

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
 INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
 PARIS

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

**2 642 075**

②1 N° d'enregistrement national :

**89 00918**

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 07 K 13/00; G 01 N 33/74, 33/566; C 12 P 21/02; C 12 N 15/70, 15/85.

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 25 janvier 1989.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR, Fondation privée reconnue d'utilité publique. — FR.*

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 30 du 27 juillet 1990.

⑦2 Inventeur(s) : Laurent Emorine ; Stefano Marullo ; Donn Strosberg.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann et Yves Plasseraud.

⑤4 Polypeptides ayant une activité de récepteur  $\beta$ -adrénergique chez l'homme, impliqués dans la réponse lipolytique, acides nucléiques codant pour ces polypeptides et utilisation de ces polypeptides pour le criblage de substance active sur ces polypeptides.

⑤7 L'invention a pour objet de nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur  $\beta$ -adrénergique contenant :

- la séquence de 402 acides aminés;
- ou un fragment de cette séquence, ce fragment étant tel que notamment :

- soit il contient néanmoins les sites contenus dans cette séquence et dont la présence est nécessaire pour que, lorsque ce fragment est exposé à la surface d'une cellule, il soit capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'un agoniste.

- soit il est susceptible d'être reconnu par des anticorps qui reconnaissent également la susdite séquence de 402 acides aminés, mais ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique  $\beta 1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta 2$ .

Ces polypeptides sont utiles pour le criblage de médicaments, actifs sur lesdits polypeptides et destinés au traitement de l'obésité, du diabète gras, ainsi que des hyperlipidémies.

81	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FR 2 642 075 - A1

D

POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR  $\beta$   
ADRENERGIQUE CHEZ L'HOMME, IMPLIQUES DANS LA REPONSE  
LIPOLYTIQUE, ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES  
5 POLYPEPTIDES ET UTILISATION DE CES POLYPEPTIDES POUR  
LE CRIBLAGE DE SUBSTANCE ACTIVE SUR CES  
POLYPEPTIDES.

L'invention a pour objet des polypeptides ayant  
une activité de récepteur  $\beta$ -adrénergique chez  
10 l'homme, et plus particulièrement impliqués dans la  
réponse lipolytique des tissus adipeux, et les gènes  
codant pour ces polypeptides.

L'invention est également relative

- à des vecteurs contenant les gènes codant pour des  
15 polypeptides ayant une activité  $\beta$ -adrénergique;
- à des hôtes cellulaires transformés par des gènes  
codant pour les susdits polypeptides,
- à des sondes nucléotidiques susceptibles de  
s'hybrider avec les gènes codant pour les susdits  
20 polypeptides,
- à des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés  
contre les susdits polypeptides et utilisables dans  
un but de diagnostic in vitro,
- à des trousse (ou kits) pour étudier le degré  
25 d'affinité de certaines substances pour les susdits  
polypeptides ,
- à des médicaments contenant des substances actives  
sur des susdits polypeptides ayant une activité de  
récepteur  $\beta$ -adrénergique, et plus particulièrement  
30 destinés au traitement de l'obésité, du diabète et  
de l'hyperlipidémie.

Les catécholamines telles que l'adrénaline et  
la noradrénaline, les agonistes synthétiques de ces  
catécholamines, qui miment leurs fonctions  
35 biologiques et les antagonistes, qui bloquent ces

fonctions, exercent leurs effets en se liant à des sites de reconnaissance (récepteurs adrénérgiques) spécifiques situés sur les membranes cellulaires.

5 Deux classes principales de récepteurs adrénérgiques ont été définies, les récepteurs adrénérgiques  $\alpha$  et les récepteurs adrénérgiques  $\beta$ .

10 Dans l'ensemble de ces deux classes, on distingue quatre sous-types de ces récepteurs aux catécholamines ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR). Leurs gènes ont été récemment isolés et identifiés (5-8). L'analyse de ces gènes a permis de reconnaître leur appartenance à une famille de récepteurs membranaires intégraux présentant certaines homologues (9-10), notamment au niveau de 7 régions transmembranaires. Celles-ci sont couplées à des protéines régulatrices, appelées protéines G, susceptibles de fixer des molécules de guanosine triphosphate (GTP).

15 Plus précisément, les protéines G sont des protéines ayant la capacité de s'interposer structuralement et fonctionnellement entre des récepteurs et des enzymes catalysant la production de médiateurs intracellulaires (tels que l'adénylate cyclase, la guanylate cyclase, les phospholipases, les kinases) ou entre des récepteurs et des canaux ioniques dont l'ouverture contrôlée entraîne un flux d'ions (tels que les ions calcium, potassium, sodium, hydrogène) dans la cellule.

