génico en células madre embrionarias de ratón, Accili y col. (1996) generaron ratones deficientes en DRD3 que portaban una mutación de terminación prematura de la cadena tras el residuo de arginina 148. Na. unión del antagonista de dopamina yodosulprido a los receptores D3 estaba ausente en ratones homocigotos para la mutación y considerablemente reducir en los ratones heterocigotos. El análisis conductual de los ratones mutantes mostró que esta mutación estaba asociada con la hiperactividad. Los ratones homocigotos carentes de receptores D3 mostraron un incremento de la actividad locomotora y de la conducta de crianza. Los ratones heterocigotos para la mutación mostraron alteraciones de la conducta similares, aunque menos pronunciadas.

Dado que los receptores de dopamina son importantes en la regulación de las funciones renal y cardiovascular, Asico y col. (1998) estudiaron las consecuencias cardiovasculares de la alteración del receptor D3, que se expresa en los túbulos proximales renales y las células yuxtaglomerulares en el ratón. Las presiones arteriales sistólica y diastólica fueron superiores (aproximadamente 20 mmHg) en ratones heterocigotos y homocigotos que en los ratones de tipo salvaje. Una carga aguda de solución salina incrementó el caudal de orina y la excreción de sodio hasta un punto similar en ratones de tipo salvaje y heterocigotos, pero el incremento se atenuó en ratones homocigotos. La actividad renal de renina fue mucho mayor en ratones homocigotos que en los de tipo salvaje; Los valores para los ratones heterocigotos fueron intermedios. El bloqueo de los receptores de subtipo 1 de la angiotensina II disminuyó la presión arterial sistólica durante más tiempo en ratones mutantes que en los de tipo salvaje. Por tanto, la alteración del receptor D3 incrementa la producción renal de renina y produce retención renal de sodio e hipertensión dependiente de renina.

Pilla y col. (1999) identificaron un compuesto denominado BP 897, que posee una afinidad elevada para el receptor D3 y una afinidad 70 veces inferior para el receptor D2, así como afinidades bajas para los receptores D1 y D4. El BP897 es el primer agonista selectivo del receptor D3 evaluado *in Vitro* con receptores recombinantes e *in vivo* con ratones que portan genes alterados del receptor D3. El BP897 es un agonista parcial *in Vitro* y actúa *in vivo* como agonista o como antagonista. Pilla y col. (1999) mostraron que BP897 inhibe la conducta de búsqueda de cocaína que depende de la presentación de entradas asociadas con la droga, sin tener ningún efecto principal de recompensa intrínseco. Los autores concluyeron que sus datos indican que los compuestos como BP897 podrían usarse para reducir el ansia por la droga y la vulnerabilidad a recaídas provocadas por estímulos ambientales asociados con la droga.

Inicialmente se consideró que el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) era responsable de la proliferación, diferenciación y supervivencia de neuronas mediante su captación en las terminales nerviosas y el transporte retrógrado al cuerpo celular. Progresivamente ha emergido un papel más diverso para el BDNF a partir de las obser-

vaciones que muestran que también se transporta en dirección anterógrada, se libera tras la despolarización neuronal y desencadena señales intracelulares rápidas y potenciales de acción en las neuronas centrales. Guillin y col. (2001) comunicaron que el BDNF provoca adaptaciones neuronales a largo plazo mediante el control de la capacidad de respuesta de sus neuronas diana al importante neurotransmisor dopamina. Utilizando lesiones y ratones con genes dirigidos carentes de BDNF, Guillin y col. (2001) mostraron que el BDNF de las neuronas dopaminérgicas es responsable de inducir la expresión normal del receptor D3 de dopamina en el núcleo accumbens tanto durante el desarrollo como en la edad adulta. El BDNF de las neuronas corticoestriales también indica sensibilización conductual desencadenando la sobreexpresión del receptor D3 en el núcleo estriado de ratas hemiparkinsonianas. Guillin y col. (2001) concluyeron que el BDNF puede ser un importante determinante de afecciones fisiopatológicas tales como adicción a drogas, esquizofrenia o enfermedad de Parkinson, en las que la expresión del receptor D3 es anómala.

El DRD3 muestra la homología más elevada (55%) con el receptor dopaminérgico humano D2, como se muestra en el ejemplo 1. El DRD3 está publicado en los documentos WO9207937 y WO200177172.

Mc Allister y col. (1995) mostraron que la activación de DRD3 resultaba en la inhibición de la actividad adenilato ciclasa estimulada por forskolina. La modulación de los niveles celulares de AMPc conduce a la modulación de las puertas de los canales iónicos, que tiene como resultado una alteración del flujo de iones de Ca²⁺, que es un mecanismo bien conocido de la función cardiovascular.

Resumen de la invención

La invención se refiere a nuevas asociaciones de enfermedades de polipéptidos y polinucleótidos de DRD3. La invención también se refiere a nuevos procedimientos de detección selectiva de agentes terapéuticos para el tratamiento de insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero que comprende un polipéptido de DRD3, un polinucleótidos de DRD3 o un anticuerpo, una ribozima o un oligonucleótido antisentido que regulan la actividad del polipéptido de DRD3.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la secuencia nucleotídica de un polinucleótido del receptor DRD3 (SEC ID N° 1).

La Fig. 2 muestra la secuencia aminoacídica de un polipéptido del receptor DRD3 (SEC ID N° 2).

La Fig. 3 muestra la secuencia nucleotídica de un cebador útil para la invención (SEC ID N° 3).

La Fig. 4 muestra la secuencia nucleotídica de un cebador útil para la invención (SEC ID N° 4).

La Fig. 5 muestra una secuencia nucleotídica útil como sonda para detectar proteínas de la invención (SEC ID N° 5).

Descripción detallada de la invención

Definición de los términos

Un "oligonucleótido" es una tira de residuos nucleotídicos que tiene un número suficiente de bases para usar como oligómero, amplímero o sonda en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se preparan a partir de una secuencia genómica o de ADNc y se usan para amplificar, revelar o confirmar la presencia de un ADN o ARN similar en una célula o tejido concretos. Los oligonucleótidos u oligómeros comprenden porciones de una secuencia de ADN que tiene al menos unos 10 nucleótidos y tantos como aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente unos 25 nucleótidos.

Las "Sondas" pueden derivar de ácidos nucleicos mono o bicatenarios naturales o recombinantes o pueden sintetizarse químicamente. Son útiles en la detección de la presencia de secuencias idénticas o similares. Dichas sondas pueden marcarse con moléculas indicadoras utilizando traducción de mella ambulante, reacción de relleno con Klenow, PCR u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las sondas de ácido nucleico pueden usarse en hibridaciones de tipo southern, northern o *in situ* para determinar si el ADN o ARN que codifica una determinada proteína está presente en un tipo de célula, tejido u órgano.

Un "fragmento de un polinucleótido" es un ácido nucleico que comprende toda o cualquier parte de una molécula de nucleótido dada, en la que el fragmento tiene menos nucleótidos que aproximadamente 6 kb, preferentemente menos que aproximadamente 1 kb.

Las "moléculas indicadoras" son radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos que se asocian con una secuencia nucleotídica o aminoacídica concreta, de modo que se establece la presencia de una secuencia determinada o se permite la cuantificación de una secuencia determinada.

Las moléculas “quiméricas” se pueden construir mediante la introducción de toda o parte de la secuencia de nucleótidos usada en esta invención en un vector que contiene una secuencia adicional de ácido nucleico que podría esperarse que cambie una cualquiera o varias de las siguientes características de DRD3: localización celular, distribución, afinidades de unión a ligando, afinidades entre cadenas, índice de degradación/recambio, señalización, etc.

“Activo” con respecto a un polipéptido de DRD3, se refiere a las formas, fragmentos o dominios de un polipéptido de DRD3 que conserva la actividad biológica y/o antigénica de un polipéptido de DRD3.

“Polipéptido de DRD3 natural” se refiere a un polipéptido producido por células no sometidas a ingeniería genética y, específicamente, contempla varios polipéptidos que surgen a partir de modificaciones postraduccionales del polipéptido, incluidas, entre otras, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

“Derivado” se refiere a polipéptidos que se han modificado químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, marcaje (véase en lo que antecede), pegilación (derivación con polietilenglicol) e inserción o sustitución química de aminoácidos tales como ornitina que normalmente no están en las proteínas humanas.

“Sustituciones conservadoras de aminoácidos” son el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro de propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, o una treonina por una serina.

Normalmente las “inserciones” o las “deleciones” se encuentran en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente produciendo el péptido de forma sintética mientras que se efectúan sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia mediante técnicas de ADN recombinante.

Una “secuencia señal” o “secuencia líder” se puede usar, cuando se desee, para dirigir al polipéptido a través de una membrana de una célula. Tal secuencia puede estar presente de forma natural en el polipéptido usado en la presente invención o puede proporcionarse a partir de fuentes heterólogas mediante técnicas de ADN recombinante.

Un “oligopéptido” es una tira breve de residuos de aminoácidos y puede expresarse a partir de un oligonucleótido. Los oligopéptidos comprenden una tira de residuos de aminoácidos de al menos 3, 5, 10 aminoácidos y, como máximo, 10, 15, 25 aminoácidos, normalmente de al menos 9 a 13 aminoácidos y de suficiente longitud para mostrar actividad biológica y/o antigénica.

“Inhibidor” es cualquier sustancia que retrasa o evita una reacción o respuesta química o fisiológica. Los inhibidores frecuentes incluyen, entre otros, moléculas antisentido, anticuerpos y antagonistas.

“Expresión estándar” es una medición cuantitativa o cualitativa para comparación. Se basa en un número estadísticamente adecuado de muestras normales y se crea para usar como base de comparación cuando se realizan ensayos diagnósticos, estudios clínicos o después de realizar perfiles terapéuticos de pacientes.

“Animal” como se usa en la presente memoria descriptiva puede definirse de modo que incluya humanos, animales domésticos (p. e., gatos, perros, etc.), agrícolas (p. ej., vacas, caballos, ovejas, etc.) o especies de experimentación (p. ej., ratón, rata, conejo etc.).

Un “polinucleótido de DRD3”, usado en la invención, debe entenderse como una molécula de ácido nucleico seleccionada de un grupo compuesto por

(i) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2,

(ii) moléculas de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEC ID N° 1,

(iii) moléculas de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID N° 1,

(iv) moléculas de ácido nucleico cuya hebra complementaria hibrida en condiciones estrictas con una molécula de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii); y

(v) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético; en la presente memoria descriptiva el polipéptido codificado por dicha molécula de ácido nucleico tiene actividad DRD3.

Un “polipéptido de DRD3”, usado en la invención, debe entenderse como polipéptido seleccionado de un grupo compuesto por

(i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEC ID N° 2,

(ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N° 2,

(iii) polipéptidos codificados por polinucleótidos DRD3; y

(iv) polipéptidos que muestran una homología de al menos 99%, 98%, 95%, 90% u 80% con un polipéptido de i), (ii) o (iii); en los que dicho polipéptido tiene actividad de DRD3.

5

Las secuencias de nucleótidos que codifican un DRD3 (o su complemento) tienen numerosas aplicaciones en técnicas conocidas para los expertos en la técnica de biología molecular. Estas técnicas incluyen el uso como sondas de hibridación, uso en la construcción de oligómeros para PCR, uso para cartografía de cromosomas y de genes, uso en la producción recombinante de DRD3 y uso en la generación de ADN o ARN antisentido, sus análogos químicos y similares. Los usos de nucleótidos que codifican un DRD3 descrito en la presente memoria descriptiva son ejemplos de técnicas conocidas y no se pretende limitar su uso en cualquier técnica conocida para un experto ordinario en la técnica. Además, las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria descriptiva pueden usarse en técnicas de biología molecular que todavía no se han desarrollado, con la condición de que las técnicas nuevas dependan de propiedades de secuencias nucleotídicas actualmente conocidas, por ejemplo el código genético en tripletes, las interacciones específicas entre los pares de bases, etc.

15

Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias nucleotídicas que codifican DRD3. Algunas de ellas sólo llevarán una homología mínima con la secuencia de nucleótidos del DRD3 conocido y natural. La descripción ha contemplado específicamente todas y cada una de las posibles variaciones de la secuencia nucleotídica que podrían hacerse mediante la selección de combinaciones basadas en la elección de los posibles codones. Estas combinaciones se efectúan de acuerdo con el código genético en tripletes estándar según se aplica a la secuencia nucleotídica del DRD3 natural y todas estas variaciones se deben considerar como descritas específicamente.

20

Aunque las secuencias de nucleótidos que codifican un DRD3, sus derivados o sus variantes pueden, preferentemente, hibridar con la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de DRD3 natural en condiciones estrictas, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de DRD3 o sus derivados que poseen un uso de codones considerablemente diferente. Los codones se pueden seleccionar para incrementar el índice al que se produce la expresión del péptido en un huésped de expresión procariótica o eucariótica concreto de acuerdo con la frecuencia con la que el huésped utiliza determinados codones. Otras razones para alterar considerablemente la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de DRD3 y/o sus derivados sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada incluyen la producción de transcritos de ARN que tengan propiedades más deseables, como una mayor semivida, que los transcritos producidos a partir de la secuencia natural.

30

Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de DRD3 pueden unirse a otras diversas secuencias nucleotídicas por medio de técnicas bien establecidas de ADN recombinante. Secuencias de nucleótidos útiles para unir a los polinucleótidos de DRD3 incluyen una serie de vectores de clonación, tales como plásmidos, cósmicos, derivados del fago lambda, fagemidos y similares. Entre los vectores de interés se incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciación etc. En general, los vectores de interés pueden contener un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios sensibles a endonucleasas de restricción convenientes y marcadores seleccionables para uno o más sistemas de células huésped.

40

Otro aspecto del sujeto es proporcionar sondas de hibridación específicas de DRD3 capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos naturales que codifican DRD3. Tales sondas también se pueden usar para la detección de secuencias que codifican GPCR similares y, preferentemente, deben mostrar una identidad nucleotídica con los polinucleótidos de DRD3 de al menos un 40%. Las sondas de hibridación del sujeto pueden derivar de la secuencia nucleotídica presentada como SEC ID N° 1 o de secuencias genómicas que incluyen promotor, potenciadores o intrones del gen nativo. Las sondas de hibridación pueden marcarse con diversas moléculas indicadoras usando técnicas bien conocidas en la técnica.

50

Debe reconocerse que muchos análogos delecionales o mutacionales de los polinucleótidos de DRD3 serán eficaces sondas de hibridación para polinucleótidos de DRD3. En consecuencia, la descripción se refiere a secuencias de ácido nucleico que hibrida con tales secuencias de ácido nucleico que codifica DRD3 en condiciones estrictas.

55

“Condiciones estrictas” se refiere a condiciones que permiten la hibridación de secuencias de ácido nucleico considerablemente relacionadas. Por ejemplo, tales condiciones permitirán, generalmente, la hibridación de la secuencia con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 85%, preferentemente con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 90%, más preferentemente con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95%. Las condiciones y sondas de hibridación se pueden ajustar de modos bien caracterizados para alcanzar una hibridación selectiva de sondas derivadas de seres humanos. Las condiciones estrictas, dentro del significado de la invención, son 65°C en un tampón que contiene EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5M (pH 7,2), 7% (p/v) de SDS.

60

Las moléculas de ácido nucleico que hibridarán con los polinucleótidos de DRD3 en condiciones estrictas se pueden identificar funcionalmente. Sin limitaciones, entre los ejemplos de los usos de las sondas de hibridación se incluyen: usos histoquímicos tales como identificación de tejidos que expresan DRD3; medición de niveles de ARNm, por ejemplo para identificar el tipo de tejido de una muestra o para identificar células que expresan niveles anómalos de DRD3; y detección de polimorfismos de DRD3.

65

La PCR proporciona usos adicionales para oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos que codifica DRD3. Dichas sondas usadas en la PCR pueden ser de origen recombinante, sintetizado químicamente o una mezcla de ambos. Los oligómeros pueden comprender pequeñas secuencias de nucleótidos empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de DRD3 en tejidos específicos o uso diagnóstico. Los mismos dos oligómeros, un grupo anidado de oligómeros, o incluso un grupo degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos estrictas para la identificación de ADN o ARN estrechamente relacionados.

Ahora están establecidas las normas para el diseño de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), según lo revisado en los protocolos de PCR. Los cebadores degenerados, es decir las preparaciones de cebadores que son heterogéneos en localizaciones de secuencias dadas, se pueden diseñar para amplificar secuencias de ácido nucleico que son altamente homólogas, pero no idénticas, al DRD3. En la actualidad se dispone de estrategias que permiten requerir sólo uno de los cebadores para hibridar específicamente con una secuencia conocida. Por ejemplo, cebadores adecuados de ácido nucleico se pueden unir al ácido nucleico que se busca amplificar para proporcionar el socio de hibridación para uno de los cebadores. De este modo, sólo uno de los cebadores tiene que estar basado en la secuencia del ácido nucleico que se busca amplificar.

Los métodos de PCR para amplificar el ácido nucleico usarán al menos dos cebadores. Uno de estos cebadores podrá hibridar con una primera hebra del ácido nucleico que se va a amplificar y cebar en una primera dirección la síntesis de ácido nucleico dirigida por enzimas. El otro podrá hibridar con la secuencia recíproca de la primera hebra (si la secuencia a amplificar es monocatenaria, esta secuencia será, inicialmente, hipotética pero se sintetizará en el primer ciclo de amplificación) y cebar la síntesis del ácido nucleico a partir de dicha hebra en la dirección opuesta a la primera dirección y hacia el punto de la hibridación del primer cebador. Las condiciones para realizar tales amplificaciones, en particular en las condiciones estrictas de hibridación preferidas, son bien conocidas.

Otros medios de producir sondas específicas de hibridación para DRD3 incluyen la clonación de secuencias de ácido nucleico que codifican DRD3 o derivados de DRD3 en vectores para la producción de sondas de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están disponibles comercialmente y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in Vitro* por medio de la adición de la ARN polimerasa adecuada, como la ARN polimerasa T7 o SP6 y las moléculas indicadoras adecuadas.

Es posible producir una secuencia de ADN, o porciones de la misma, completamente mediante química sintética. Tras la síntesis, la secuencia de ácido nucleico puede insertarse en cualquiera de los muchos vectores de ADN disponibles y sus respectivas células huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, la química sintética se puede usar para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos. Como alternativa, una porción de la secuencia en la que se desea una mutación se puede sintetizar y recombinar con una porción más larga de una secuencia genómica o recombinante existente.

Los polinucleótidos de DRD3 se pueden usar para producir un oligo o polipéptido purificado mediante métodos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante. El oligopéptido puede expresarse en diversas células huésped, bien procarióticas o eucarióticas. Las células huésped pueden ser de la misma especie de la derivó la secuencia nucleotídica o de una especie diferente. Las ventajas de producir un oligonucleótido mediante tecnología de ADN recombinante incluyen obtener cantidades adecuadas de la proteína para purificar y la disponibilidad de procedimientos de purificación simplificados.

45 *Determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos*

Una importante etapa en el análisis genético molecular de la enfermedad humana es a menudo la enumeración del número de copias de un ácido nucleico o de la expresión relativa de un gen en tejidos concretos.

En la actualidad se dispone de varios enfoques diferentes para realizar determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos. Técnicas basadas en cromosomas, tales como la hibridación genómica comparativa (HGC) y la hibridación *in situ* fluorescente (HISF) facilitan los esfuerzos para localizar citogenéticamente regiones genómicas que están alteradas en las células tumorales. Las regiones de alteración genómica se pueden estrechar más usando el análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH), en el que el ADN se analiza y se compara con el ADN normal según la pérdida de marcador polimórfico heterocigoto. Los primeros experimentos usaron polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) [Johnson, (1989)], o ADN minisatélite hipervariable [Barnes, 2000]. En los últimos años el LOH se ha realizado, principalmente, usando amplificación por PCR de los marcadores microsatélites y electroforesis de los productos de PCR radiomarcados [Jeffreys, (1985)] o marcados con fluorescencia [Weber, (1990)] y se ha comparado entre los ADN pareados normales y de enfermedad.

También se ha desarrollado una serie de otros procedimientos para cuantificar ácidos nucleicos [Gergen, (1992)]. Más recientemente se han desarrollado los procedimientos de PCR y RT-PCR, que pueden medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Por ejemplo, un enfoque mide la cantidad del producto de PCR en la fase log de la reacción antes de la formación de los equilibrios de los productos de reacción [Thomas, (1980)].

Normalmente se utiliza una secuencia génica contenida en todas las muestras a una cantidad relativamente constante para la normalización de la eficacia de la amplificación de la muestra. No obstante, este enfoque sufre varios inconvenientes. El procedimiento requiere que cada muestra tenga cantidades iguales del ácido nucleico y que la

eficacia de amplificación entre las muestras es idéntica hasta el momento del análisis. Además, es difícil usar los procedimientos convencionales de cuantificación por PCR, tal como electroforesis en gel o hibridación por captura en placa, para determinar que todas las muestras de hecho se analizan durante la fase log de la reacción tal y como requiere el procedimiento.

Otro procedimiento denominado PCR competitiva cuantitativa (QC)-PCR, como el nombre indica, implica la inclusión de un competido control interno en cada reacción [Piatak, (1993), BioTechniques]. La eficacia de cada reacción se normaliza con el competidor interno. Normalmente, a cada muestra se añade una cantidad conocida del competidor interno. El producto de PCR diana desconocido se compara con el producto de PCR competidor conocido para obtener una cuantificación relativa. Una dificultad con este enfoque general reside en el desarrollo de un control interno que amplifica con la misma eficacia que la molécula diana.

Ensayos con nucleasa 5' fluorogénica

Los ensayos con nucleasa fluorogénica son un procedimiento de cuantificación en tiempo real que usa una sonda para monitorizar la formación de un producto de amplificación. La base de este procedimiento de monitorización de la formación del producto de amplificación es medir continuamente la acumulación del producto de PCR usando una sonda oligonucleotídica fluorogénica con doble marcaje, un enfoque con frecuencia denominado en la literatura simplemente como el "procedimiento TaqMan" [Piatak,(1993), Science; Heid, (1996); Gibson, (1996); Holland. (1991)].

La sonda usada en estos análisis normalmente es un oligonucleótido corto (de aproximadamente 20-25 bases) que está marcado con dos colorantes fluorescentes diferentes. El extremo 5' de la sonda está unido a un colorante indicador y el extremo 3' está unido a un colorante inactivador, aunque los colorantes también podrían estar unidos en otras localizaciones de la sonda. La sonda está diseñada para tener al menos una complementariedad sustancial de secuencia con el sitio de unión de la sonda. A la mezcla de reacción se añaden los cebadores de PCR en 5' y en 3' que se unen a las regiones adyacentes del locus. Cuando la sonda está intacta se produce transferencia de energía entre los dos fluoróforos y el inactivador inactiva la emisión desde el indicador. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda se escinde mediante la actividad 5' nucleasa de una polimerasa de ácido nucleico tal como la Taq polimerasa, de modo que se libera el indicador del oligonucleótido-inactivador y se produce un incremento de la intensidad de la emisión del indicador, que se puede medir mediante un detector adecuado.

Un detector que está específicamente adaptado para medir las emisiones de fluorescencia tales como los creados durante un ensayo fluorogénico es ABI 7700 o 4700 HT fabricado por Applied Biosystems, Inc. in Foster City, Calif. El ABI 7700 usa fibra óptica conectada con cada pocillo en una disposición de tubos de PCR de 96 o 384 pocillos. El instrumento incluye un láser para excitar los marcajes y es capaz de medir la intensidad de los espectros de fluorescencia de cada tubo con monitorización continua durante la amplificación por PCR. Cada tubo se reanaliza cada 8,5 segundos.

El software informático proporcionado con el instrumento es capaz de registrar la intensidad de la fluorescencia de un indicador e inactivador durante la amplificación. Los valores registrados se usarán después para calcular el incremento de la intensidad de la emisión normalizada del indicador de un modo continuo. El incremento de la intensidad de la emisión se representa frente al tiempo, es decir el número de ciclos de amplificación, para producir una medida continua de la amplificación. Para cuantificar el locus en cada reacción de amplificación, el gráfico de amplificación se examina en un punto durante la fase log de la acumulación del producto. Esto se consigue mediante asignación de un umbral de la intensidad de la fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto en el cual cada gráfico de amplificación cruza el umbral (definido como el número de ciclo umbral o Ct). Las diferencias en el número de ciclo umbral se usan para cuantificar la cantidad relativa de la diana de PCR contenida en cada tubo. Suponiendo que cada reacción funciona con una eficacia de PCR del 100%, una diferencia de una Ct representa una diferencia del doble en la cantidad del molde de partida. El valor de fluorescencia se puede usar junto con una curva estándar para determinar la cantidad de producto de amplificación presente.

Procedimientos de detección no basados en sondas

Se dispone de diversas opciones para medir los productos de amplificación tal como se han formado. Un procedimiento usa marcadores, tales como colorantes, que sólo se unen a ADN bicatenario. En este tipo de enfoque, el producto de amplificación (que es bicatenario) se une a las moléculas colorantes en solución para formar un complejo. Con los colorantes adecuados, es posible distinguir entre moléculas colorantes libres en solución y moléculas colorantes unidas al producto de amplificación. Por ejemplo, ciertos colorantes sólo emiten fluorescencia cuando están unidos al producto de amplificación. Ejemplos de colorantes que se pueden usar en procedimientos de este tipo general incluyen, entre otros, Syber Green.TM. y Pico Green de Molecular Probes, Inc. de Eugene, Oreg., bromuro de etidio, yoduro de propicio, cromomicina, naranja acridina, Hoechst 33258, Toto-1, Yoyo-1, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol clorhidrato).

Otra técnica de detección en tiempo real mide la alteración en la transferencia de energía de fluorescencia entre los fluoróforos conjugados con los cebadores de PCR [Livak, (1995)].

Procedimientos de detección basados en sondas

Estos procedimientos de detección implican alguna alteración de la estructura o conformación de una sonda hibridada con el locus entre el par cebador de amplificación. En algunos casos, la alteración se debe a la extensión dependiente de molde catalizada por una polimerasa de ácido nucleico durante el proceso de amplificación. La alteración genera una señal detectable que es una medida indirecta de la cantidad de producto de amplificación formado.

Por ejemplo, algunos procedimientos implican la degradación o digestión de la sonda durante la reacción de extensión. Estos procedimientos son una consecuencia de la actividad 5'-3' nucleasa asociada con algunas polimerasas de ácido nucleico. Las polimerasas que tienen esta actividad escinden mononucleótidos o pequeños oligonucleótidos a partir de una sonda oligonucleotídica hibridada con su secuencia complementaria localizada dentro del locus.

El extremo 3' del cebador anterior proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa de ácido nucleico. Dado que la polimerasa cataliza la extensión del cebador anterior y se encuentra con la sonda unida, la polimerasa de ácido nucleico desplaza una porción del extremo 5' de la sonda y, mediante su actividad nucleasa, escinde los mononucleótidos u oligonucleótidos de la sonda.

El cebador anterior y la sonda se pueden diseñar de un modo tal que se hibriden con la hebra complementaria en proximidad estrecha entre sí. De hecho, el extremo 3' del cebador anterior y el extremo 5' de la sonda pueden estar colindantes uno del otro. En esta situación, no es necesaria la extensión del cebador anterior para que la polimerasa de ácido nucleico comience a escindir la sonda. En el caso en el que los nucleótidos intermedios separen el cebador anterior y la sonda, es necesaria la extensión del cebador antes de que la polimerasa de ácido nucleico se encuentre con el extremo 5' de la sonda. Una vez que se produce el contacto y la polimerización continúa, la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa de ácido nucleico comienza a escindir los mononucleótidos u oligonucleótidos desde el extremo 5' de la sonda. La digestión de la sonda continua hasta que la porción restante de la sonda se disocia de la hebra complementaria.

En solución, las dos secciones terminales pueden hibridar entre sí para formar un bucle en horquilla. En esta conformación, el colorante indicador y el inactivador están en una proximidad suficiente como para que la fluorescencia del colorante indicador es inactivada de forma eficaz por el colorante inactivador. En contraste con ello, la sonda hibridada resulta en una conformación linealizada en la que la extensión de la inactivación disminuye. Por tanto, mediante la monitorización de los cambios de emisión para los dos colorantes, es posible monitorizar de forma indirecta la formación del producto de amplificación.

Sondas

La sonda marcada se selecciona de modo que su secuencia sea considerablemente complementaria a un segmento del locus de prueba o de un locus de referencia. Como se ha indicado antes el sitio del ácido nucleico al que la sonda se une deberá localizarse entre los sitios de unión del dejador para los cebadores de amplificación anterior y posterior.

Cebadores

Los cebadores usados en la amplificación se seleccionan de modo que sean capaces de hibridar con las secuencias en regiones flanqueantes del locus que se están amplificando. Los cebadores se escogen de modo que tengan una complementariedad considerable con las diferentes hebras del ácido nucleico que se está amplificando. Cuando se usa una sonda para detectar la formación de productos de amplificación, los cebadores se seleccionan de modo que flanqueen a la sonda, es decir están localizados en 5' y 3' de la sonda.

El cebador debe tener una longitud suficiente para que sea capaz de cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia de un agente de polimerización. La longitud y composición del cebador depende de muchos parámetros, incluidos, por ejemplo, la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de hibridación, la proximidad del sitio de unión de la sonda al del cebador, las concentraciones relativas del cebador y la sonda y la composición concreta del ácido nucleico de la sonda. Normalmente, el cebador incluye 15-30 nucleótidos. No obstante, la longitud del cebador puede depender más o menos de la complejidad del punto de unión del cebador y los factores indicados anteriormente.

Marcadores para sondas y cebadores

Los marcadores usados para marcar las sondas o cebadores usados en la presente invención y que pueden proporcionar la señal correspondiente a la cantidad de producto de amplificación pueden tomar varias formas. Como se ha indicado antes en relación con el procedimiento de nucleasa 5' fluorogénica, una señal fluorescente es una señal que se puede medir. No obstante, también se pueden realizar mediciones, por ejemplo mediante monitorización de la radiactividad, colorimetría, absorción, parámetros magnéticos o actividad enzimática. Por tanto, los marcadores que se pueden emplear incluyen, entre otros, flúoróforos, cromóforos, isótopos radiactivos, reactivos electróndensos, enzimas y ligandos que tienen socios de unión específicos (p. ej., biotina-avidina).

La monitorización de los cambios en la fluorescencia es un modo particularmente útil para monitorizar la acumulación de los productos de amplificación. Un número de marcadores útiles para la unión a sondas o cebadores están disponibles comercialmente, incluida fluoresceína y varios derivados de fluoresceína tales como HEX, TET y JOE (todos los cuales están disponibles en Applied Biosystems, Foster City, Calif.); amarillo lucifer y derivados de cumarina.

Los marcadores pueden unirse a la sonda o al cebador usando varias técnicas y se pueden fijar al extremo 5' y/o al extremo 3' y/o en un nucleótido interno. El marcador también se puede fijar a brazos espaciadores de varios tamaños que están unidos a la sonda o al cebador. Estos brazos espaciadores son útiles para obtener una distancia deseada entre los múltiples marcadores unidos a la sonda o al cebador.

En algunos casos se puede utilizar un solo marcador; mientras que en otros casos, tales como los ensayos de nucleasa 5' fluorogénica, por ejemplo, se unen a la sonda dos o más marcadores. En los casos en los que la sonda incluye múltiples marcadores, normalmente es aconsejable mantener un espacio entre los marcadores que sea suficiente para permitir la separación de los marcadores durante la digestión de la sonda mediante la actividad 5'-3' nucleasa de la polimerasa de ácido nucleico.

Pacientes que exhiben síntomas de enfermedad

Una serie de enfermedades se asocian con cambios en el número de copias de un gen determinado. Para los pacientes que presentan síntomas de una enfermedad se puede usar el procedimiento de PCR en tiempo real para determinar si el paciente tiene alteraciones en el número de copias que se sepa que están relacionadas con enfermedades asociadas con los síntomas que experimenta el paciente.

Expresión de DRD3

Proteínas de fusión de DRD3

Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra los polipéptidos de DRD3 y para usar en varios sistemas de ensayo. Por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden usar para identificar proteínas que interactúan con porciones de polipéptidos de DRD3. Para este propósito se pueden usar cromatografía de afinidad proteica o los ensayos basados en bibliotecas para las interacciones proteína-proteína, tales como el híbrido de dos levaduras o los sistemas de expresión en fagos. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica y también se pueden usar como filtros de fármacos.

Una proteína de fusión de DRD3 comprende dos segmentos polipeptídicos fusionados por medio de un enlace peptídico. El primer segmento polipeptídico puede comprender al menos 54, 75, 100, 125, 139, 150, 175, 200, 225, 250 o 275 aminoácidos contiguos de SEC ID N° 2 o de una variante biológicamente activa, como los descritos anteriormente. El primer segmento polipeptídico también puede comprender el DRD3 de longitud completa.

El segundo segmento polipeptídico puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de la proteína. Las proteínas usadas habitualmente en la construcción de proteínas de fusión incluyen, entre otras, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (PFV), proteínas autofluorescentes, incluida la proteína fluorescente azul (PFA), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano (HRP) y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Además, en las construcciones de proteínas de fusión se utilizan colas de epítipo, incluidas colas de histidina (His), colas de FLAG, colas de hemaglutinina de influenza (HA), colas Myc, colas VSV-G y colas de tioredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de unión a maltosa (MBP), cola-S, proteínas de fusión con dominio de unión de ADN a Lex a (DBD), proteínas de fusión del dominio de unión a ADN GAL4, proteínas de fusión BP16 del virus del herpes simple (VHS) y proteínas de fusión de proteína G (por ejemplo G(alfa)16, Gs, Gi). También se puede realizar ingeniería de una proteína de fusión para que contenga un punto de escisión adyacente al DRD3.

Preparación de polinucleótidos

Un polinucleótido de DRD3 natural se puede aislar libre de otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas y lípidos. Los polinucleótidos se pueden preparar mediante una célula y aislar usando técnicas estándar de purificación de ácido nucleico, o sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante el uso de un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutinarios y se conocen en la técnica. Se puede usar cualquiera de dichas técnicas para obtener un polinucleótido para obtener polinucleótidos de DRD3 aislados. Por ejemplo se pueden usar enzimas de restricción y sondas para aislar fragmentos polinucleotídicos que comprenden secuencias nucleotídicas de DRD3. Los polinucleótidos aislados se encuentran en preparaciones que están libres o al menos un 70, 80, o 90% libres de otras moléculas.

Se pueden preparar moléculas de ADNc de DRD3 con técnicas estándar de biología molecular, usando ARNm de DRD3 como molde. A continuación se pueden replicar las moléculas de ADNc de DRD3 usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Una técnica de amplificación, como la PCR, se puede usar para obtener copias adicionales de polinucleótido usado en la invención, usando ADN genómico o ADNc humanos como molde.

Como alternativa se pueden usar técnicas de química sintética para sintetizar polinucleótidos de DRD3. La degeneración del código genético permite sintetizar secuencias nucleotídicas alternativas, que codificarán DRD3 con, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2 o una variante biológicamente activa de la misma.

Extensión de polinucleótidos

Se pueden usar varios procedimientos basados en PCR para ampliar las secuencias de ácido nucleico que codifican DRD3 humano, por ejemplo para detectar secuencias anteriores del gen DRD3, tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, la PCR de restricción-sitio usa cebadores universales para recuperar la secuencia desconocida adyacente a un locus conocido. El ADN genómico se amplifica primero en presencia de un cebador hasta una secuencia de unión y un cebador específico de la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador de unión y otro cebador específico interno con respecto al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa adecuada y se secuencian usando la transcriptasa inversa.

La PCR inversa también se puede usar para amplificar o extender las secuencias usando cebadores divergentes basados en una región conocida. Los cebadores se pueden diseñar usando software disponible comercialmente, como OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), de modo que tengan una longitud de 22-30 nucleótidos, un contenido de GC del 50% o más y que hibriden con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68-72°C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. A continuación, el fragmento se circulariza mediante ligadura intramolecular y se usa como molde para la PCR.

Otro procedimiento que se puede usar es la PCR de captura, que implica la amplificación por PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en ADN cromosómico artificial humano y de levadura. En este procedimiento, también se pueden usar múltiples digestiones y ligaduras con enzimas de restricción para introducir una secuencia bicatenaria sometida a ingeniería en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de realizar la PCR.

Cuando se realiza la detección selectiva de los Hank de longitud completa, es preferible usar bibliotecas que se han seleccionado según el tamaño de modo que incluyan ADNc de mayor tamaño. Son preferibles las bibliotecas cebadas al azar porque contienen más secuencias que las que contienen en las regiones 5' de los genes. El uso de una biblioteca cebada al azar puede ser especialmente preferible para situaciones en las que una biblioteca de oligo d(T) no da ADNc de longitud completa. Las bibliotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de la secuencia en regiones reguladoras no transcritas en 5'.

Se pueden usar sistemas de electroforesis capilar disponibles comercialmente para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de la PCR o secuenciar los productos. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros circulares para la separación electroforética, cuatro colorantes fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que se activan por láser y detección de las longitudes de onda emitidas por una cámara dispositivo acoplada a carga. El gasto/intensidad de la luz se puede convertir en señal eléctrica usando un equipo y software adecuados (p. ej., GENOTYPER y Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y todo el procedimiento desde la carga de las muestras al análisis por ordenador y exposición de los datos electrónicos se puede controlar por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para la secuenciación de pequeñas piezas de ADN que podrían estar presentes en cantidades limitadas en una muestra concreta.

Obtención de polipéptidos

DRD3 se puede obtener, por ejemplo, mediante purificación a partir de células humanas, mediante expresión de polinucleótidos de DRD2 o mediante síntesis química directa.

Purificación de proteínas

El DRD3 se puede purificar a partir de cualquier célula humana que exprese el receptor, incluidas aquellas transfeccionadas con constructos de expresión que expresan DRD3. Un DRD3 purificado se separa de los otros compuestos que normalmente están asociados con DRD3 en la célula, tal como ciertas proteínas, hidratos de carbono o lípidos, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, entre otros, cromatografía por exclusión de tamaño, fraccionamiento con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis en gel preparativa.

Expresión de polinucleótidos de DRD3

Para expresar DRD3, los polinucleótidos de DRD3 se pueden insertar en un vector de expresión que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Se pueden usar procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican DRD3 y los elementos adecuados de control de la transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in Vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

Se pueden utilizar varios sistemas de expresión en vector/huésped para contener y expresar secuencias que codifiquen DRD3. Estos incluyen, entre otros, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión con ADN recombinante de bacteriófago, plásmido o cósmico, levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión en virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmidos Ti o pBR322) sistemas de células animales.

Los elementos control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas del vector, potenciadores, promotores, regiones no traducidas en 5' y 3', que interaccionan con las proteínas de las células huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su concentración y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y del huésped utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, al clonar en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles como el promotor híbrido LacZ del fagemido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. En células de insectos se puede usar el promotor de la polihidrina del baculovirus. En el vector se pueden clonar promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (p. ej., genes de las proteínas del shock térmico, RUBISCO y de almacenamiento) o de virus vegetales (p. ej., promotores víricos o secuencias líder). En los sistemas de células de mamíferos se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que codifique DRD3, los vectores basados en los virus SV40 o EBV se pueden usar con un marcador seleccionable adecuado.