20 Ces protéines ont des fonctions de transduction et de couplage.

30 La susdite famille de récepteurs est désignée par "famille R<sub>7</sub>G" (10). Elle comprend notamment les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, les récepteurs de la serotonine, les récepteurs des

35

neuropeptides, substance K et angiotensine II et les récepteurs visuels de la famille des opsines (9-10).

5 Jusqu'à une époque très récente, la définition des sous-types de récepteurs s'appuyait principalement sur l'analyse, dans les systèmes hétérogènes, des propriétés physiologiques et de liaison de différents ligands. Dans la famille R<sub>7</sub>G, plusieurs gènes codant pour des sous-types de récepteurs définis par leurs propriétés pharmacologiques ont été clonés et caractérisés. Des sondes obtenues à partir de ces gènes ont permis d'identifier des sous-types de récepteurs supplémentaires (11-12).

15 La nature exacte du récepteur adrénergique  $\beta$ , susceptible de moduler les fonctions physiologiques telles que la thermogénèse dans les cellules adipeuses, ainsi que la relaxation intestinale est restée obscure. En rapport avec cette dernière propriété, on a trouvé que l'isoproterenol inhibe toujours les contractions de l'ileum de cobaye induite par voie cholinergique (3), en dépit du blocage total des récepteurs adrénergiques connus du type  $\alpha$  et  $\beta$  avec la pentholamine et le propranolol.

25 En procédant à une étude détaillée des effets physiologiques des agonistes et de l'inhibition par les antagonistes des polypeptides ayant une activité de récepteur  $\beta$  adrénergique (1-3), a été émise l'hypothèse de l'existence d'un nouveau sous-type de récepteur  $\beta$  adrénergique.

30 Cette hypothèse a été remise en cause par une hypothèse contradictoire, résultant de l'analyse du contenu en récepteur  $\beta$  d'un tissu adipeux par des études de liaison. Cette analyse a conduit à la conclusion - qui constitue l'état de la technique le

35

plus récent - que les récepteurs  $\beta$  adrénergiques lipolytiques sont uniquement du sous-type  $\beta 1$  (13).

5 Par ailleurs, parmi les composés utilisés en pharmacopée moderne, une position dominante est occupée par les agonistes ou antagonistes  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta 1$  ou  $\beta 2$ -AR). Les médicaments disponibles peuvent, en dépit de leur remarquable efficacité, produire des effets secondaires, potentiellement dus à l'interaction avec d'autres récepteurs homologues.

10 L'invention lève l'incertitude en faveur de l'hypothèse antérieurement formulée, mais ultérieurement écartée de l'existence de polypeptides ayant une activité de récepteur  $\beta$  adrénergique autre que celle des récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Elle donne en effet accès à de nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur  $\beta$  adrénergique, ne s'apparentant ni à celle des récepteurs adrénergiques  $\beta 1$ , ni à celle des récepteurs adrénergiques  $\beta 2$ .

15 L'invention a également pour objet des procédés de criblage de nouveaux médicaments agissant sur les nouveaux polypeptides ayant une action de récepteur  $\beta$ -adrénergique et destinés entre autre au traitement de l'obésité, du diabète gras et du diabète des sujets non insulino-dépendants, ainsi qu'au traitement des hyperlipidémies.

20 En particulier, le nouveau polypeptide de l'invention ayant une activité de récepteur  $\beta$ -adrénergique :

25 - contient la séquence de 402 acides aminés de la Figure 1 ou un fragment de cette séquence, ce fragment étant tel que

30

35

\* soit il contient néanmoins les sites contenus dans cette séquence et dont la présence est nécessaire pour que, lorsque ce fragment est exposé à la surface d'une cellule, il soit capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'un agoniste, cette activation étant croissante dans l'ordre des agonistes suivants : salbutamol, BRL 28410, BRL 37344 et (1)-isoproterenol,

\* soit il est susceptible d'être reconnu par des anticorps qui reconnaissent également la susdite séquence de 402 acides aminés, mais ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique  $\beta 1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta 2$

\* soit il est susceptible de générer des anticorps qui reconnaissent la susdite séquence de 204 acides aminés mais ne reconnaissent ni le récepteur  $\beta 1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta 2$ .

La reconnaissance de la susdite séquence de 402 acides aminés par les susdits anticorps - ou du susdit fragment par les susdits anticorps - signifie que la susdite séquence forme un complexe avec l'un des susdits anticorps.