Sistemas de expresión en bacterias y en levaduras

En los sistemas bacterianos se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de DRD3 para la inducción de anticuerpos se pueden usar vectores que dirijan la expresión de altos niveles de proteínas de fusión que se purifican con facilidad. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores de clonación y expresión en *E. coli*, tal como BLUESCRIPT (Stratagene). En un vector BLUESCRIPT, una secuencia que codifique DRD3 se puede ligar en el vector en el marco con secuencias para el aminoácido terminal Met y los siguientes 7 residuos de β -galactosidasa, de modo que se produce una proteína híbrida. Los vectores pIN o pGEX (Promega, Madison, Wis.) también se pueden usar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción en perlas de glutatión-agarosa, seguida por elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas hechas en tales sistemas se pueden diseñar para que incluyan heparina, trombina o puntos de escisión por la proteasa del factor Xa de modo que el polipéptido clonado de interés se puede liberar de la fracción GST a voluntad.

Sistemas de expresión en plantas e insectos

Si se usan vectores de expresión en plantas, la expresión de las secuencias que codifican DRD3 puede estar dirigida por cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, los promotores vitales tales como los promotores 35S y 19S del CaMV pueden usarse solos o en combinación con la secuencia líder omega del TMV. Como alternativa se pueden usar promotores vegetales, como los promotores de la subunidad pequeña de RUBISCO o del shock térmico. Estos constructos se pueden introducir en células vegetales mediante transformación directa de ADN o mediante transfección mediada por patógenos.

También se puede usar un sistema de insectos para expresar DRD3. Por ejemplo, en uno de estos sistemas se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia larvae*. Las secuencias que codifican DRD3 se pueden clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihidrina, y se colocará bajo el control del promotor de la polihidrina. La inserción satisfactoria de DRD2 inactivará el gen de polihidrina y producirá virus recombinante que carece de la proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae* en las que se puede expresar DRD3.

Sistemas de expresión en mamíferos

Para expresar el DRD3 en las células huésped de mamíferos se puede usar una serie de sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, si como vector de expresión se usa un adenovirus, las secuencias que codifican el DRD3 se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción del adenovirus que comprenda 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 DRD3 en células huésped infectadas [Engelhard, 1994]. Si se desea, se pueden usar potenciadores de la transcripción, como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) para incrementar la expresión en células huésped de mamífero.

También se pueden usar cromosomas humanos artificiales (CHA) para liberar fragmentos de ADN más grandes de lo que se puede contener y expresar en un plásmido. Los CHA de 6M y 10M se construyen y liberan en células a través de procedimientos de liberación convencionales (p. ej., liposomas, polímeros amino policationicos o vesículas). También se pueden usar señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican DRD3. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en

las que las secuencias codificadoras de DRD3, su codón de iniciación y sus secuencias anteriores se insertan en el vector de expresión adecuado, pueden no ser necesarias las señales adicionales de control de la transcripción o de la traducción. No obstante, en los casos en los que sólo se inserta la secuencia codificadora, o un fragmento de la misma, se deberán proporcionar señales exógenas de control traduccional (incluido el codón de iniciación ATG). El codón de iniciación deberá estar en el correcto marco de lectura para garantizar la traducción de todo el inserto. Los elementos exógenos traduccionales y los codones de iniciación pueden tener varios orígenes, tanto naturales como sintéticos.

Células huésped

Una cepa de célula huésped se puede escoger por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el DRD3 expresado del modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, entre otras, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma “prepro” del polipéptido también se puede usar para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctas. En la Colección Americana de cultivos Tipo ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 se dispone de diferentes células huésped que tiene maquinaria células específica y mecanismos característicos para las actividades postraduccionales (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38) y se pueden escoger para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña.

Para la expresión a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable DRD3 se pueden transformar usando vectores de expresión que pueden contener varios orígenes de replicación virales y/p elementos de expresión endógena y un gen de un marcador seleccionable en el mismo vector o en otro diferente. Tras la introducción del vectores, se puede dejar que las células crezcan durante 1-2 días en medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias de DRD3 introducidas. La proliferación de clones de células transformadas de forma estable se puede realizar usando técnicas de cultivo tisular adecuadas al tipo de célula. Para recuperar las líneas celulares transformadas se puede usar cualquier número de sistemas de selección. Entre estos se incluyen los genes de la timidina cinasa [Logan, (1984)] y de la adenina fosforibosiltransferasa [Wigler, (1977)] del virus del herpes simple, que se pueden emplear en células *tk-* o *aprt-*, respectivamente. Asimismo se pueden usar la resistencia antimetabolitos, a antibióticos o a herbicidas como base de la selección. Por ejemplo, *dhfr* confiere resistencia a metotrexato [Lowy, (1980)], *npt* confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 [Wigler, (1980)], y *als* y *pat* confieren resistencia a clorosulfurón y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente [Colbere-Garapin, 1981]. 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 utilizar histinol en lugar de histidina. Se pueden usar marcadores visibles tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar los transformantes y cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico.

Detección de la expresión de polipéptido

Aunque la presencia de expresión de un gen marcador sugiere que también está presente un polinucleótido de DRD3, puede ser necesario confirmar su presencia y expresión. Por ejemplo, si una secuencia que codifica DRD3 se inserta dentro de una secuencia del gen marcador, las células transformadas que contienen secuencias que codifican DRD3 se pueden identificar por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, se puede introducir un gen marcador en tándem con una secuencia que codifique DRD3 bajo el control de un promotor sencillo. La expresión del gen marcador como respuesta a la inducción o selección normalmente indica la expresión del polinucleótido DRD3.

Como alternativa se pueden identificar células huésped que contienen un polinucleótido de DRD3 y que expresan DRD3 mediante diversos procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, entre otros, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayos proteico o de inmunoensayo, que incluyen tecnologías de membrana, solución o basadas en chip para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia polinucleotídica que codifica DRD3 se puede detectar mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación usando sondas o fragmentos o fragmentos de de polinucleótidos que codifican DRD3. Los ensayos basados en amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados a partir de secuencias que codifican DRD3 para detectar transformantes que contienen un polinucleótido de DRD3.

En la técnica se conocen diversos protocolos para detectar y medir la expresión de DRD3 usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido. Ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se puede usar un inmunoensayo de dos puntos basado en anticuerpos monoclonales usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes sobre el DRD3 o un ensayo de unión competitiva.

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación, y se pueden usar en varios ensayos con ácido nucleico y aminoácidos. Entre los medios para producir sondas de hibridación marcadas o de PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos que codifican DRD3 se incluyen oligomarcaje, traducción in mella ambulante, marcate terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como

alternativa se pueden clonar en un vector secuencias que codifican DRD3 para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente, y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa adecuada, tal como T7, T3 o SP6. Estos procedimientos se pueden realizar usando diversos kit disponibles comercialmente (Amersham Pharmacia Biotech, Promega y US Biochemical). Entre las moléculas indicadoras o marcadores que se pueden usar para una fácil detección se incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Expresión y purificación de polipéptidos

Las células huésped transformadas con polinucleótidos de DRD3 se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. El polipéptido producido mediante una célula transformada puede secretarse o estar contenido en el interior de la célula dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como entenderán los expertos en la técnica, se pueden diseñar vectores de expresión que contienen polinucleótidos de DRD3 de modo que contengan secuencias señal que dirigen la secreción de DRD3 soluble mediante una membrana células procariótica o eucariótica o que dirigen la inserción en la membrana de DRD3 unido a la membrana.

Como se ha tratado anteriormente se pueden usar otras construcciones para unir una secuencia que codifica DRD3 a una secuencia nucleotídica que codifica un dominio polipéptidos que facilitará la purificación de las proteínas solubles. Tales dominios que facilitan purificación incluyen, entre otros, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio usado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias gigantes escindibles tales como las específicas del Factor XA o enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y DRD3 también se puede usar para facilitar la purificación. Uno de estos vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene DRD3 y 6 residuos de histidina que preceden la tioredoxina o un punto de escisión para enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación mediante IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados) Maddox, (1983)], mientras que el punto de escisión de enterocinasa proporciona un medio de purificación de DRD3 a partir de la proteína de fusión [Porath, (1992)].

Síntesis química

Las secuencias que codifican DRD3 se pueden sintetizar, por completo o en parte, usando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el propio DRD3 puede producirse usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tales como mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida. La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Opcionalmente se pueden sintetizar por separado fragmentos de DRD3 y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

El péptido recién sintetizado se puede purificar sustancialmente mediante cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento. La composición de un DRD3 sintético se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de los aminoácidos. Además, durante la síntesis directa cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de DRD3 se puede alterar y/o combinar, mediante procedimientos químicos, con secuencias de otras proteínas, para producir una variantes del polipéptido o una proteína de fusión.

Producción de polipéptidos alterados

Como los expertos en la técnica entenderá, puede ser ventajoso producir polinucleótidos de DRD3 que poseen codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones preferidos por un huésped procariótica o eucariótica concreto para incrementar el índice de expresión de proteínas o producir un transcrito de ARN que posee propiedades deseables tales como una semivida mayor que la de un transcrito generado a partir de la secuencia natural.

Las secuencias nucleotídicas a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva se pueden someter a ingeniería usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar los polinucleótidos de DRD3 por diversas razones, incluidas, entre otras, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o del producto del ARNm. Para realizar ingeniería de las secuencias nucleotídicas se puede usar arrastre de ADN mediante fragmentación aleatoria y reensamblaje por PCR de los fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos. Por ejemplo se puede usar mutagénesis dirigida por sitio para insertar nuevos puntos de restricción, alterar patrones de glucosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones, etc.

Anticuerpos

Se puede generar cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica de modo que se una específicamente a un epítipo de DRD3.

“Anticuerpo” como se usa en la presente memoria descriptiva incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de la misma, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de DRD3. Normalmente se requieran al menos 6, 8, 10 ó 12 contiguos para formar un epítipo. No obstante, los epítopos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo al menos 15, 25 ó 50, aminoácidos. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de DRD3 se puede usar terapéuticamente, así como en ensayos inmunológicos, tales como transferencias de tipo Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunológicos conocidos en la técnica. Se pueden usar varios inmunoensayos para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. En la técnica se conocen bien numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos. Tales inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejo entre un inmunógeno y un anticuerpo que se une específicamente al inmunógeno de DRD3.

Normalmente, un anticuerpo que se une específicamente al DRD3 proporciona una señal de detección al menos 5, 10 ó 20 veces mayor que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usa en un ensayo inmunológico. Preferentemente, los anticuerpos que se unen específicamente a DRD3 no detectan otras proteínas en los ensayos inmunológicos y pueden inmunoprecipitar DRD3 a partir de la solución.

El DRD3 se puede usar para inmunizar un mamífero, como un ratón, una rata, un conejo, una cobaya, un mono o un ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, el DRD3 se puede conjugar con una proteína transportadora, como seroalbúmina bovina, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana. Dependiendo de la especie huésped se puede usar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Entre dichos adyuvantes se incluyen adyuvante de Freund, geles minerales (p. ej., hidróxido de aluminio) y sustancias de superficie activa (p. ej., lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, el BCG (bacilo de Calmette- Guérin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a DRD3 se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, entre otras, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma con células B humanas y la técnica del hibridoma-EBV [Roberge, (1995)].

Además se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos”, el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con la especificidad antigénica y la actividad biológica adecuadas. Anticuerpos monoclonales y otros se pueden también “humanizar” para prevenir que un paciente monte una respuesta inmunitaria frente al anticuerpo cuando éste se usa terapéuticamente. Dichos anticuerpos pueden tener una secuencia suficientemente similar a la de los anticuerpos humanos de modo que se usen directamente en terapia o puedan requerir la alteración de pocos residuos clave. Las diferencias en la secuencia entre anticuerpos de roedores y secuencias humanas se pueden minimizar sustituyendo los residuos que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida por sitio de residuos individuales o mediante el injerto de todas las regiones determinantes de la complementariedad. Los anticuerpos que se unen específicamente a DRD3 pueden contener sitios de unión al antígeno, que se humanizan parcial o completamente, tal y como se describe en el documento U.S. 5.565.332.

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla se pueden adaptar usando procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a DRD3. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, se pueden generar mediante arrastre de cadena a partir de las bibliotecas aleatorias combinatorias de inmunoglobulina. Los anticuerpos de cadena sencilla también se pueden construir usando un procedimiento de amplificación de ADN, tal como PCR, usando el ADN del hibridoma como molde. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono o biespecíficos y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se enseña la construcción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos y tetravalentes. Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena sencilla usando síntesis de nucleótidos manual o automática, clonación en un constructo de expresión usando procedimientos estándar de ADN recombinante e introducción en una célula para expresar la secuencia codificadora, tal y como se describe más adelante. Como alternativa se pueden producir anticuerpos de cadena sencilla directamente usando, por ejemplo tecnología de fago filamentoso.

También se pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a DRD3 mediante inducción de la producción *in vivo* de la población de linfocitos o mediante la detección selectiva de bibliotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específicos. En los procedimientos de la invención se pueden construir y usar terapéuticamente otros tipos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden construir anticuerpos quiméricos tal y como se ha descrito en el documento WO 93/03151. También se pueden preparar proteínas de unión derivadas de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multispecíficas, tales como los “diacuerpos” descritos en el documento WO 94/13804.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden purificar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar por afinidad mediante pase por una columna a la que está unido el DRD3. Después, los anticuerpos unidos se pueden eluir de la columna usando un tampón con una concentración de sal elevada.

Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de nucleótidos que son complementarias de una secuencia específica de ADN o ARN. Una vez que se han introducido en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con las secuencias naturales producidas por la célula, para formar complejos y bloquear la transcripción o la traducción. Preferentemente, un oligonucleótido antisentido tiene una longitud de al menos 11 nucleótidos, pero puede tener una longitud de al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 o más. También se pueden usar secuencias más largas. Las moléculas de oligonucleótidos antisentido se pueden proporcionar en un constructo de ADN e introducir en una célula tal y como se ha descrito antes, para disminuir el nivel de los productos del gen de DRD3 en la célula.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar manualmente o a través de un sintetizador automático mediante la unión covalente del extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces internucleotídicos que no son fosfodiéster tales como alquifosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquifosfonotioatos, alquifosfonatos, fosfoamidatos, ésteres fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres carboximetílicos, carbonatos y triésteres de fosfato.

Se pueden obtener modificaciones de la expresión génica de DRD3 mediante el diseño de oligonucleótidos antisentido que formarán duplexos del control, 5' o regiones reguladoras del gen DRD3. Se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, por ejemplo entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio. De igual forma se puede conseguir la inhibición usando metodología de apareamiento de bases en "triple hélice". El apareamiento en triple hélice es útil porque causa inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrir suficientemente para la unión de las polimerasas, factores de transcripción o chaperonas. En la literatura se han descrito avances terapéuticos usando ADN de triple hélice [Nicholls, (1993)]. También se puede diseñar un oligonucleótido antisentido para bloquear la traducción del ARNm mediante la prevención de la unión del transcrito a los ribosomas.

No se necesita una complementariedad precisa para la formación con éxito del complejo entre un oligonucleótido antisentido y la secuencia complementaria de un polinucleótido de DRD3. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, ó 5 o más tiras de nucleótidos contiguos que son exactamente complementarios a un polinucleótido de DRD3, cada uno separado por una tira de nucleótidos contiguos que no son complementarios a los nucleótidos de DRD3 adyacentes, puede proporcionar suficiente especificidad diana para ARNm de DRD3. Preferentemente, cada tira de nucleótidos contiguos complementarios tiene una longitud de al menos 4, 5, 6, 7 ó 8 o más nucleótidos. Las secuencias intermedias no complementarias tienen una longitud de, preferentemente, 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos. Un experto en la técnica puede usar fácilmente el punto de fusión calculado de una par antisentido-sentido para determinar el grado de falta de coincidencia que será tolerado entre un oligonucleótido antisentido concreto y una secuencia polinucleotídica de DRD3 concreta. Los oligonucleótidos antisentido se pueden modificar sin que ello afecte a su capacidad para hibridar a un polinucleótido de DRD3. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno o ambos extremos de la molécula antisentido. Por ejemplo, los enlaces fosfato entre nucleósidos se pueden modificar mediante la adición de restos colesterilo o diamina con un número variable de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. Las bases y/o azúcares modificados, como arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' en el que el grupo 3' hidroxilo o el grupo 5' fosfato están sustituidos, también se pueden emplear en un oligonucleótido antisentido modificado. Estos oligonucleótidos modificados se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica [Uhlmann, (1987)]. Las ribozimas se pueden usar para inhibir la función génica mediante la escisión de una secuencia de ARN tal y como se conoce en la técnica. El mecanismo de la acción de las ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguida por escisión endonucleolítica. Entre los ejemplos se incluyen moléculas de ribozima con motivo en cabeza de martillo sometidas a ingeniería, que se pueden catalizar específicamente y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias nucleotídicas específicas. La secuencia codificadora de un polinucleótido de DRD3 se puede usar para generar ribozimas que se unirán específicamente al ARNm transcrito a partir de un polinucleótido de DRD3. En la técnica se han desarrollado y descrito procedimientos para diseñar u construir ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans de un modo altamente específico de secuencia. Por ejemplo la actividad de escisión de las ribozimas puede dirigirse a ARN específicos mediante ingeniería de una pequeña región de "hibridación" en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria al ARN diana y, por tanto, hibrida específicamente con el ARN diana.

Se pueden identificar sitios específicos de escisión por ribozima dentro de un ARN de DRD3 diana mediante barrido de la molécula diana para buscar sitios de escisión por ribozimas que incluyan las secuencias siguientes: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las cortas secuencias de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región de ARN diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar características estructurales secundarias que pueden convertir la diana en inoperable. La idoneidad de los ARN de DRD3 diana también se puede evaluar mediante el análisis de accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando ensayos de protección de ribonucleasa. Las secuencias nucleotídicas que se muestran en la SEC ID N° 1 y su complementaria proporcionan fuentes de secuencias con regiones de hibridación adecuadas. Las secuencias de complementariedad más largas se pueden usar para incrementar la afinidad de la secuencia de hibridación para la diana.

Las regiones de hibridación y de escisión de la ribozima pueden estar íntegramente relacionadas de modo que, tras la hibridación al ARN diana mediante las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir la diana.

Las ribozimas se pueden introducir en células como parte de un constructo de ADN. Los procedimientos mecánicos, como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación o precipitación con fosfato cálcico, se pueden usar para introducir un constructo de ADN que contenga ribozima en las células en las que se desea disminuir la expresión de DRD3. Como alternativa, si se desea que las células conserven de forma estable el constructo de ADN, el constructo se puede suministrar en un plásmido y mantener como elemento separado o integrado en el genoma de las células, como se conoce en la técnica. Un constructo de ADN codificador de ribozima puede incluir elementos reguladores de la transcripción, como un elemento promotor, un potenciador o elemento UAS y una señal de terminación de la transcripción, para controlar la transcripción de ribozimas en las células (documento U.S. 5.641.673). Las ribozimas también se pueden someter a ingeniería para proporcionar un nivel adicional de regulación, de modo que la destrucción de ARNm sólo se produzca cuando en las células se induzcan el gen de una ribozima como de una diana.

Detección selectiva/Ensayos de detección selectiva

Reguladores

Los reguladores, tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, se refieren a compuestos que afectan a la actividad del DRD3 *in vivo* y/o *in vitro*. Los reguladores pueden ser agonistas y antagonistas de un polipéptido de DRD3 y pueden ser compuestos que ejercen su efecto sobre la actividad de DRD3 a través de la expresión, mediante modificaciones postraduccionales o por otros medios. Los agonistas de DRD3 son moléculas que, cuando se unen a DRD3, incrementan o prolongan la actividad de DRD3. Los agonistas de DRD3 incluyen proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, moléculas pequeñas y cualquier otra molécula que active el DRD3. Los antagonistas de DRD3 son moléculas que, cuando se unen a DRD3, disminuyen la cantidad o la duración de la actividad de DRD3. Los antagonistas de DRD3 incluyen proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, anticuerpos, moléculas pequeñas y cualquier otra molécula que disminuya la actividad de DRD3.

El término “modular”, tal y como aparece en la presente memoria descriptiva, se refiere a un cambio en la actividad del polipéptido de DRD3. Por ejemplo, la modulación puede causar un incremento o una disminución de la actividad de la proteína, características de unión o cualquier otra propiedad biológica, funcional o inmunológica de DRD3.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “unión específica” o “que se une específicamente” se refieren a dicha interacción entre una proteína o un péptido y un agonista, un anticuerpo o un antagonista. La interacción depende de la presencia de una estructura concreta de la proteína reconocida por la molécula de unión (es decir, el determinante antigénico o el epítipo). Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de un polipéptido que contiene el epítipo A o la presencia de A libre sin marcar en una reacción que contiene A libre marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado que se une al anticuerpo.

La invención proporciona procedimientos (también denominados en la presente memoria descriptiva “ensayos de detección selectiva” para identificar compuestos que se pueden usar para el tratamiento de insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas.

Los procedimientos suponen la identificación de los compuestos o agentes candidatos o de prueba (p. ej., péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otras moléculas) que se unen a DRD3 y/o que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad biológica de DRD3 o su expresión, y, después, la determinación de cual de estos compuestos tiene un efecto sobre los síntomas o enfermedades en relación con la insuficiencia cardíaca, las enfermedades isquémicas del corazón, el infarto de miocardio y las enfermedades vasculares periféricas en un ensayo *in vivo*.

Los compuestos o agentes candidato o de prueba que se unen a DRD3 y/o que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad o la expresión de DRD3 se identifican en ensayos que emplean células que expresan DRD3 sobre la superficie de la célula (ensayos basados en células) o en ensayos con DRD3 aislado (ensayos sin células). Los diversos ensayos pueden emplear una serie de variantes de DRD3 (p. ej., DRD3 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de DRD3 o una proteína de fusión que incluya todo o una porción de DRD3). Además, el DRD3 puede derivar de cualquier especie de mamífero adecuada (p. ej., DRD3 humano, DRD3 de rata o DRD3 murino). El ensayo puede ser un ensayo de unión que suponga la medición directa o indirecta de la unión a DRD3 de un compuesto de prueba o de un ligando conocido de DRD3. El ensayo también puede ser un ensayo de actividad que suponga la medición directa o indirecta de la actividad de DRD3. El ensayo también puede ser un ensayo de expresión que suponga la medición directa o indirecta de la expresión de ARNm de DRD3 o de la proteína DRD3. Los diversos ensayos de detección selectiva se combinan con un ensayo *in vivo* que supone medir el efecto del compuesto de prueba sobre la insuficiencia cardíaca, las enfermedades isquémicas del corazón, el infarto de miocardio y las enfermedades vasculares periféricas.

En una forma de realización, la invención proporciona ensayos para la detección selectiva de compuestos candidatos o de prueba que se unen o modulan la actividad de una forma unida a la membrana (expresada en la superficie de la célula) de DRD3. Tales ensayos pueden emplear el DRD3 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de DRD3 o una proteína de fusión que incluye todo o una porción de DRD3. Tal y como se describe con mayor

detalle más adelante, el compuesto de prueba se puede obtener por cualquier medio adecuado, por ejemplo a partir de bibliotecas de compuestos convencionales. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para unirse a una forma unida a la membrana de DRD3 se puede conseguir, por ejemplo, mediante el acoplamiento del compuesto de prueba con un marcador radioisótopo o enzimático de forma que dicha unión del compuesto de prueba a la célula que expresa DRD3 se pueda medir mediante la detección del compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, el compuesto de prueba se puede marcar con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H , bien directa o indirectamente, y el radioisótopo detectado mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento por centelleo. Como alternativa, el compuesto de prueba se puede marcar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático se puede detectar mediante la determinación de la conversión de un sustrato adecuado en el producto.

En un formato de unión competitiva, el ensayo comprende poner en contacto la célula que expresa DRD3 con un compuesto conocido que se une a DRD3 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla del ensayo con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con la célula que expresa DRD3, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con la célula que expresa DRD3 comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse, preferentemente, a la célula que expresa DRD3 en comparación con el compuesto conocido.

En otra forma de realización, el ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que expresa una forma unida a la membrana de DRD3 (p. ej., DRD3 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de DRD3, o una proteína de fusión que incluye todo o una porción de DRD3) expresada en la superficie de la célula con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de la forma unida a la membrana de DRD3. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de la forma unida a la membrana de DRD3 se puede conseguir mediante cualquier procedimiento adecuado para medir la actividad de DRD3, por ejemplo cualquier procedimiento adecuado para medir la actividad de un receptor acoplado a proteína G u otro receptor de siete dominios transmembrana (descrito con más detalle más adelante). La actividad de un receptor de siete dominios transmembrana se puede medir de numerosas formas, no todas ellas adecuadas para cualquier receptor dado. Entre las medidas de la actividad se encuentran: Alteración de la concentración intracelular de Ca^{2+} , activación de la fosfolipasa C, alteración de la concentración intracelular de inositol trifosfato (IP_3), alteración de la concentración intracelular de diacilglicerol (DAG) y la alteración de la concentración intracelular de adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc).

La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de DRD3 se puede conseguir, por ejemplo, determinando la capacidad de DRD3 para unirse o interactuar con la molécula diana. La molécula diana puede ser una molécula con la cual DRD3 se une o interactúa en la naturaleza, por ejemplo una molécula en la superficie de una célula que exprese DRD2, una molécula en la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada con la superficie interna de una membrana celular o una molécula citoplasmática. La molécula diana puede ser un componente de una vía de transducción de señal que facilita la transducción de una señal extracelular (p. ej., una señal generada mediante la unión de un ligando de DRD3, a través de la membrana y hacia el interior de la célula. La molécula de DRD3 diana puede ser, por ejemplo, una segunda proteína intracelular que tiene actividad catalítica o una proteína que facilita la asociación de las moléculas de señalización en 3' con DRD3.

La determinación de la capacidad del DRD3 para unirse o interactuar con una molécula diana se puede conseguir por uno de los procedimientos descritos en lo que antecede para determinar la unión directa. En una forma de realización, la determinación de la capacidad de un polipéptido de la invención para unirse o interactuar con una molécula diana se puede conseguir determinando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana se puede determinar mediante la detección de la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (p. ej., Ca^{2+} , diacilglicerol, IP_3 , etc.), la detección de la actividad catalítica/enzimática de la diana sobre el sustrato adecuado, la detección de la inducción de un gen indicador (p. ej., un elemento regulador que responde a un polipéptido de la invención unido operablemente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo luciferasa) o la detección de una respuesta celular.

La presente invención también incluye ensayos sin células. Tales ensayos implican poner en contacto una forma de DRD3 (p. ej., DRD3 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de DRD3 o una proteína de fusión que comprende todo o una porción de DRD3) con un compuesto de prueba y la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para unirse a DRD3. La unión del compuesto de prueba a DRD3 puede determinarse directamente o indirectamente como se ha descrito en lo que antecede. En una forma de realización, el ensayo implica poner en contacto DRD3 con un compuesto conocido que se une a DRD3 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla del ensayo con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con DRD3, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con DRD3 comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse, preferentemente, a DRD3 en comparación con el compuesto conocido.

Los ensayos sin células de la presente invención puede emplearse para el uso de una forma de DRD3 unida a la membrana o un fragmento soluble del mismo. En el caso de ensayos sin células que comprenden la forma unida a la membrana del polipéptido, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de modo que la forma unida a la membrana del polipéptido se mantenga en solución. Ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen, entre otros, de-

tergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Tritón X-100, Tritón X-114, Thesit, Isotridecipoli(etilenglicoléter)n, sulfanoato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfanoato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO) o sulfanoato de N-dodecil=N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

5 En varias formas de realización de los procedimientos de ensayo de la presente invención descritos en lo que antecede, puede ser deseable inmovilizar el DRD3 (o una molécula diana de DRD3) para facilitar la separación de las formas en complejo de las que no están en complejo de una o ambas proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a DRD3, o la interacción de DRD3 con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede conseguirse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una forma de realización se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) o las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa se pueden adsorber en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical; 10 St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivadas de glutatión que, después, se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y la proteína diana no adsorbida o DRD3, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación del complejo (p. ej., a condiciones fisiológicas para sales y pH). Tras la incubación, las perlas o los pocillos de las placas de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido y se mide la formación del complejo bien directa o indirectamente, por ejemplo, tal y como se ha descrito en lo que antecede. 20 Como alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz y el nivel de unión o actividad de DRD3 se puede determinar usando técnicas estándar.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices también se pueden usar en los ensayos de detección selectiva de la invención. Por ejemplo, el DRD3 o su molécula diana se pueden inmovilizar utilizando la conjugación de 25 biotina y estreptavidina. El polipéptido biotinilado de la invención o las moléculas diana se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, Ill.), e inmovilizar en los pocillos de placas recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos reactivos con DRD3 o las moléculas diana pero que no interfieren con la unión del polipéptido de la invención a su molécula diana se pueden derivar a los pocillos de la placa y la diana o el polipéptido 30 de la invención no unido queda atrapada en los pocillos mediante conjugación con el anticuerpo. Los procedimientos para detectar tales complejos, además de los descritos en lo que antecede para los complejos inmovilizados-GST incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con DRD3 o la molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas que dependen de detectar una actividad enzimática asociada con DRD3 o con la molécula diana.

35 El ensayo de detección selectiva también puede implicar la monitorización de la expresión de DRD3. Por ejemplo, los reguladores de la expresión de DRD3 se pueden identificar en un procedimiento en el que una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión de la proteína o el ARNm de DRD3 en la célula. El nivel de expresión de la proteína o ARNm de DRD3 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de la proteína o ARNm de DRD3 en ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato 40 puede identificarse como un regulador de la expresión de DRD3 según en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de la proteína DRD3 o el ARNm de la proteína es superior (estadística y significativamente superior) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como estimulador de la expresión de la proteína o el ARNm de DRD3. Por ejemplo, cuando la expresión de la proteína DRD3 o el ARNm de la proteína es superior (estadística y significativamente superior) en presencia del compuesto candidato que en su 45 ausencia, el compuesto candidato se identifica como estimulador de la expresión de la proteína o el ARNm de DRD3. El nivel de expresión de la proteína o el ARNm de DRD3 en las células se puede determinar mediante procedimientos que se describen más adelante.

Ensayos de unión

50 Para los ensayos de unión, el compuesto de prueba es, preferentemente, una molécula pequeña que se une y ocupa el sitio activo del polipéptido de DRD3, lo que convierte al sitio de unión al ligando en inaccesible al sustrato de modo que se previene la actividad biológica normal. Ejemplos de tales moléculas pequeñas incluyen, entre otros, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos. Posibles ligandos que se unen a un polipéptido de la invención incluyen, 55 entre otros, los ligandos naturales de GPCR de DRD3 conocidos y análogos o derivados de los mismos.

En los ensayos de unión, el compuesto de prueba o el polipéptido de DRD3 pueden comprender un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente, radioisotópico, quimioluminiscente o enzimático, tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa. La detección de un compuesto de prueba que está unido al polipéptido de 60 DRD3 se puede conseguir mediante, por ejemplo, recuento directo de radioemisión, mediante recuento de centelleo o mediante la determinación de la conversión de un sustrato adecuado en un producto detectable. Como alternativa, la unión de un compuesto de prueba a un polipéptido de DRD3 se puede determinar sin marcar ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de prueba a un polipéptido de DRD3. Un microfisiómetro (p. ej., Cytosensor™) es un instrumento analítico que mide el índice al cual 65 una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico dirigible por luz (LAPS). Los cambios en este índice de acidificación se pueden usar como indicador de la interacción entre un compuesto de prueba y DRD3 [Haseloff, (1988)].

La determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para unirse a DRD3 también se puede conseguir usando una tecnología tal como Análisis de interacción bimolecular en tiempo real (BIA) [McConnell, (1992); Sjölander, (1991)]. El BIA es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcaje de ninguno de los interactuantes (p. ej., BIAcore™). Los cambios en el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR) se pueden usar como indicación de las reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

En otro aspecto más de la invención, un polipéptido similar a DRD3 se puede usar como “proteína cebo” en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos [Szabo, (1995); documento U.S. 5.283.317], para identificar otras proteínas que se unen, o interaccionan, a DRD3 y modulan su actividad.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consiste en dominios separables de unión a ADN y de activación. Brevemente, el ensayo utiliza dos constructos diferentes de ADN. Por ejemplo, en un constructor, el polinucleótido que codifica DRD3 se puede condensar a un polinucleótido que codifica el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (p. ej., GAL-4). En otro constructo, una secuencia de ADN que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) se puede condensar con un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y “presa” pueden interaccionar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de unión y de activación a ADN de factor de transcripción se llevan a una proximidad estrecha. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (p. ej., LacZ), que está operablemente unido a un sitio regulador de la transcripción respondiendo al factor de transcripción. La expresión del gen indicador se puede detectar y las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional se pueden aislar y usar para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interacciona con el DRD3.

Puede ser deseable inmovilizar el DRD3 (o el polinucleótido) o el compuesto de prueba para facilitar la separación de la forma unida de las formas no unidas de uno o ambos interactuantes, así como para acomodar la automatización del ensayo. Por tanto, el polipéptido similar a DRD3 (o el polinucleótido) o el compuesto de prueba se pueden unir a un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, entre otros, portaobjetos de vidrio o de plástico, placas de cultivo tisular, pocillos de microtitulación, astillas de silicio o partículas tales como perlas (incluidas, entre otras, perlas de látex, poliestireno o vidrio). Cualquier procedimiento conocido en la técnica se puede usar para fijar el polipéptido similar a DRD3 (o el polinucleótido) o el compuesto de prueba a un soporte sólido, incluido el uso de enlaces covalentes y no covalentes, absorción pasiva, o pares de restos de unión unidos respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o al compuesto de prueba y el soporte sólido. Preferentemente, los compuestos de prueba están unidos al soporte sólido en una matriz, de modo que se puede rastrear la localización de los compuestos de prueba individuales. La unión de un compuesto de prueba a DRD3 (o un polinucleótido que codifica DRD3) se puede conseguir en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga.

En una forma de realización, DRD3 es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite la unión de DRD3 a un soporte sólido. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa se pueden adsorber en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical; St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivadas de glutatión que, después, se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y el DRD3 no adsorbido; la mezcla se incuba después en conducciones que conducen a la formación del complejo (p. ej., en condiciones fisiológicas de sales y pH). Tras la incubación, las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar todos los componentes no unidos. La unión de los interactuantes se puede determinar bien directa o indirectamente tal y como se ha descrito en lo que antecede. Como alternativa, los complejos se pueden disociar del soporte sólido antes de determinar la unión.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas o polinucleótidos sobre un soporte sólido también se pueden usar en los ensayos de detección selectiva de la invención. Por ejemplo, DRD3 (o un polinucleótido que codifica DRD3) o un compuesto de prueba se pueden inmovilizar utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. El DRD3 biotinilado (o un polinucleótido que codifica DRD3 biotinilado) o los compuestos de prueba se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, Ill.), e inmovilizar en los pocillos de placas recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos que se unen específicamente a DRD3, al polinucleótido o a un compuesto de prueba, pero que no interfieren con un sitio de unión deseado, tal como el sitio activo de DRD3, se pueden derivar a los pocillos de la placa. La diana o la proteína no unida pueden quedar atrapados en los pocillos mediante conjugación al anticuerpo.

Entre los procedimientos para detectar tales complejos, además de los descritos en lo que antecede para los complejos inmovilizados-GST, se incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de DRD3 o al compuesto de prueba, ensayos ligados a enzimas que dependen de la detección de una actividad del polipéptido de DRD3 y electroforesis en gel SDS en condiciones no reductoras.

La detección selectiva de los compuestos de prueba que se unen a un polipéptido o polinucleótido de DRD3 también se llevan a cabo en una célula intacta. En un sistema de ensayo basado en células se puede usar cualquier célula que comprende un polipéptido o polinucleótido de DRD3. Un polinucleótido de DRD3 puede ser natural en la célula o puede introducirse usando técnicas tales como las descritas en lo que antecede. La unión del compuesto de prueba a DRD3 o a un polinucleótido que codifica DRD3 se determina tal como se ha descrito en lo que antecede.

Ensayos funcionales

Los compuestos de prueba se pueden analizar para determinar la capacidad para incrementar o disminuir la actividad de DRD3 de un polipéptido de DRD3. La actividad DRD3 se puede medir, por ejemplo, usando procedimientos descritos en los ejemplos específicos que se indican a continuación. La actividad DRD3 se puede medir después de poner en contacto DRD3 purificado, una preparación de membrana celular o una célula intacta con un compuesto de prueba. Un compuesto de prueba que disminuye la actividad de DRD3 en al menos un 10%, preferentemente aproximadamente 50%, más preferentemente aproximadamente 75, 90, o 100%, se identifica como un posible agente para disminuir la actividad de DRD3. Un compuesto de prueba que aumenta la actividad de DRD3 en al menos un 10%, preferentemente aproximadamente 50%, más preferentemente aproximadamente 75, 90, o 100%, se identifica como un posible agente para incrementar la actividad de DRD3.

Uno de tales procedimientos de detección selectiva implica el uso de melanóforos que se transfeccionan para expresar DRD3. Tal técnica de detección selectiva se describe en el documento PCT WO 92/01810 publicado el 6 de febrero de 1992. Por tanto, por ejemplo, dicho ensayo se puede emplear para la detección selectiva de un compuesto que inhibe la activación del polipéptido receptor de la presente invención poniendo en contacto las células de melanóforo que codifican el receptor con el ligando del receptor y un compuesto que se va a someter a detección selectiva. La inhibición de la señal generada por el ligando indica que un compuesto es un potencial antagonista del receptor, es decir inhibe la activación del receptor. El filtro puede emplearse para identificar un compuesto que activa el receptor poniendo en contacto dichas células con compuestos que se van a someter a detección selectiva y determinando si cada compuesto genera una señal, es decir activa el receptor.

Entre otras técnicas de detección selectiva se incluyen el uso de células que expresan DRD3 (por ejemplo, células CHO transfeccionadas) en un sistema que mide los cambios en el pH extracelular causados por la activación del receptor [Iwabuchi, (1993)]. Por ejemplo, los compuestos se pueden poner en contacto con una célula que expresa el polipéptido receptor de la presente invención y una respuesta de segundo mensajero, por ejemplo la transducción de señal o los cambios del pH, se pueden medir para determinar si el posible compuesto activa o inhibe el receptor. Otra de tales técnicas de detección selectiva implica introducir ARN que codifica DRD3 en oocitos de *Xenopus* para expresar transitoriamente el receptor. A continuación, los oocitos con el receptor se pueden poner en contacto con el ligando del receptor y un compuesto que se va a someter a detección selectiva, seguido por la detección de inhibición o activación de una señal de calcio en el caso de la detección selectiva de compuestos que se piensa que inhiben la activación del receptor.

Otra de tales técnicas de detección selectiva implica expresar DRD3 en células en las que el receptor está unido a una fosfolipasa C o D. Tales células incluyen células endoteliales, células de músculo liso, células renales embrionarias, etc. La detección selectiva puede conseguirse tal y como se ha descrito en lo que antecede mediante cuantificación del grado de activación del receptor a partir de los cambios en la actividad fosfolipasa.