La formation du complexe antigène (c'est-à-dire séquence de 402 acides aminés ou susdit fragment)-anticorps et la détection de l'existence d'un complexe formé peuvent se faire de la façon suivante:

- on laisse incuber l'antigène et l'anticorps pendant 1h à température ambiante, puis pendant une nuit à 4°C, en tampon PLT;
- le tampon PLT ayant la composition suivante : 10 mM de phosphate de sodium, 145 mM de NaCl, 5% de

lait écrémé lyophilisé (p/v), 0.1% de Tween 20 (v/v), le pH étant de 7.4,

- on effectue ensuite quatre lavages de 5 min. avec le tampon PLT,

5 - on laisse incuber un deuxième anticorps biotynilé 1h à température ambiante en tampon PLT,

- on effectue quatre lavages de 5 min. en tampon PLT,

10 - on laisse incuber la streptavidine peroxydase, 1h à température ambiante en tampon PLT,

- on procède à quatre lavages en tampon PLT puis

- on effectue un lavage dans le milieu constitué par: 10 mM de phosphate de sodium, 145 mM de NaCl, 0.1% de Triton x 100, le pH étant de 7.4,

15 - on effectue un nouveau lavage dans le milieu ayant la composition indiquée ci-dessus, mais ne contenant pas de Triton x 100, puis

- on révèle le complexe antigène-anticorps formé par des techniques classiques.

20 Pour ce qui est de la définition des "fragments contenant les sites" et répondant à la susdite définition, on se reportera ci-après dans la description.

25 Les nouveaux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de l'invention sont donc caractérisés par des propriétés différentes de celles des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , en ce qu'ils se comportent de façon différente vis-à-vis de substances respectivement antagonistes et agonistes vis-à-vis de  $\beta_1$  et  $\beta_2$ .

30 La détermination de l'ordre dans lequel les polypeptides de l'invention participent à l'activation de l'adénylate cyclase en présence des agonistes respectivement présents : salbutamol, BRL 28410, BRL 37344 et (1)-isoproterenol, est décrite

35

dans le commentaire relatif à la Figure 2C, qui fait suite à la présente description.

L'ordre indiqué ci-dessus est totalement différent de celui obtenu avec les mêmes agonistes, lors des réponses médiatisées par l'intermédiaire des récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  ou  $\beta_2$ .

Pour des cellules "CHO- $\beta_3$ " définies ci-après, cet ordre est voisin de celui déterminé pour la stimulation de la lipolyse dans des cellules adipeuses de rat (1). La seule différence est constituée par l'ordre relatif entre l'isoproterenol et BRL 37344. Cependant, l'isoproterenol dont il est question dans l'invention est l'isomère lévogyre de l'isoproterenol alors que celui de la référence (1) est le mélange racémique (dl).

Le BRL 28410 est défini dans la référence (1).

Le BRL 37344 est défini dans la référence (1).

L'invention concerne également des protéines chimères dans lesquelles le polypeptide tel que défini plus haut ou des parties de celui-ci sont réunis à un enchaînement d'acides aminés hétérologue par rapport à ce polypeptide.

Des protéines chimères avantageuses de l'invention sont constituées par celles dans lesquelles l'enchaînement d'acides aminés hétérologue est choisi parmi la séquence du récepteur adrénergique  $\beta_1$  ou un fragment de ce récepteur ou la séquence du récepteur adrénergique  $\beta_2$  ou un fragment de ce récepteur.

Les polypeptides et protéines chimères de l'invention peuvent être glycosylés et peuvent comporter ou non des ponts disulfure.

Dans la suite de la description, les polypeptides de l'invention seront, pour simplifier, désignés par "récepteurs  $\beta 3$ ".

5 Les récepteurs  $\beta 3$  de l'invention sont également tels que la capacité à stimuler l'adenylate cyclase et/ou l'accumulation de l'AMP cyclique induite par l'isoproterenol, n'est pas inhibée par les composés suivants :

- 10 - practolol,  
- nadolol,  
- CGP 12,177,  
- butoxamine,  
- alprenolol,  
15 - propanolol,  
- pindolol,  
- oxprenolol,

utilisés à des concentrations inférieures ou égales à  $10^{-4}$  M, dans les conditions suivantes :

20 . en ce qui concerne l'accumulation de l'AMP cyclique, des cellules sont cultivées et récoltées après traitement avec Versene/EDTA (Eurobio, Paris), lavées et resuspendues dans un milieu de Hank contenant 20 mM d'Hepes tamponnés à pH 7.4, de  
25 l'acide ascorbique 1 mM et de l'isobutyl-méthyle-xanthine 0.1 mM; des aliquotes de  $10^6$  cellules sont incubées pendant 30 minutes, avec les inhibiteurs à  $10^{-4}$ M avant l'addition de  $5 \cdot 10^{-9}$ M d'isoproterenol ; l'incubation est poursuivie encore pendant 30  
30 minutes, et on mesure les niveaux d'AMP cyclique, par exemple selon les spécifications de la trousse d'essais Amersham.