Expresión génica

En otra forma de realización se identifican los compuestos de prueba que incrementan o disminuyen la expresión génica de DRD3. Como se usa en la presente memoria descriptiva el término "correlaciona con la expresión de un polinucleótido" indica que la detección de la presencia de ácidos nucleicos, la misma o relacionada con una secuencia de ácido nucleico que codifica DRD3, mediante análisis de tipo Northern o PCR en tiempo real es indicativa de la presencia en la muestra de ácidos nucleicos que codifican DRD3 y, por tanto, correlaciona con la expresión del transcrito del polinucleótido que codifica DRD3. El término "micromatriz", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una matriz de distintos polinucleótidos u oligonucleótidos dispuestos en un sustrato, como papel, nylon o cualquier otro tipo de membrana, filtro, chip, portaobjetos de vidrio, o cualquier otro soporte sólido. Se pone en contacto un polinucleótido de DRD3 con un compuesto de prueba y se determina la expresión de un ARN o un producto polipeptídico del polinucleótido de DRD3. El nivel de expresión del polipéptido o ARNm adecuado en presencia del compuesto de prueba se compara con el nivel de expresión del polipéptido o ARNm en ausencia del compuesto de prueba. El compuesto de prueba puede identificarse como un regulador de la expresión según en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de ARNm o del polipéptido es mayor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como estimulador o potenciador de la expresión del ARNm o del polipéptido. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm o del polipéptido es menor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como inhibidor de la expresión del ARNm o del polipéptido.

El nivel de expresión de ARNm o de polipéptido de DRD3 en las células se puede determinar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica para detectar ARNm o el polipéptido. Se pueden usar procedimientos cualitativos o cuantitativos. La presencia de productos polipeptídicos del polinucleótido de DRD3 se puede determinar, por ejemplo, usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluidos métodos inmunoquímicos tales como radioinmunoensayo, transferencia de tipo western e inmunohistoquímica. Como alternativa, la síntesis del polipéptido se puede determinar *in vivo*, en un cultivo celular o en un sistema de traducción *in vitro* mediante la detección de la incorporación de aminoácidos marcados en DRD3.

Tal detección selectiva se puede llevar a cabo en un sistema de ensayo sin células o en una célula intacta. En un sistema de ensayo basado en células se puede usar cualquier célula que exprese un polinucleótido de DRD3. El

polinucleótido de DRD3 puede ser natural en la célula o puede introducirse usando técnicas tales como las descritas en lo que antecede. Se puede usar un cultivo primario o una línea celular establecida.

Compuestos de prueba

Los compuestos de prueba adecuados para usar en los ensayos de detección selectiva se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo bibliotecas de compuestos convencionales. Los compuestos de prueba también se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en procedimientos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluidos: bibliotecas biológicas, bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas dirigibles espacialmente; procedimientos de biblioteca sintética que requiere desconvolución; el procedimiento de biblioteca de “una perla un compuesto”, y procedimientos con bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica está limitado a bibliotecas peptídicas, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de oligómeros peptídicos, no peptídicos o de moléculas pequeñas de compuestos [Lam, (1997)]. Ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica. Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar en solución o en perlas, bacterias, esporas, plásmidos o fagos.

Indicaciones terapéuticas y procedimientos

El presente solicitante ha descubierto que el DRD3 se expresa en diversos tejidos humanos.

Enfermedades cardiovasculares

Insuficiencia cardíaca se define como un estado fisiopatológico en el que una anomalía de la función cardíaca es responsable del fallo de bombeo de sangre del corazón a una velocidad proporcionar a lo que requiere el tejido metabolizante. Incluye todas las formas de fallos de bombeo, tales como gasto cardíaco elevado y gasto cardíaco bajo, agudo y crónico, lateral derecho o lateral izquierdo, sistólico o diastólico, independiente de la causa subyacente.

Generalmente, el infarto de miocardio (IM) está causado por una brusca disminución del flujo de sangre coronaria que sigue a una oclusión trombótica de una arteria coronaria previamente estrechada por arterioesclerosis. Se incluye la profilaxis de IM (prevención primaria y secundaria), así como el tratamiento agudo del IM y la prevención de complicaciones.

Las enfermedades isquémicas son afecciones en las que el flujo coronario está restringido, lo que tiene como resultado una perfusión inadecuada para cumplir el requisito miocárdico de oxígeno. Este grupo de enfermedades incluye angina estable, angina inestable e isquemia asintomática.

Las enfermedades vasculares periféricas se definen como enfermedades vasculares en las que el flujo arterial y/o venoso se reduce, lo que tiene como resultado un desequilibrio entre la irrigación sanguínea y la demanda tisular de oxígeno. Incluye enfermedad oclusiva arterial periférica crónica (EOAP), trombosis arterial aguda y embolia, trastornos vasculares inflamatorios, fenómeno de Raynaud y trastornos venosos.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen, entre otras, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas del corazón y enfermedades vasculares periféricas.

El DRD3 humano tiene una expresión elevada en los siguientes tejidos cardiovasculares relacionados: aurícula del corazón (izquierda), aorta, arteria, arteria coronaria, vena, células HUVEC. Además, la actividad del DRD3 humano se puede modular para tratar las enfermedades cardiovasculares mencionadas anteriormente.

Aplicaciones

La presente invención proporciona procedimientos profilácticos y terapéuticos para insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas.

El procedimiento regulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de DRD3. Un agente que modula la actividad puede ser un agente tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando natural conocido del polipéptido, un péptido, un peptidomimético o cualquier molécula pequeña. En una forma de realización, el agente estimula una o más de las actividades biológicas de DRD3. Ejemplos de tales agentes estimuladores incluyen el DRD3 activo y las moléculas de ácido nucleico que codifican una porción de DRD3. En otra forma de realización, el agente inhibe una o más de las actividades biológicas de DRD3. Ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido y anticuerpos. Estos procedimientos reguladores se pueden realizar *in vitro* (p. ej., mediante cultivo de la célula con el agente) o, como alternativa, *in vivo* (p. ej., mediante administración del agente a un sujeto.). Como tales, la presente invención proporciona procedimientos para tratar un individuo afectado por una enfermedad o trastorno caracterizado por una expresión no deseada actividad de DRD3 o una proteína en la vía de señalización de DRD3. En una forma de realización, el procedimiento implica administrar un agente como cualquier agente identificado o que se pueda identificar mediante un ensayo de detección selectiva tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, o una combinación de dichos agentes que modulan, regulan por aumento o regulan por disminución, la expresión

o la actividad de DRD3 o de cualquier proteína en la vía de señalización de DRD3. En otra forma de realización, el procedimiento implica administrar un regulador de DRD3 como terapia para compensar la expresión reducida o indeseablemente baja o la actividad de DRD3 o de una proteína en la vía de señalización de DRD3.

La estimulación de la actividad o la expresión de DRD3 es deseable en situaciones en las que la actividad o la expresión es anormalmente baja y en las que es probable que un incremento de la actividad tenga un efecto beneficioso. Por el contrario, la inhibición de la actividad o la expresión de DRD3 es deseable en situaciones en las que la actividad o la expresión de DRD3 es anormalmente elevada y en las que es probable que una disminución de la actividad tenga un efecto beneficioso.

Esta invención se ilustra además con los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como limitantes. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan en el presente documento por referencia.

Composiciones farmacéuticas

Esta invención además atañe a agentes nuevos identificados mediante los ensayos de detección selectiva descritos en lo que antecede y usos de los mismos para tratamientos tal y como se describe en la presente memoria descriptiva.

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos (también denominados en la presente memoria descriptiva “compuestos activos”) usados en la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Normalmente, dichas composiciones comprenden la molécula de ácido nucleico, la proteína o el anticuerpo y un transportador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria descriptiva, se pretende que “transportador farmacéuticamente aceptable” incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto cuando alguno de los medios o agentes convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

La invención incluye el uso de un polinucleótido o polipéptido de DRD3 o de un anticuerpo, una Ribocima o un oligonucleótido antisentido que regulan la actividad de un polipéptido de DRD3 para la preparación de una preparación farmacéutica útil en el tratamiento de insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio o enfermedades vasculares periféricas, así como procedimientos para preparar tales composiciones mediante combinación de uno o más de dichos reguladores y un transportados farmacéuticamente aceptable.

Un antagonista de DRD3 puede producirse usando procedimientos normalmente conocidos en la técnica. En particular, DRRD3 purificado se puede usar para producir anticuerpos o para la detección selectiva de bibliotecas de agentes farmacéuticos para identificar los que se unen específicamente a DRD3. También se pueden generar anticuerpos frente a DRD3 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos pueden incluir, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, Fragmentos Fab y fragmentos producidos mediante biblioteca de expresión de Fab. Especialmente preferidos para uso terapéutico son los anticuerpos neutralizantes tales como los que inhiben la formación de dímeros.

En otra forma de realización de la invención, los polinucleótidos que codifican DRD3 o cualquier fragmento o complemento de los mismos pueden usarse con fines terapéuticos. En un aspecto, el complemento del polinucleótido que codifica DRD3 puede usarse en situaciones en las que sería deseable bloquear la transcripción del ARNm. En particular, las células se pueden transformar con secuencias complementarias a los polinucleótidos que codifican DRD3. Por tanto, moléculas o fragmentos complementarios se pueden usar para modular la actividad de DRD3 o para conseguir la regulación de la función génica. Dicha tecnología es bien conocida en la técnica y oligonucleótidos sentido o antisentido o fragmentos más largos puede diseñarse a partir de diversas localizaciones a lo largo de las regiones codificadoras o control de las secuencias que codifican DRD3.

Para la liberación de secuencias nucleotídicas en el órgano, tejido o población celular diana se pueden usar vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus o virus del herpes o vaccinia, o de varios plásmidos bacterianos. Para construir vectores que expresen una secuencia de ácido nucleico complementaria a los polinucleótidos del gen que codifica DRD3 se pueden usar procedimientos que son bien conocidos para los expertos en la técnica. Estas técnicas se describen en, por ejemplo, [Scott y Smith (1990) Science 249:386-390].

Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos en lo que antecede pueden aplicarse a cualquier sujeto que necesite tal terapia incluidos, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, más preferentemente, seres humanos.

Se describe la administración de una composición farmacéutica que contiene DRD3 junto con un transportador farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos tratados en lo que antecede. Tales composiciones farmacéuticas pueden consistir en DRD3, anticuerpos frente a DRD3 y miméticos, agonistas, antagonistas o inhibidores de DRD3. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal

como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier transportador farmacéutico estéril, biocompatible, incluidos, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solas o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

Se formula una composición farmacéutica de la invención de modo que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: Un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución fisiológica salina, agua bacteriostática, Cremophor EMTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo (p. ej., un polipéptido o un anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar.

Normalmente, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un transportador comestible. Se pueden introducir en cápsulas de gelatina o comprimirse en forma de comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un transportador fluido para usar como colutorio, en las que el compuesto en el transportador fluido se aplica por vía oral y se tritura y expectora o traga.

Agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de naturaleza similar: un ligante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz, un lubricante tal como estearato de magnesio, o esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato metílico o sabor a naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se liberan en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un recipiente o dispensado presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medio transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes adecuados para atravesar la barrera. Normalmente dichos penetrantes se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, salvas, geles o cremas, como en general se conocen en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para liberación rectal.

En una forma de realización, los compuestos activos se preparan con transportadores que protegerán al compuesto frente a la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de liberación microencapsulada. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) también se pueden usar transportadores farmacéuticamente aceptables. Éstos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo como se describe en el documento U.S. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a unidades físicamente pequeñas adaptadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención están dictadas y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se debe conseguir y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Otra técnica que se puede usar para la detección selectiva del fármaco proporciona un alto rendimiento de la detección selectiva de compuestos que poseen una afinidad de unión adecuada por la proteína de interés, tal como se describe en la solicitud PCT publicada WO84/03564. En este procedimiento se sintetizan grandes números de pequeños compuestos de prueba diferentes sobre un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos se hacen reaccionar con DRD3, o fragmentos del mismo, y se lavan. A continuación, el DRD3 unido se detecta mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El DRD3 purificado también se puede recubrir directamente en placas para usar en las técnicas de detección selectiva del fármaco citado anteriormente. Como alternativa se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en un soporte sólido.

En otra forma de realización, se pueden usar ensayos competitivos de detección selectiva de fármaco en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a DRD3 compiten específicamente con un compuesto de prueba por la unión al DRD3. De este modo, se pueden usar anticuerpos para detectar la presencia de algún péptido que compara uno o más determinantes antigénicos con DRD3.

Determinación de una dosis terapéuticamente eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo que incrementa o disminuye la actividad de DRD3 en relación con la actividad de DRD3 que se produce en ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente bien en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

La eficacia terapéutica y la toxicidad, p. ej., DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. El cociente entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse en forma del cociente DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en dichas composiciones está, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. El médico determinará la dosificación exacta a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere el tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del ingrediente activo o para mantener el efecto deseado. Entre los factores que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento de la formulación concreta.

Las cantidades de dosificación normales pueden variar de 0,1 microgramos a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, en función de la vía de administración. En la literatura se proporcionan guías sobre las dosificaciones y procedimientos de liberación concretos y, en general, están disponibles para los facultativos en la técnica. Los expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De igual forma, la liberación de polinucleótidos o polipéptidos será específica de células, condiciones,

localizaciones etc. particulares. Si el reactivo es un anticuerpo de cadena sencilla, se pueden construir polinucleótidos que codifican el anticuerpo e introducir en una célula *ex vivo* o *in vivo* usando técnicas bien establecidas, incluidas, entre otras, transferencia de ADN mediada por transferrina-policación, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de perlas de látex recubiertas por ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación, “disparo de gen” y transfección mediada por fosfato cálcico o DEAE.

Si el producto de expresión es ARNm, el reactivo es, preferentemente un oligonucleótido antisentido o un ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos antisentido o ribozimas pueden introducirse en las células mediante diversos procedimientos, tal y como se ha descrito en lo que antecede. Preferentemente, un reactivo reduce la expresión del gen de DRD3 o la actividad de DRD3 en al menos un 10%, preferentemente aproximadamente 50%, más preferentemente aproximadamente 75, 90, o 100%, en relación con la ausencia del reactivo. La eficacia del mecanismo escogido para disminuir el nivel de expresión del gen de DRD3 o la actividad de DRD3 se puede evaluar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, como hibridación de sondas nucleotídicas con ARNm específico de DRD3, RT-PCR cuantitativa, detección inmunológica de DRD3 o medición de la actividad de DRD3.

En cualquiera de las formas de realización descritas en lo que antecede, cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos adecuados. Un experto ordinario en la técnica puede realizar la selección de los agentes adecuados para usar en terapia de combinación, de acuerdo con principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos en lo que antecede. Usando este enfoque, se puede conseguir eficacia terapéutica con dosificaciones menores de cada agente, de modo que se reduce el potencial de efectos secundarios adversos. Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos en lo que antecede pueden aplicarse a cualquier sujeto que necesite tal terapia incluidos, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, más preferentemente, seres humanos.

Las moléculas de ácido nucleico usadas en la invención son las moléculas de ácido nucleico que están contenidas en un grupo de moléculas de ácido nucleico consistente en (i) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 3, (ii) moléculas de ácido nucleico que comprenden la SEC ID N° 1, (iii) moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de SEC ID N° 1, (iv) moléculas de ácido nucleico cuya hebra complementaria hibrida en condiciones estrictas con una molécula de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii) y (v) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético, en el que el polipéptido codificado por dicha molécula de ácido nucleico tiene actividad DRD3.

Los polipéptidos usados en la invención son los polipéptidos que están contenidos en un grupo de polipéptidos consistentes en (i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEC ID N° 2, (ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N° 2, (iii) polipéptidos codificados por moléculas de ácido nucleico de la invención y (iv) polipéptidos que muestran una homología de al menos un 99%, 98%, 95%, 90% ó 80% con un polipéptido de (i), (ii), o (iii), en los que dicho polipéptido purificado tiene actividad DRD3.

Un objeto de la invención es un procedimiento de detección selectiva de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, compuesto por las etapas de (i) poner en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido de DRD3, (ii) detectar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho polipéptido de DRD3. Por ejemplo, compuestos que se unen al polipéptido de DRD3 se identifican como posibles agentes terapéuticos para tal enfermedad.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de detección selectiva de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende las etapas de (i) determinar la actividad de un polipéptido de DRD3 a una cierta concentración de un compuesto de prueba o en ausencia de dicho compuesto de prueba, (ii) determinar la actividad de dicho polipéptido a una concentración diferente de dicho compuesto de prueba. Por ejemplo, compuestos que conducen a una diferencia en la actividad del polipéptido de DRD3 en (i) e (ii) son posibles agentes terapéuticos identificados para tal enfermedad.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de detección selectiva de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende las etapas de (i) determinar la actividad de un polipéptido de DRD3 a una cierta concentración de un compuesto de prueba, (ii) determinar la actividad de un polipéptido de DRD3 en presencia de un compuesto que se sabe que es un regulador de un polipéptido de DRD3. Por ejemplo, compuestos que muestran efectos similares sobre la actividad del polipéptido de DRD3 en (i) en comparación con los compuestos usados en (ii) son posibles agentes terapéuticos identificados para tal enfermedad.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que la etapa de poner en contacto es dentro o en la superficie de una célula.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que la célula está *in vitro*.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que la etapa de poner en contacto se realiza en un sistema sin células.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que el polipéptido está acoplado a un marcador detectable.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que el compuesto está acoplado a un marcador detectable.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que el compuesto de prueba desplaza a un ligando que se une primero al polipéptido.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que el polipéptido está fijado a un soporte sólido.

Otros objetos de la invención son procedimientos de los anteriores, en los que el compuesto está fijado a un soporte sólido.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de detección selectiva de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, compuesto por las etapas de (i) poner en contacto un compuesto de prueba con un polinucleótido de DRD3, (ii) detectar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho polinucleótido de DRD3. Compuestos que, por ejemplo, se unen al polinucleótido de DRD3 son posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de dichas enfermedades.

Otro objeto de la invención es el procedimiento de los anteriores, en el que la molécula de ácido nucleico es ARN.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de los anteriores, en el que la etapa de poner en contacto se realiza dentro o en la superficie de una célula.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de los anteriores, en el que la etapa de poner en contacto se realiza en un sistema sin células.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de los anteriores, en el que el polinucleótido está acoplado a un marcador detectable.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de los anteriores, en el que el compuesto de prueba está acoplado a un marcador detectable. Cantidad de polinucleótido de DRD3 en dicho mamífero en comparación con un mamífero enfermo.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas, que comprenden un agente terapéutico que regula la actividad de un polipéptido de DRD3, en el que dicho agente terapéutico es (i) oligonucleótido antisentido, (ii) un anticuerpo o (iii) una ribozima.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende un polinucleótido de DRD3.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende un polipéptido de DRD3.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención sujeto. Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no están incluidos con el fin de limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos de secuencias públicas

El grado de homología puede calcularse fácilmente mediante procedimientos conocidos. Se diseñan procedimientos preferidos para determinar la homología para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los procedimientos para determinar la homología se codifican en programas de ordenador públicamente disponibles tales como BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA. Los programas BLAST están disponibles públicamente del NCBI y otras fuentes de Internet.

Para el DRD3, se identificaron los siguientes blancos de secuencias conocidas usando el algoritmo BLAST [Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; Nucleic Acids Res 1997 Sep 1; 25(17) 3389-402] y el siguiente grupo de parámetros: matriz = BLOSUM62 y filtro de baja complejidad. Se buscó en las siguientes bases de datos: NCBI (base de datos no redundantes) y la base de datos de patentes DERWENT (Geneseq).

Se encontraron los siguientes blancos:

20 >emb|CAA01483.1| receptor dopaminérgico D3 [*Homo sapiens*] Longitud = 400 Puntos = 807 bits (2084), Prev = 0.0 Identidades = 400/400 (100%), Positivos = 400/400 (100%)

>ref|NP_000787.1| receptor dopaminérgico D3, isoforma a [*Homo sapiens*] gb|AAA73929.1| d3 receptor dopaminérgico pirLG01977 d3 receptor dopaminérgico - humano sp|P35462|D3DR_HUMAN D(3) receptor dopaminérgico Longitud = 400 Puntos = 807 bits (2084), Prev = 0.0 Identidades = 400/400 (100%), Positivos = 400/400 (100%)
25 >prfL1705199A receptor dopaminérgico D3 Longitud = 400 Puntos = 805 bits (2078), Prev = 0.0 Identidades = 399/400 (99%), Positivos = 399/400 (99%)

>gb|AAB08750.1| receptor dopaminérgico D3 Longitud = 399 Puntos = 796 bits (2055), Prev = 0.0 Identidades = 396/400 (99%), Positivos = 398/400 (99%), Huecos = 1/400 (0%)

>gb|AAA75379.1| receptor dopaminérgico D3 pir|G00013 receptor dopaminérgico D3 - mono verde sp|P52703| D3DR_CERAE D(3) RECEPTOR DOPAMINÉRGICO Longitud = 400 Puntos = 795 bits (2054), Prev = 0.0 Identidades = 393/400 (98%), Positivos = 395/400 (98%)

>gb|AAL82735.1| receptor dopaminérgico D3 [*Cebus apella*] Longitud = 400 Puntos = 784 bits (2025), Prev = 0.0 Identidades = 388/400 (97%), Positivos = 392/400 (98%)

>sp|P30728|D3DR_RATÓN D_(3) receptor dopaminérgico ref|NP_031903.1| receptor dopaminérgico 3; D3 receptor [*Mus musculus*] gb|AAB35066.2| receptor dopaminérgico D3 [*Mus sp.*] pir|I48322 receptor dopaminérgico D3 - ratón prf|2105315A receptor dopaminérgico D3 emb|CAA47691.1| receptor dopaminérgico D3 [*Mus musculus*] Longitud = 446 Puntos = 713 bits (1841), Prev = 0.0 Identidades = 363/447 (81%), Positivos = 380/447 (84%), Gaps = 48/447 (10%)

>emb|CAA01350.1| receptor dopaminérgico D3 [*Rattus norvegicus*] gb|AAA70477.1| Secuencia 3 de la patente de EE.UU. 5407823 Longitud = 446 Puntos = 700 bits (1806), Prev. = 0.0 Identidades = 356/447 (79%), Positivos = 375/447 (83%), Gaps = 48/447 (10%)

>ref|NP_058836.1| receptor dopaminérgico D3 [*Rattus norvegicus*] pirLDYRTD3 receptor dopaminérgico D3 - rata emb|CAA37887.1| receptor dopaminérgico D3 [*Rattus norvegicus*] prfL1614344A receptor dopaminérgico D3 sp|P19020|D3DR_RATA D(3) receptor dopaminérgico Longitud = 446 Puntos = 700 bits (1806), Prev. = 0.0 Identidades = 356/447 (79%), Positivos = 375/447 (83%), Gaps = 48/447 (10%)

>emb|CAA01349.1| receptor dopaminérgico D3 (variante) [*Rattus norvegicus*] gb|AAA70476.1| Secuencia 2 de la patente de EE.UU. 5407823 Longitud = 446 Puntos = 699 bits (1803), Prev. = 0.0 Identidades = 355/447 (79%), Positivos = 375/447 (83%), Gaps = 48/447 (10%)

>gb|AAA41076.1| receptor dopaminérgico D3 Longitud = 454 Puntos = 691 bits (1784), Prev. = 0.0 Identidades = 355/455 (78%), Positivos = 375/455 (82%), Gaps = 56/455 (12%)

>gb|AAB45999.1| Secuencia 20 de la patente de EE.UU. 5594108 gb|AAA71265.1| Secuencia 20 de la patente de EE.UU. 5422265 Longitud = 444 Puntos = 690 bits (1781), Prev. = 0.0 Identidades = 353/447 (78%), Positivos = 373/447 (82%), Gaps = 50/447 (11 %)

>pir|A48258 receptor dopaminérgico variante D3nf- (esquizofrenia) - humano gb|AAA03543.1| receptor dopaminérgico D3 ref|NP_387512.1| receptor dopaminérgico D3, isoforma e [*Homo sapiens*] Longitud = 342 Puntos = 580 bits (1495), Prev.= e-164 Identidades = 288/289 (99%), Positivos = 288/289 (99%)

ES 2 308 157 T3

- >gb|AAB11090.1| Secuencia 27 de la patente de EE.UU. 5508384 Longitud = 317 Puntos = 577 bits (1487), Prev. = e-163 Identidades = 309/372 (83%), Positivos = 314/372 (84%), Gaps = 56/372 (15%)
- >ref|NP_387508.1| receptor dopaminérgico D3, isoforma c [*Homo sapiens*] Longitud = 327 Puntos = 476 bits (1225), Prev. = e-133 Identidades = 237/237 (100%), Positivos = 237/237 (100%)
- >gb|AAN87173.1| receptor dopaminérgico D3 [*Danio rerio*] Longitud = 454 Puntos = 440 bits (1132), Prev = -122 Identidades = 258/449 (57%), Positivos = 301/449 (66%), Huecos = 65/449 (14%)
- >gb|AAG34497.1| receptor dopaminérgico D2 isoforma corta [*Canis familiaris*] Longitud = 414 Puntos = 395 bits (1014), Prev = -109 Identidades = 221/399 (55%), Positivos = 270/399 (67%), Huecos = 24/399 (6%)
- >gb|AAG34495.1| receptor dopaminérgico D2 isoforma corta [*Canis familiaris*] Longitud = 414 Puntos = 394 bits (1012), Prev = -108 Identidades = 221/399 (55%), Positivos = 269/399 (67%), Huecos = 24/399 (6%)
- >emb|CAC87873.1| receptor dopaminérgico D2 1 [*Oncorhynchus mykiss*] Longitud = 461 Puntos = 394 bits (1011), Prev = -108 Identidades = 228/447 (51%), Positivos = 288/447 (64%), Huecos = 66/447 (14%)
- >prf|1502338A receptor dopaminérgico D2 gb|AAA41075.1| receptor dopaminérgico subtipo D2 Longitud = 415 Puntos = 393 bits (1009), Prev = -108 Identidades = 224/402 (55%), Positivos = 273/402 (67%), Huecos = 29/402 (7%)
- >emb|CAA35970.1| receptor dopaminérgico D2 [*Bos taurus*] pir|DYBOD2 receptor dopaminérgico D2 - bovino ref|NP_776468.1| receptor dopaminérgico D2 [*Bos taurus*] sp|P20288|D2DR_BOVINA D_(2) receptor dopaminérgico Longitud = 444 Puntos = 391 bits (1004), Prev. = e-107 Identidades = 229/441 (51%), Positivos = 278/441 (62%), Huecos = 65/441 (14%)
- >gb|AAB20571.1| receptor dopaminérgico D2 [*Homo sapiens*] ref|NP_057658.2 receptor dopaminérgico D2 isoforma corta [*Homo sapiens*] Longitud = 414 Puntos = 391 bits (1004), Prev = e-107 Identidades = 221/399 (55%), Positivos = 268/399 (66%), Huecos = 24/399 (6%)

Ejemplo 2

35 Perfil de expresión

El ARN celular total se aisló de células mediante uno de dos procedimientos estándar: 1) centrifugación por gradiente de densidades con isotiocianato de guanidina/cloruro de cesio [Kellogg, (1990)]; o con el protocolo de tres reactivos de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). El ARN total preparado mediante el protocolo de tres reactivos se trató con ADNasa I para eliminar la contaminación con ADN genómico.

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de DRD3, el ARN total de cada fuente celular o tisular se sometió primero a transcripción inversa. Se realizó la transcripción inversa de 85 µg del ARN total usando 1 µmol de cebadores hexaméricos aleatorios, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Qiagen, Hilden, Alemania), 3000 U RnaseQut (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) en un volumen final de 680 µl. El tampón de síntesis para la primera hebra y la transcriptasa inversa Omniscript (2 µl/µl) eran de (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos y se enfrió en hielo. El volumen se ajustó hasta 6800 µl con agua, dando una concentración final de 12,5 ng/µl del ARN de partida.

Para la cuantificación relativa de la distribución del ARNm de DRD3 en células y tejidos se usó el sistema de detección de secuencias 7900 HT de Applied Biosystems o BioradiCycler de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Se realizaron reacciones de PCR para cuantificar el DRD3 y los genes domésticos HPRT (hipoxantina fosforibosiltransferasa), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), β-actina y otros. Se diseñaron cebadores directos e inversos y sondas para DRD3 usando el software de Perkin Elmer ABI Primer Express™ y se sintetizaron mediante Tib-MolBiol (Berlín, Alemania). La secuencia del cebador directo de DRD3 fue: Cebador 1 (SEC ID N° 3). El cebador inverso de DRD3 fue el Cebador 2 (SEC ID N° 4). La sonda 1 (SEC ID N° 5), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMTA (carboxitetrametilrodamina) como inactivador, se usa como sonda para DRD3. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 25 µl: 1x Tampón TaqMan A, MgCl₂ 5,5 mM, 200 nM de dATP, dCTP, dGTP, y dUTP, 0,25 U/µl de AmpliTaq Gold™, 0,01 U/µl de AmpErase y la sonda 1 (SEC ID N° 4), cebadores directos e inversos de DRD3 cada uno a 200 nM, 200 nM de sonda para DRD3 marcada con FAM/TAMRA y 5 µl de ADNc molde. Los parámetros para la ciclación térmica fueron 2 min a 50°C, seguidos por 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 s e hibridación/extensión a 60°C durante 1 min.

ES 2 308 157 T3

Cálculo de valores de CU corregidos

El valor CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección “Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos”. El valor FC (factor para la corrección del ciclo umbral) se calcula del siguiente modo:

1. Se realizaron reacciones PCR para cuantificar los genes domésticos (HKG) para cada muestra de ADNc.

2. Los valores CU_{HKG} (ciclo umbral para genes domésticos) se calcularon como se describen en la sección “Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos”.

3. Se calculan los valores medios de CU_{HKG} (valor medio del CU de todos los HKG analizados en un ADNc) de todos los HKG para cada ADNc.

(n = número de HKG):

$$CU_{HKG-n} - \text{valor medio} = (CU_{HKG1} - \text{valor} + CU_{HKG} - \text{valor} + \dots + CU_{HKG-n} - \text{valor})/n$$

4.

$CU_{\text{panel}} - \text{valor medio}$ (CU valor medio de todos los HKG en todos los ADNc analizados) = $(CU_{HKG1} - \text{valor medio} + CU_{HKG2} - \text{valor medio} + \dots + CU_{HKG-y} - \text{valor medio})/y$

(y = número de ADNc)

5.

FC_{ADNc-n} (factor de corrección para n ADNc) = $CU_{\text{panel}} - \text{valor medio} - CU_{HKG-n} - \text{valor medio}$

6.

FC_{ADNc-n} (valor de CU del gen analizada para n ADNc) + FC_{ADNc-n} (factor de corrección para n ADNc) = $CU_{\text{cor-ADNc-n}}$ (valor CU corregido para un gen en n ADNc)

Cálculo de la expresión relativa

Definición: $CU_{\text{cor-ADNc-n}}$ más elevado $\neq 40$ se define como la expresión relativa de $CU_{\text{cor-ADNc-n}}$ [elevado] = $2^{(CU_{\text{cor-ADNc-n}}[\text{elevado}] - CU_{\text{cor-ADNc-n}})}$

Tejidos

La expresión de DRD3 se investigó en los tejidos que se indican en la tabla 1.

Perfil de expresión

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Expresión relativa de DRD3 en varios tejidos humanos

Tejido	Expresión relativa
Corazón fetal	17
Corazón	14
Pericardio	102

ES 2 308 157 T3

	Aurícula cardíaca (derecha)	25
5	Aurícula cardíaca (izquierda)	292
	Ventrículo cardíaca (izquierdo)	59
	Tabique interventricular	95
10	Aorta fetal	10
	Aorta	437
	Arteria	996
15	Arteria coronaria	2957
	Vena	653
	Células HUVEC	365
20	Piel	12
	Glándula suprarrenal	13
25	Tiroides	0
	Tumor tiroideo	22
	Páncreas	0
30	Cirrosis páncreas-hígado	83
	Esófago	15
	Tumor de esófago	154
35	Estómago	6
	Tumor de estómago	195
	colon	1
40	Tumor de colon	276
	Intestino delgado	81
	Íleon	434
45	Tumor de íleon	205
	Inflamación crónica del íleon	771
50	Recto	3061
	Glándula salival	4
	Hígado fetal	10
55	Hígado	12
	Cirrosis hepática	1458
	Tumor hepático	231
60	Células HEP G2	407
	Leucocitos (sangre periférica)	72

65

ES 2 308 157 T3

	Jurkat (células T)	149
5	Médula ósea	8
	Eritrocitos	498
	Ganglios linfáticos	776
10	Timo	10
	Trombocitos	523
	Células estromales de médula ósea	63
15	Células CD71+ de médula ósea	340
	Células CD33+ de médula ósea	3019
	Células CD34+ de médula ósea	292
20	Células CD15+ de médula ósea	495
	Células CD71+ de sangre de cordón	195
25	Bazo	97
	Cirrosis bazo hígado	0
	Músculo esquelético	83
30	Tejido adiposo	1
	Cerebro fetal	72
	Cerebro	74
35	Cerebro con Alzheimer	1075
	Cerebelo	4
	Cerebelo (derecho)	405
40	Cerebelo (izquierdo)	855
	Corteza cerebral	471
	Corteza cerebral con Alzheimer	57
45	Lóbulo frontal	1038
	Lóbulo frontal de cerebro con Alzheimer	1489
50	Lóbulo occipital	1333
	Lóbulo parietal	165
55	Lóbulo temporal	82
	Circunvolución precentral	256
	Circunvolución poscentral	115
60	Amígdala cerebelar	247
	Vermis cerebelar	315

65

ES 2 308 157 T3

	Puente	4182
5	Sustancia negra	729
	Meninges cerebrales	1924
	Pedúnculos cerebrales	198
10	Cuerpo calloso	588
	Hipocampo	300
	Tálamo	1783
15	Ganglios de la raíz dorsal	1641
	Médula espinal	65
	Células SK-N-MC de neuroblastoma	309
20	Células SH-SY5Y de neuroblastoma	94
	Células IMR32 de neuroblastoma	588
	Células H4 de glioma	298
25	Células H4 de glioma + APP	218
	HEK CNS	580
	HEK CNS + APP	798
30	Retina	942
	Pulmón fetal	24
35	Células IMR-90 de fibroblasto de pulmón fetal	11
	Pulmón	6
40	Lóbulo pulmonar superior derecho	35
	Lóbulo pulmonar central derecho	42
	Lóbulo pulmonar inferior derecho	685
45	Tumor pulmonar	2628
	EPOC pulmonar	322
	Tráquea	14
50	Cuello de útero	0
	Testículos	214
55	Células HeLa (tumor de cuello de útero)	2
	Placenta	6
60	Útero	399
	Tumor uterino	103

65

	Ovarios	2
5	Tumor de ovarios	1859
	Mama	164
	Tumor de mama	505
10	Células MDA MB 231 (tumor de mama)	123
	Glándula mamaria	4
15	Próstata	42
	HBP próstata	51
	Vejiga urinaria	5
20	Uréter	428
	Pene	765
	Cuerpo cavernoso	302
25	Riñón fetal	19
	Riñón	34
30	Tumor renal	229
	Células HEK 293	276

35 Ejemplo 3

Análisis antisentido

40 El conocimiento de la secuencia de ADNc completa y correcta que codifica DRD3 permite su uso como herramienta para la tecnología antisentido en la investigación de la función génica. Los oligonucleótidos, ADNc o fragmentos genómicos que comprenden la hebra antisentido de un polinucleótido que codifica DRD3 se usan *in Vitro* o *in vivo* para inhibir la traducción del ARNm. Tal tecnología es en la actualidad bien conocida en la técnica y las moléculas antisentido se pueden diseñar en varias localizaciones a lo largo de las secuencias nucleotídicas. Mediante el tratamiento de células o de los animales experimentales completos con tales secuencias antisentido, el gen de interés se apaga de forma eficaz. Con frecuencia, la función del gen se establece mediante la observación de la conducta a nivel intracelular, celular, tisular o del organismo (p. ej., letalidad, pérdida de función diferenciada, cambios en la morfología, etc.).

50 Además de usar secuencias construidas para interrumpir la transcripción de un determinado marco de lectura abierto, se obtienen modificaciones de la expresión génica mediante el diseño de secuencias antisentido de regiones intrónicas, elementos promotor/potenciador o, incluso, de genes reguladores de transacción.

Ejemplo 4

55 *Expresión de DRD3*

60 La expresión de DRD3 se consigue mediante la subclonación de ADNc en los adecuados vectores de expresión y la transfección de los vectores en huéspedes de expresión tales como, por ejemplo, *E. coli*. En un caso concreto, el vector se somete a ingeniería de modo que contiene un promotor para la β -galactosidasa, en dirección 5' del sitio de clonación, seguido por la secuencia que contiene el amino terminal metionina y los posteriores siete residuos de la β -galactosidasa.

65 Inmediatamente después de estos ocho residuos hay un promotor del bacteriófago sometido a ingeniería útil para el cebado artificial y la transcripción y para proporcionar una serie de sitios únicos para las endonucleasas de restricción para clonación.

La inducción de la cepa bacteriana transfeccionada aislada con isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) usando procedimientos estándar produce una proteína de fusión correspondiente a los primeros siete residuos de β -galactosi-

dasa, aproximadamente 15 residuos de “ligante” y el péptido codificado en el ADNc. Dado que los insertos de clones de ADNc se generan mediante procedimientos esencialmente aleatorios, existe una probabilidad del 33% de que el ADNc incluido se encuentre en el marco de lectura correcto para su adecuada traducción. Si el ADNc no está en el marco de lectura adecuado, se obtiene mediante delección o inserción del número adecuado de bases usando procedimientos bien conocidos, incluidos mutagénesis *in Vitro*, digestión con exonucleasa III o nucleasa mung bean o la inclusión de un ligante de oligonucleótidos de la longitud adecuada.

El ADNc de DRD3 se arrastra a los otros vectores que se sabe que son útiles para la expresión de proteínas en huéspedes específicos. Los cebadores de oligonucleótidos que contienen sitios de clonación, así como un segmento de ADN (aproximadamente 25 bases) suficiente para hibridar con tiras en ambos extremos del ADNc diana se sintetizan químicamente mediante procedimientos estándar. Estos cebadores se usan a continuación para amplificar el segmento génico deseado mediante PCR. El segmento génico resultante se digiere con las enzimas de restricción adecuadas en condiciones estándar y se aísla mediante electroforesis en gel. Como alternativa se producen segmentos génicos similares mediante digestión del ADNc con las enzimas de restricción adecuadas. Usando cebadores adecuados, se ligan los segmentos de la secuencia codificadora de más de un gen y se clonan en vectores adecuados. Es posible optimizar la expresión mediante construcción de tales secuencias quiméricas.

Entre los huéspedes de expresión para tales moléculas quiméricas se incluye células de mamífero como células de ovario de hámster chino (CHO) y 293 humanas, células de insecto como las células Sf9, células de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* y células bacterianas tales como *E. coli*. Para cada uno de estos sistemas, un vector de expresión útil también incluye un origen de replicación que permita su propagación en las bacterias y un marcador seleccionable tal como el gen de resistencia antibiótica a β -lactamasa para permitir la selección del plásmido en la bacteria. Además, el vector puede incluir un segundo marcador seleccionable tal como el gen de neomicina fosfotransferasa, para permitir la selección en células huésped eucarióticas transfectadas. Los vectores para usar en huéspedes de expresión eucarióticos requieren elementos para procesar ARN, tales como secuencias de 3' poliadenilación, si estos no forman parte del ADNc de interés.

Además, el vector contiene promotores o potenciadores que incrementan la expresión génica. Tales promotores son específicos del huésped e incluyen promotores de MMTV, SV40 y metalotionina para las células CHO; promotores trp, lac, tac y T7 para huéspedes bacterianos; y factor alfa, alcohol oxidasa y promotores PGH para levaduras. Potenciadores de la transcripción, como el potenciador del virus del sarcoma de rous, se usan en células huésped de mamíferos. Una vez que se han obtenido cultivos homogéneos de células recombinantes mediante procedimientos estándar de cultivo, se recuperan cantidades grandes de DRD3 producido de forma recombinante a partir del medio condicionado y se analizan usando procedimientos cromatográficos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el DRD3 se puede clonar en el vector de expresión pcDNA2, como se ilustra en la presente memoria descriptiva. Este producto se puede usar para transformar, por ejemplo, HEK293 o COS mediante metodología estándar en la técnica. Específicamente, por ejemplo, usando transferencia génica mediada por lipofectamina (Gibco BRL n° de catálogo 18324-020).

Ejemplo 5

Aislamiento de DRD3 recombinante

El DRD3 se expresa en forma de una proteína quimérica con uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteínas. Tales dominios que facilitan purificación incluyen, entre otros, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados [Appa Rao, 1997] y el dominio usado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Washington.). La inclusión de una secuencia ligante escindible tal como Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) entre el dominio de purificación y la secuencia e DRD3 es útil para facilitar la expresión de DRD3.

Ejemplo 6

Análisis de los GPCR quiméricos

GPCR quiméricos funcionales se construyen mediante la combinación de las secuencias receptoras extracelulares de una isoforma nueva con los segmentos transmembrana e intracelulares de una isoforma conocida con fines de análisis. Este concepto fue demostrado por Kobilka y col. (1988), Science 240:1310-1316), que crearon una serie de receptores adrenérgicos $\alpha 2$ - $\beta 2$ quiméricos (RA) mediante la inserción de cantidades progresivamente mayores de la secuencia transmembrana $\alpha 2$ -AR en $\beta 2$ -AR. La actividad de unión de agonistas conocidos cambió a media que la molécula cambiada desde tener una conformación más $\alpha 2$ que $\beta 2$ y los constructos intermedios mostraron una especificidad mixta. No obstante, la especificidad para la unión de antagonistas, se correlacionó con la fuente del dominio VII. La importancia del dominio VII de T7G para el reconocimiento del ligando también se encontró en quimeras utilizando dos receptores de factor α de levadura y es significativa porque los receptores de levaduras se clasifican como receptores misceláneos. Por tanto, el papel funcional de dominios específicos parece estar conservado a lo largo de la familia de GPCR, con independencia de la categoría.

De forma paralela, segmentos internos o dominios citoplásmicos de una isoforma concreta se intercambian con los dominios análogos de un GPCR conocido y se usan para identificar los determinantes estructurales responsables del acoplamiento de receptores a proteínas G triméricas. Un receptor quimérico, en el que los dominios V, VI y el bucle conector intracelular de $\beta 2$ -AR se sustituyeron en $\alpha 2$ -AR, se mostró que se unía a ligandos con especificidad $\alpha 2$ -AR, pero que estimulaba la adenilato ciclasa de forma $\beta 2$ -AR. Esto demuestra que para los receptores de tipo adrenérgico, el reconocimiento de proteína G está presente en los dominios V y VI y en el bucle que los conecta. La situación opuesta se ha predicho y observado para una quimera en la que el bucle V->VI de c sustituyó el dominio correspondiente en $\beta 2$ -AR y el receptor resultante se une a los ligandos con especificidad $\beta 2$ -AR y se activó el recambio de fosfatidinositol mediado por proteína G del modo $\beta 2$ -AR. Por último, las quimeras construidas a partir de receptores muscarínicos también demostraron que el bucle V->VI es el principal determinante de la especificidad de la actividad de la proteína G.

GPCR quiméricos o modificados que contienen sustituciones en las regiones extracelular y transmembrana han mostrado que estas porciones del receptor determinan la especificidad de unión al ligando. Por ejemplo, dos residuos de serina conservados en el dominio V de todos los GPCR adrenérgicos y D de catecolaminas son necesarios para una potente actividad agonista. Se cree que estas serinas forman enlaces de hidrógeno con el resto catecol de los agonistas dentro del sitio de unión a GPCR. De igual modo, se cree que un residuo de Aso presente en el dominio III de todos los GPCR que se une a aminos biogénica forma un par iónico con el grupo amino del ligando en el sitio de unión del GPCR.

GPCR clonados funcionales se expresan en sistemas de expresión heterólogos y se evalúa su actividad biológica. Un sistema heterólogo introduce en células de levadura genes de un GPCR de mamífero y de una proteína G de mamíferos. Se ha mostrado que el GPCR tiene una especificidad y afinidad de ligando adecuadas y desencadenan la activación biológica adecuada (parada del crecimiento y cambios morfológicos) de las células de levadura.

Un procedimiento alternativo para el análisis de receptores quiméricos se basa en el procedimiento que utiliza el receptor purinérgico (P_2u). La función se analiza con facilidad en células K562 de leucemia humana cultivadas, porque estas células carecen de receptores P_2u . Las células K562 se transfeccionan con vectores de expresión que contienen P_2u normal o quimérico y se cargan con fura-a, sonda fluorescente para Ca^{++} . La activación de receptores de P_2u adecuadamente ensamblados y funcionales con UTP o ATP extracelular moviliza el Ca^{++} intracelular, que reacciona con fura-a y se mide espectrofluorométricamente.

Como ocurre con los GPCR anteriores, los genes quiméricos se crean combinando secuencias de los segmentos receptores extracelulares de cualquier polipéptido GPCR nuevo con los nucleótidos para los segmentos transmembrana e intracelular de la molécula de P_2u conocida. El baño de las células K562 transfeccionadas en micropocillos que contienen los ligandos adecuados desencadena la actividad de unión y fluorescente que define efectores de la molécula de GPCR. Una vez que el ligando y su función se han establecido, el sistema P_2u es útil para definir antagonistas o inhibidores que bloquean la unión y eviten tales reacciones de fluorescencia.

Ejemplo 7

Producción de anticuerpos específicos para DRD3

Se utilizan dos enfoques para elevar el nivel de anticuerpos frente a DRD3, y cada enfoque es Alti para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. En un enfoque, la proteína desnaturalizada de separación HPLC de fase inversa se obtiene en cantidades de hasta 75 mg. Esta proteína desnaturalizada se usa para inmunizar ratones o conejos usando protocolos estándar; unos 100 μ g son adecuados para la inmunización de un ratón, mientras que hasta 1 mg podría usarse para inmunizar un conejo. Para identificar hibridomas de ratón, la proteína desnaturalizada está radioyodada y se usa para la detección selectiva de posibles hibridomas de células B murinas para los que producen anticuerpos. Este procedimiento sólo requiere cantidades pequeñas de proteína, de modo que 20 mg sea suficiente para marcar y seleccionar varios miles de clones.

En el segundo enfoque, la secuencia de aminoácidos de un dominio de DRD3 adecuado, tal y como se deduce de la traducción del ADNc, se analiza para determinar las regiones de alta antigenicidad. Los oligopéptidos que comprenden regiones hidrofílicas adecuadas se sintetiza y usan en protocolos de inmunización adecuados para generar anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos óptimas para la inmunización normalmente están en el extremo C, el extremo N y los lugares intermedios, regiones hidrofílicas del polipéptido con una probabilidad mayor de exponerse al ambiente externo cuando la proteína se encuentra en su conformación natural.

Normalmente, péptidos seleccionados, de una longitud de aproximadamente 15 residuos, se sintetizan usando Applied Biosystems Peptide Synthesizer Modelo 431A mediante química fmoc y acoplados a hemocianina de lapa californiana (KLH; Sigma, St. Louis, MO) mediante la reacción con éster de M-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida, MBS. Si es necesario, se introducirá una cisteína en el extremo N del péptido para permitir el acoplamiento a KLH. Los conejos se inmunizan con el complejo péptido-KLH en adyuvante completo de Freund. Los antiseros resultantes son analizados para determinar la actividad antipeptídica mediante la unión del péptido a plástico, el bloqueo con 1% de seroalbúmina bovina, la reacción con antisuero, el lavado y la reacción con anti-IgG de conejo de cabra específica, purificada por afinidad y marcada (radiactiva o fluorescente).

ES 2 308 157 T3

Los hibridomas se preparan y someten a detección selectiva usando técnicas estándar. Los hibridomas de interés se detectan mediante detección selectiva con DRD3 marcador para identificar las proteínas de fusión que producen el anticuerpo monoclonal con la especificidad deseada.

En un protocolo típico, pocillos de placas (FAST; Becton-Dickinson, Palo Alto, CA) se revisten durante la incubación con anticuerpos de conejo anti-ratón (o anti-especies adecuadas 1 g) específicos y purificados por afinidad a 10 mg/ml. Los pocillos revestidos se bloquean con 1% de seroalbúmina bovina (BSA), se lavaron y se incubaron con sobrenadantes procedentes de hibridomas. Después de lavar, los pocillos se incuban con DRD3 marcado a 1 mg/ml. Los sobrenadantes con anticuerpos específicos se unen a más DRD3 marcado de lo que se detecta en el fondo. A continuación, los clones que producen anticuerpos específicos se expanden y someten a dos ciclos de clonación a dilución límite. Los hibridomas clonados se inyectan en ratones tratados con pristano para producir ascitis y el anticuerpo monoclonal se purifica a partir del fluido ascítico mediante cromatografía de afinidad en la proteína A. Los anticuerpos monoclonales con afinidades de al menos 10^8 M^{-1} , preferentemente 10^9 a 10^{10} M^{-1} o más fuerte, se preparan, normalmente mediante procedimientos estándar.

Ejemplo 8

Prueba diagnóstica usando anticuerpos específicos de DRD3

Determinados anticuerpos frente a DRD3 son útiles para investigar la transducción de señal y el diagnóstico de enfermedades infecciosas o hereditarias que se caracterizan por diferencias en la cantidad o distribución de DRD3 o productos posteriores (en 3') de una cascada de señalización activa.

Entre las pruebas diagnósticas para DRD3 se incluyen procedimientos que usan anticuerpos y un marcador para detectar DRD3 en fluidos del cuerpo humano, membranas, células, tejidos o extractos de tales. Los polipéptidos y anticuerpos se usan con o sin modificación. Con frecuencia, los polipéptidos y anticuerpos se marcan uniéndoles, bien covalente o no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se han publicado extensamente en la literatura científica y de patentes. Entre los marcadores adecuados se incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, partículas magnéticas y similares.

En la técnica se conocen diversos protocolos para medir DRD3 soluble o unido a membrana, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína. Ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo de dos puntos basado en anticuerpos monoclonales usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes sobre el DRD3, pero se puede emplear un ensayo de unión competitiva.

Ejemplo 9

Purificación de DRD3 nativo usando anticuerpos específicos

El DRD3 nativo o recombinante se purifica mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos de DRD3. En general, una columna de inmunoafinidad se construye mediante acoplamiento covalente del anticuerpo anti-TRH a una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de suero inmunitario bien mediante precipitación con sulfato amónico bien mediante purificación en proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway N.J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fluido de ascitis de ratón mediante precipitación en sulfato amónico o cromatografía en proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada está unida covalentemente a una resina cromatográfica tal como Sefarosa activada por CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo está acoplado a la resina, la resina está bloqueada y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dichas columnas de inmunoafinidad se usan en la purificación de DRD3 preparando una fracción a partir de células que contienen DRD3 en una forma soluble. Esta preparación deriva mediante solubilización de células enteras o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial (con o sin la adición de detergente) o mediante otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el DRD3 soluble que contiene una secuencia de señal se secreta en una cantidad útil en el medio en el que crecen las células.

Una preparación que contiene DRD3 soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad y la columna se lava en condiciones que permitan la absorción preferencial de DRD3 (p. ej., tampones de elevada fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna eluye en condiciones que alteran la unión anticuerpo/proteína (p. ej., un tampón de pH 2-3 o una concentración elevada de un caotropeo tal como urea o ion tiocianato) y se recoge el DRD3.

Ejemplo 10

Detección selectiva del fármaco

5 Esta invención es particularmente útil para la detección selectiva de compuestos terapéuticos mediante el uso de DRD3 o de fragmentos de unión al mismo en cualquiera de una variedad de técnicas de detección selectiva de fármacos. Dado que el DRD3 es un receptor acoplado a proteína G, cualquiera de los procedimientos de uso habitual en la técnica pueden usarse potencialmente para identificar ligandos de DRD3. Por ejemplo, la actividad de un receptor acoplado a proteína G, como el drd3, puede medirse usando cualquiera de una variedad de ensayos funcionales adecuados en los que la activación del receptor tiene como resultado un cambio observable en el nivel de algún sistema de segundo mensajero, como la adenilato ciclasa, la guanilil ciclasa, la movilización del calcio o hidrólisis de inositol fosfolípido. Como alternativa, el polipéptido o fragmento empleado en tal ensayo está libre en solución, fijado a un soporte sólido, en una superficie de célula o se localiza en el interior de la célula. Un procedimiento de detección selectiva del fármaco usa células huésped eucarióticas o procarióticas que se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento. Los fármacos se someten a detección selectiva frente a tales células transformadas en ensayos de unión competitiva. Tales células, en forma viable o fija, se usan para los ensayos de unión estándar.

20 Por ejemplo, se mide la formación de complejos entre DRD3 y el agente que se está analizando. Como alternativa se examina la disminución de la formación de complejos entre DRD3 y un ligando producida por el agente que se está analizando.

25 Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos de detección selectiva de fármacos candidatos, fármacos u otros agentes que afectan a la transducción de la señal. Estos procedimientos, bien conocidos en la técnica, comprenden poner en contacto tal agente con un polipéptido de DRD3 o un fragmento del mismo y analizar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido o fragmento de DRD3, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido o fragmento de DRD3 y la célula. En tales ensayos de unión competitiva, normalmente el polipéptido o fragmento de DRD3 están marcados. Tras una incubación adecuada, el polipéptido o fragmento de DRD3 libre se separa del presente en forma unida, y la cantidad de marcador libre o sin formar complejos es una medida de la capacidad del agente concreto para unirse a DRD3 o interferir en el complejo DRD3-agente.

30 Otra técnica para la detección selectiva del fármaco proporciona una detección selectiva de alto rendimiento para compuestos que tienen una afinidad de unión a los polipéptidos de DRD3 adecuada. Brevemente indicado, grandes cantidades de diferentes compuestos de prueba peptídicos pequeños se sintetizan en un sustrato sólido, como agujas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de prueba peptídicos se hacen reaccionar con el polipéptido de DRD3 y se lavan. A continuación, el polipéptido de DRD3 unido se detecta mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El DRD3 purificado también se puede recubrir directamente en placas para usar en las técnicas de detección selectiva del fármaco citadas anteriormente. Además, se usan anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

40 Esta invención también contempla el uso de ensayos competitivos de detección selectiva de fármacos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a DRD3 específicamente compiten con un compuesto de prueba para la unión a polipéptidos de DRD3 o fragmentos.

45 De este modo, se usan anticuerpos para detectar la presencia de algún péptido que compara uno o más determinantes antigénicos con DRD3.

Ejemplo 11

50

Diseño racional de fármaco

El objetivo del diseño racional de un fármaco es producir análogos estructurales de polipéptidos de interés biológicamente activos o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se usan para crear fármacos que sean más activos o formas estables del polipéptido o que potencian o interfieren con la función de un polipéptido *in vivo*.

60 En un enfoque, la estructura tridimensional de una proteína de interés, o de un complejo proteína-inhibidor, se determina mediante cristalografía por rayos x, modelización por ordenador o, más normalmente, mediante una combinación de los dos enfoques.

65 Deben establecerse tanto la forma como las cargas del polipéptido para elucidar la estructura y determinar los sitio(s) activos de la molécula. Con menos frecuencia, se obtiene información útil sobre la estructura de un polipéptido mediante modelización basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos se usa información estructural relevante para diseñar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se incluyen moléculas que tienen mejor actividad o estabilidad o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos.

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana seleccionado mediante ensayo funcional, tal y como se ha descrito en lo que antecede, y, después, resolver su estructura de cristal. Este enfoque, en principio, da un núcleo de fármaco en el que se basa el posterior diseño del fármaco. Es posible eludir la cristalografía de proteínas totalmente generando anticuerpos antiidiotípicos (anti-ids) frente a un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, cabe esperar que el sitio de unión del anti-ids sea un análogo el receptor original. A continuación, el anti-ids se usa para identificar y aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actúan después como el núcleo del fármaco.

En virtud de la presente invención, está disponible suficiente cantidad de polipéptido para realizar tales estudios analíticos como la cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de DRD3 proporcionada en la presente memoria descriptiva proporciona guías para los que emplean técnicas de modelización en lugar de o además de cristalografía de rayos X.

Ejemplo 12

Identificación de otros miembros del complejo de transducción de señal

El DRD3 purificado de la invención es una herramienta de investigación para la identificación, caracterización y purificación de proteínas G que intervienen o de otras proteínas de la vía de transducción de señal. Los marcadores radiactivos se incorporan en un dominio seleccionado de DRD3 mediante varios procedimientos conocidos en la técnica y usados *in vitro* para capturar las moléculas que interaccionan. Un procedimiento preferido implica marcar los grupos amino primarios en DRD3 con reactivo de Bolton-Hunter ¹²⁵I. Este reactivo se ha usado para marcar varias moléculas sin pérdida concomitante de actividad biológica.

El DRD3 marcado es útil como reactivo para la purificación de moléculas con las que interacciona. En una forma de realización de purificación por afinidad, el DRD3 unido a membrana está acoplado covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto sin células derivado de células sinoviales o de posibles células diana se pasa por la columna y las moléculas con la afinidad adecuada se unen al DRD3. El complejo DRD3 se recupera de la columna y el ligando de unión a DRD3 se disocia y se somete a secuenciación proteína en el extremo N. La información sobre la secuencia de aminoácidos se usa para identificar la molécula capturada o diseñar sondas oligonucleotídicas degeneradas para la clonación del gen relevante a partir de una biblioteca adecuada de ADNc.

En un procedimiento alternativo se generan anticuerpos frente a DRD3, específicamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se someten a detección selectiva para identificar aquéllos que inhiben la unión del DRD3 marcado. A continuación, estos anticuerpos monoclonales se usan terapéuticamente.

Ejemplo 13

Uso y administración de anticuerpos, inhibidores o antagonistas

Anticuerpos, inhibidores o antagonistas de DRD3 u otros tratamientos y compuestos limitantes de la transducción de señal (LTS) proporcionan diferentes efectos cuando se administran terapéuticamente. Los LTS se formulan en un medio transportador acuoso no tóxico, inerte y farmacéuticamente aceptable, preferentemente a un pH de aproximadamente 5 a 8, más preferentemente de 6 a 8, aunque el pH puede variar de acuerdo con las características del anticuerpo, inhibidor o antagonista que se está formulando y la afección que se va a tratar. Las características de los LTS incluyen solubilidad de la molécula, su semivida y antigenicidad/inmunogenicidad. Éstas y otras características ayudan a definir un transportador eficaz. Las proteínas humanas nativas se prefieren como LTS, pero las moléculas orgánicas o sintéticas resultantes de detecciones selectivas de fármacos son igualmente eficaces en situaciones concretas.

Los LTS se liberan mediante vías de administración conocidas, incluidas, entre otras, cremas y geles tópicos; pulverizador y aerosol transmucosos; parches y vendas transdérmicas; formulaciones inyectables, intravenosas y de lavado; y líquidos y píldoras de administración oral formuladas particularmente para que resistan el ácido y las enzimas del estómago. La formulación concreta, la dosificación exacta y la vía de administración lo determina el médico que atiende al paciente y varían de acuerdo con cada situación específica.

Tales determinaciones se realizan considerando múltiples variables, como la afección que se va a tratar, los LTS que se van a administrar y el perfil farmacocinético de un LTS concreto. Factores adicionales que se toman en cuenta incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, del LTS, la posible combinación con fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones LTS de acción prolongada podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento del LTS concreto.

Las cantidades de dosificación normales varían de 0,1 μ g 105 μ gs, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, en función de la vía de administración. En la literatura se proporcionan guías sobre dosificaciones y procedimientos de liberación concretos, véanse las patentes de EE.UU. n° 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Los expertos en la técnica emplean diferentes formulaciones para diferentes LTS. La administración a células tal como células nerviosas necesita la liberación de un modo diferente a otras células tales como células endoteliales vasculares.

Se contempla que transducción anómala de la señal, traumatismos o enfermedades que desencadenan la actividad de DRD3 se pueden tratar con LTS. Estas afecciones o enfermedades se diagnostican específicamente mediante las pruebas tratadas en lo que antecede y tales pruebas se realizarán en los casos con sospecha de infección vírica, bacteriana o fúngica, respuestas alérgicas, lesiones mecánicas asociadas con traumatismos, enfermedades hereditarias, linfoma o carcinoma, u otras afecciones que activan los genes de los tejidos linfoides o neuronal.

Ejemplo 14

Producción de animales transgénicos no humanos

Se producen sistemas con modelos de animales que provocan los papeles fisiológico y conductual del DRD3 mediante la creación de animales transgénicos no humanos en los que la actividad de DRD3 se incrementa o disminuye o la secuencia de aminoácidos del DRD3 expresado está alterada, mediante diversas técnicas. Ejemplos de estas técnicas incluyen, entre otras: 1) inserción de versiones normal o mutante del ADN que codifica DRD3, mediante microinyección, electroporación, transfección retroviral u otros medios bien conocidos para los expertos en la técnica, en embriones fertilizados adecuadamente con el fin de producir un animal transgénico o 2) recombinación homóloga de versiones mutantes o normales, humanas o animales de estos genes con el locus del gen nativo en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión de la estructura de estas secuencias de DRD3. La técnica de recombinación homóloga es bien conocida en la técnica. sustituye el gen nativo con el gen insertado y, por tanto, es útil para producir un animal que no puede expresar los DRD3 nativos, pero sí expresa, por ejemplo un mutante de DRD3 insertado, que ha sustituido el DRD3 nativo en el genoma del animal por recombinación, resultante en la subexpresión del transportador. La microinyección añade genes al genoma, pero no los elimina, y la técnica es útil para producir un animal que exprese su propio y añadido DRD3, que tiene como resultado la sobreexpresión del DRD3.

Otro medio disponible para producir un animal transgénico, con un ratón como ejemplo, es el siguiente: Ratones hembra se aparean y los huevos fertilizados resultantes se sacan de los oviductos. Los huevos se almacenan en un medio adecuado, tal como medio con cloruro de cesio 2M. El ADN o ADNc que codifica DRD3 se purifica a partir de un vector mediante procedimientos bien conocidos para el experto en la técnica. Los promotores inducibles pueden condensarse con la región codificadora del ADN para proporcionar un medio experimental para regular la expresión del transgen. Como alternativa, o además de, elementos reguladores específicos de tejido se pueden condensar con la región codificadora para permitir la expresión específica de tejido del transgen. El ADN, en una solución adecuadamente taponada, se coloca en una aguja de microinyección (que puede estar hecha de tubo capilar usando soplado (PIPER PULLER) y el huevo a inyectar se coloca en un portaobjetos con depresión. La aguja se inserta en el pronúcleo del huevo y se inyecta la solución de ADN. A continuación, el huevo inyectado se transfiere al oviducto de un ratón seudopreñado, que es un ratón estimulado con las hormonas adecuadas con el fin de mantener una falsa gestación, en el que procede al útero, se implanta y se desarrolla hasta término. Como se ha indicado antes, la microinyección no es el único procedimiento para la inserción de ADN en el huevo, pero se usa únicamente con fines ilustrativos.

Referencias

WO 03094856

U.S. 4.522.811

U.S. 5.283.317

U.S. 5.407.823

U.S. 5.422.265

U.S. 5.508.384

U.S. 5.565.332

U.S. 5.594.108

WO 84/03564

WO 92/01810

WO 92/07937

WO 93/03151

WO 94/13804

WO 01/04297

WO 01/77172

Accili y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 1945-1949, 1996

5 **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ**; *Nucleic Acids Res* 1997 Sep 1; 25 (17): 3389-402

Appa Rao y col., 1997, *Protein Expr Purif* Nov, 11 (2): 201-8

10 **Asico** y col., *J. Clin. Invest.* 102: 493-498, 1998

Barnes, 2000, *Chest*, 117:10S14S

15 **Botstein** y col., 1980, *Am J Hum Genet.* 32: 314-31

Colbere-Garapin y col., 1981, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14

Crocq y col., *J. Med. Genet.* 29: 858-860, 1992

20 **Engelhard** y col., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227

Gergen y **Weiss**, 1992, *Am Rev Respir Dis* 146:823-824

Gibson y col., 1996, *Genome Research* 6: 995-1001

25 **Guillin** y col., *Nature* 411: 86-89, 2001

Haseloff y col., 1988, *Nature* 334, 585-591

30 **Heid** y col., 1996, *Genome Research* 6: 986-994

Holland y col., 1991, *PNAS* 88: 7276-7280

Holzman, *Brain Res. Rev.* 31: 350-356, 2000

35 **Ilani** y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 625-628, 2001

Iwabuchi y col., 1993, *Oncogene* 8, 1693-1696

40 **Jeffreys** y col., 1985, *Nature* 316: 76-9

Johnson y col., 1989, *Endoc. Rev.* 10, 317-331

Kellogg y col., 1990, *Anal. Biochem.* 189:202-208

45 **Lam**, 1997, *Anticancer Drug Res.* 12(3):145-67

Le Coniat y col., *Hum. Genet.* 87: 618-620, 1991

50 **Lefkowitz**, 1991, *Nature* 351, 353-354

Livak y col., 1995, *PCR Methods and Applications* 357-362

Logan, Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad Sci.* 81, 3655-3659

55 **Lohmueller** y col., *Nature Genet.* 33: 177-182, 2003

Lowy y col., 1980, *Cell* 22, 817-23

60 **Maddox** y col., 1983, *J. Exp. Med* 158, 1211-1216

Mc Allister y col., *J. Recept Signal Transduction Res.* 15:267-81, 1995

McConnell y col., 1992, *Science* 257, 1906-1912

65 **Nanko** y col., *Hum. Genet* 92: 336-338, 1993

Nicholls y col., 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91

Nothen y col., J. Med. Genet. 30: 708-712, 1993

Piatak y col., 1993, *BioTechniques* 14:70-81

5 **Piatak** y col., 1993, *Science* 259:1749-1754

Pilla y col., *Nature* 400: 371-375, 1999

10 **Porath** y col., 1992, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281

Roberge y col., 1995, *Science* 269, 202-204

Rybakowski y col., *Molec. Psychiat.* 6: 718-724, 2001

15 **Shaikh** y col., *J. Med. Genet.* 30: 308-309, 1993

Sjolander, Urbaniczky, 1991, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345

20 **Sokoloff** y col., *Nature* 347:146-151, 1990

Spurlock y col., *Am. J. Med. Genet.* 81: 24-28, 1998

Szabo y col., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705

25 **Thomas**, 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:5201-5205

Uhlmann y col., 1987, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542

30 **Weber** y col., 1990, *Genomics* 7: 524-30

Wigler y col., 1977, *Cell* 11, 223-32

Wigler y col., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 3567-70

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* de detección selectivo de agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende las etapas de
 - i) determinar la actividad de un polipéptido de DRD3 a una cierta concentración de un compuesto de prueba o en ausencia de dicho compuesto de prueba,
 - ii) determinar la actividad de dicho polipéptido a una concentración diferente de dicho compuesto de prueba.
2. Un procedimiento *in vitro* de detección selectivo de agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende las etapas de
 - i) determinar la actividad de un polipéptido de DRD3 a una cierta concentración de un compuesto de prueba,
 - ii) determinar la actividad de un polipéptido de DRD3 en presencia de un compuesto del que se sabe que es un regulador de un polipéptido de DRD3.
3. Un procedimiento *in vitro* de detección selectivo de agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, precedente a los procedimientos de la reivindicación 1 ó 2 y que comprende las etapas de
 - i) poner en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido de DRD3,
 - ii) detectar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho polipéptido de DRD3.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de poner en contacto es dentro o en la superficie de una célula.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula está *in vitro*.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de poner en contacto se realiza en un sistema sin células.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido está acoplado a un marcador detectable.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto está acoplado a un marcador detectable.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto de prueba desplaza a un ligando que se une primero al polipéptido.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido está unido a un soporte sólido.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto está unido a un soporte sólido.
12. Un procedimiento *in vitro* de detección selectivo de agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades compuestas por insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero, que comprende las etapas de
 - i) poner en contacto un compuesto de prueba con un polinucleótido de DRD3,
 - ii) detectar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho polinucleótido de DRD3.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la molécula de ácido nucleico es ARN.
14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la etapa de contacto se realiza dentro o en la superficie de una célula.
15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la etapa de contacto se realiza en un sistema sin células.

ES 2 308 157 T3

16. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el polinucleótido está acoplado a un marcador detectable.

17. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el compuesto de prueba está acoplado a un marcador detectable.

18. Uso de

i) un oligonucleótido antisentido,

ii) un anticuerpo, o

iii) una ribozima.

que regulan la actividad de un polipéptido de DRD3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero.

19. Uso de un polinucleótido de DRD3 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio, aterosclerosis y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero.

20. Uso de un polipéptido de DRD3 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistentes en insuficiencia cardíaca, enfermedades isquémicas del corazón, infarto de miocardio y enfermedades vasculares periféricas en un mamífero.

Fig. 1

SEQ ID NO: 1

ATGGCATCTCTGAGTCAGCTGAGTAGCCACCTGAACTACACCTGTGGG
GCAGAGAACTCCACAGGTGCCAGCCAGGCCCGCCACATGCCTACTAT
GCCCTCTCCTACTGCGCGCTCATCCTGGCCATCGTCTTCGGCAATGGC
CTGGTGTGCATGGCTGTGCTGAAGGAGCGGGCCCTGCAGACTACCACC
AACTACTTAGTAGTGAGCCTGGCTGTGGCAGACTTGCTGGTGGCCACC
TTGGTGATGCCCTGGGTGGTATACCTGGAGGTGACAGGTGGAGTCTGG
AATTTAGCCGCATTTGCTGTGATGTTTTTGTCAACCCTGGATGTCATG
ATGTGTACAGCCAGCATCCTTAATCTCTGTGCCATCAGCATAGACAGG
TACACTGCAGTGGTCATGCCCGTTCACTACCAGCATGGCACGGGACAG
AGCTCCTGTCTGGCGCGTGGCCCTCATGATCACGGCCGTCTGGGTACTG
GCCTTTGCTGTGTCCTGCCCTCTTCTGTTTGGCTTTAATACCACAGGG
GACCCCACTGTCTGCTCCATCTCCAACCCTGATTTTGTCTACTCTCT
TCAGTGGTGTCTTCTACCTGCCCTTTGGAGTGACTGTCCTTGTCTAT
GCCAGAATCTATGTGGTGCTGAAACAAAGGAGACGGAAAAGGATCCTC
ACTCGACAGAACAGTCAGTGCAACAGTGTGAGGCCTGGCTTCCCCCAA
CAAACCCTCTCTCCTGACCCGGCACATCTGGAGCTGAAGCGTTACTAC
AGCATCTGCCAGGACACTGCCTTGGGTGGACCAGGCTTCCAAGAAAGA
GGAGGAGAGTTGAAAAGAGAGGAGAAGACTCGGAATTCCCTGAGTCCC
ACCATAGCGCCCAAGCTCAGCTTAGAAGTTCGAAAACCTCAGCAATGGC
AGATTATCGACATCTTTGAAGCTGGGGCCCCCTGCAACCTCGGGGAGTG
CCACTTCGGGAGAAGAAGGCAACCCAAATGGTGGCCATTGTGCTTGGG
GCCTTCATTGTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCTTGACCCATGTTCTCAAT
ACCCACTGCCAGACATGCCACGTGTCCCCAGAGCTTTACAGTGCCACG
ACATGGCTGGGCTACGTGAATAGCGCCCTCAACCCTGTGATCTATACC
ACCTTCAATATCGAGTTCGGGAAAGCCTTCCTCAAGATCCTGTCTTGC
TGA

Fig. 2

SEQ ID NO: 2

MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALSICALILAIVFGNG
LVCMAVLKERALQTTTNYLVVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVTGGVW
NFSRICCDVFVTLDVMMCTASILNLCAISIDRYTAVVMPVHYQHGTGQ
SSCRRVALMITAVWVLAFAVSCPLLFGFNTTGDPTVCSISNPDFVIYS
SVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKRILTRQNSQCNSVRPGFPQ
QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGEKREKTRNSLSP
TIAPKLSLEVRKLSNGRLSTSLKLGPLQPRGVPLREKKATQMVAIVLG
AFIVCWLPPFLTHVLNTHCQTCHVSPELYSATTWLGYVNSALNPVIYT
TFNIEFRKAFLKILSC

Fig. 3

SEQ ID NO: 3

5' - AAACCCTCTCTCCTGACCCG - 3'

Fig. 4

SEQ ID NO: 4

5' - ACCCAAGGCAGTGTCTGG - 3'

Fig. 5

SEQ ID NO: 5

5' - CACATCTGGAGCTGAAGCGTTACTACAGCA - 3'

ES 2 308 157 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Bayer AG, BHC	
5	<120> Diagnósticos y tratamientos para enfermedades asociadas con el RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D3 (DRD3)	
	<130> Le A 36 640	
	<160> 5	
	<170> Patente In versión 3.1	
10	<210> 1	
	<211> 1203	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
20	atggcatctc tgagtcagct gagtagccac ctgaactaca cctgtggggc agagaactcc 60	
	acaggtgccca gccaggcccg cccacatgcc tactatgccc tctcctactg cgcgctcatc 120	
	ctggccatcg tcttcggcaa tggcctggtg tgcattggtg tgctgaagga gcgggccctg 180	
	cagactacca ccaactactt agtagtgagc ctggctgtgg cagacttgct ggtggccacc 240	
25	ttggtgatgc cctgggtggt atacctggag gtgacaggtg gaggctggaa ttccagccgc 300	
	atctgtctgt atgtttttgt caccctggat gtcattgatg gtacagccag catccttaat 360	
	ctctgtgccca tcagcataga caggtagact gcagtggtca tgcccggtca ctaccagcat 420	
	ggcacgggac agagctcctg tcggcgctg gccctcatga tcacggccgt ctgggtactg 480	
30	gcctttgctg tgcctgccc tcttctggtt ggctttaata ccacagggga cccactgtc 540	
	tgctccatct ccaacctga ttttgtcatc tactcttcag tgggtgcctt ctacctgccc 600	
	tttgagtgga ctgtccttgt ctatgccaga atctatgtgg tgctgaaaca aaggagacgg 660	
	aaaaggatcc tcactcgaca gaacagtcag tgcaacagtg tcaggcctgg cttcccccaa 720	
35	caaacctct ctctgaccc ggcacatctg gagctgaagc gttactacag catctgccag 780	
	gacactgcct tgggtggacc aggcttccaa gaaagaggag gagagttgaa aagagaggag 840	
	aagactcgga attccctgag tcccaccata gcgcccaagc tcagcttaga agttcgaaaa 900	
40	ctcagcaatg gcagattatc gacatctttg aagctggggc ccctgcaacc tcggggagtg 960	
	ccacttcggg agaagaaggc aacccaaatg gtggccattg tgcttggggc cttcattgtc 1020	
	tgctggctgc cttctctctt gaccatgtt ctcaataccc actgccagac atgccacgtg 1080	
	tcccagagc tttacagtgc cagcatgg ctgggctacg tgaatagcgc cctcaacctt 1140	
45	gtgatctata ccacctcaa tatcaggttc cggaaagcct tcctcaagat cctgtcttgc 1200	
	tga 1203	
50	<210> 2	
	<211> 400	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 2	
	Met Ala Ser Leu Ser Gln Leu Ser Ser His Leu Asn Tyr Thr Cys Gly	
60	1 5 10 15	
	Ala Glu Asn Ser Thr Gly Ala Ser Gln Ala Arg Pro His Ala Tyr Tyr	
	20 25 30	
65	Ala Leu Ser Tyr Cys Ala Leu Ile Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Gly	
	35 40 45	

ES 2 308 157 T3

	Leu	Val	Cys	Met	Ala	Val	Leu	Lys	Glu	Arg	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr	Thr
	50						55					60				
5	Asn	Tyr	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Val	Ala	Thr
	65					70				75					80	
	Leu	Val	Met	Pro	Trp	Val	Val	Tyr	Leu	Glu	Val	Thr	Gly	Gly	Val	Trp
					85					90					95	
10	Asn	Phe	Ser	Arg	Ile	Cys	Cys	Asp	Val	Phe	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Met
				100				105					110			
	Met	Cys	Thr	Ala	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Cys	Ala	Ile	Ser	Ile	Asp	Arg
15			115					120				125				
	Tyr	Thr	Ala	Val	Val	Met	Pro	Val	His	Tyr	Gln	His	Gly	Thr	Gly	Gln
	130						135					140				
	Ser	Ser	Cys	Arg	Arg	Val	Ala	Leu	Met	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Val	Leu
20	145					150				155					160	
	Ala	Phe	Ala	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Leu	Phe	Gly	Phe	Asn	Thr	Thr	Gly
					165					170					175	
25	Asp	Pro	Thr	Val	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Pro	Asp	Phe	Val	Ile	Tyr	Ser
				180					185					190		
	Ser	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Leu	Pro	Phe	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Val	Tyr
			195					200				205				
30	Ala	Arg	Ile	Tyr	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg	Ile	Leu
	210						215					220				
	Thr	Arg	Gln	Asn	Ser	Gln	Cys	Asn	Ser	Val	Arg	Pro	Gly	Phe	Pro	Gln
35	225					230				235					240	
	Gln	Thr	Leu	Ser	Pro	Asp	Pro	Ala	His	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr
					245					250					255	
	Ser	Ile	Cys	Gln	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Phe	Gln	Glu	Arg
40				260					265					270		
	Gly	Gly	Glu	Leu	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Thr	Arg	Asn	Ser	Leu	Ser	Pro
				275					280				285			
	Thr	Ile	Ala	Pro	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Lys	Leu	Ser	Asn	Gly
45	290					295						300				
	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Gly	Val
	305					310					315				320	
50	Pro	Leu	Arg	Glu	Lys	Lys	Ala	Thr	Gln	Met	Val	Ala	Ile	Val	Leu	Gly
					325					330					335	
	Ala	Phe	Ile	Val	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe	Leu	Thr	His	Val	Leu	Asn
				340					345					350		
55	Thr	His	Cys	Gln	Thr	Cys	His	Val	Ser	Pro	Glu	Leu	Tyr	Ser	Ala	Thr
			355					360					365			
	Thr	Trp	Leu	Gly	Tyr	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Val	Ile	Tyr	Thr
60	370					375						380				
	Thr	Phe	Asn	Ile	Glu	Phe	Arg	Lys	Ala	Phe	Leu	Lys	Ile	Leu	Ser	Cys
	385					390					395				400	

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

ES 2 308 157 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo	
5	<400> 3	
	aaaccctctc tctgacccg	20
10	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
20	<400> 4	
	acccaaggca gtgtcctgg	19
25	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> sonda	
35	<400> 5	
	cacatctgga gctgaagcgt tactacagca	30
40		
45		
50		
55		
60		
65		