La stimulation de l'adenylate cyclase par les récepteurs  $\beta 3$  de l'invention, ainsi que la mesure de

35

l'accumulation de cAMP peuvent être effectuées selon des méthodes classiques.

Le CGP12,177 est un produit fabriqué par la société CIBA-GEIGY.

5 Les conditions utilisées sont semblables à celles dans lesquelles les susdits composés se comportent comme des antagonistes vis-à-vis des récepteurs adrénergiques  $\beta 1$  et  $\beta 2$ .

10 Les récepteurs  $\beta 3$  de l'invention sont également tels que le pindolol et l'oxprenolol favorisent l'accumulation de l'AMP cyclique dans des cellules CHO transfectées avec le susdit récepteur  $\beta 3$ , dans les conditions suivantes :

15 . en ce qui concerne l'accumulation de l'AMP cyclique, des cellules sont cultivées et récoltées après traitement avec Versene/EDTA (Eurobio, Paris), lavées et resuspendues dans un milieu de Hank contenant 20 mM d'Hepes tamponnés à pH 7.4, de l'acide ascorbique 1 mM et de l'isobutyl-méthyle-  
20 xanthine 0.1 mM; des aliquotes de  $10^6$  cellules sont incubées pendant 30 minutes, dans un volume total de 1 ml avec des concentrations de pindolol ou d'oxprenolol supérieures à  $10^{-11}$ M et les niveaux de  
25 cAMP sont mesurés par exemple selon les spécifications de la trousse d'essai Amersham.

Un récepteur  $\beta 3$  avantageux de l'invention est constitué par l'enchaînement des acides aminés 1 à 402, représentés sur la Figure 1.

30 Ce récepteur  $\beta 3$  est considéré comme comportant sept régions transmembranaires hydrophobes séparées par des boucles hydrophiles intra et extracellulaires.

L'invention concerne également les polypeptides  
35 variants qui correspondent aux polypeptides sus-

définis comportant certaines mutations localisées, sans que les polypeptides ne perdent les propriétés de récepteur  $\beta_3$ -adrénergique. Parmi ces variants, on peut mentionner ceux qui sont reconnus par des anticorps reconnaissant les régions transmembranaires, ainsi que ceux qui sont reconnus par des anticorps reconnaissant les régions autres que les régions transmembranaires.

L'invention concerne également des acides nucléiques qui comprennent ou qui sont constitués par un enchaînement de nucléotides codant pour l'un quelconque des récepteurs  $\beta_3$  précédemment définis.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'acide nucléique qui comprend l'enchaînement de nucléotides représenté sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1 à celle constituée par le nucléotide en position 2022.

L'invention concerne également l'acide nucléique représenté sur la Figure 1bis comprenant ou étant constitué par l'enchaînement s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 638 à celle constituée par le nucléotide en position 1843.

L'acide nucléique sus-défini correspond à la partie codante du gène correspondant au polypeptide représenté sur la Figure 1.

Font également partie de l'invention les acides nucléiques variants par rapport à ceux sus-définis et qui comportent certaines mutations localisées dans la mesure où ces acides nucléiques variants s'hybrident avec les acides nucléiques précédemment définis ou avec les sondes nucléiques définies ci-

après dans les conditions d'hybridation définies ci-après dans la description.

5 L'invention concerne également les vecteurs recombinants, en particulier pour le clonage et/ou l'expression, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, contenant un acide nucléique de l'invention en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication.

10 L'invention concerne également le vecteur M13mp18-Huβ3, (n°1085), constitué par un bactériophage déposé sous le n°I-833 le 20 janvier 1989 à la CNCM, 25 rue du Docteur Roux, Paris.

15 Un vecteur approprié de l'invention, contient en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression d'un polypeptide selon l'invention, dans un hôte cellulaire et éventuellement un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence signal et une séquence d'ancrage.

20 L'invention concerne également un hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant défini précédemment comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléotidique codant pour l'un des polypeptides selon l'invention dans cet hôte.

25 Par hôte cellulaire on entend tout organisme susceptible d'être maintenu en culture.

30 L'un des microorganismes utilisés peut être constitué par une bactérie, notamment Escherichia Coli.

Un organisme de choix est constitué par un organisme eucaryotes tel que des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary).

5 Mais d'autres organismes peuvent être utilisés tout aussi aisément, naturellement sous réserve que l'on dispose pour chacun d'entre eux des vecteurs, notamment plasmidiques, susceptibles de s'y répliquer et des séquences de nucléotides insérables dans ces vecteurs. et capables, lorsqu'elles sont  
10 suivies dans ces vecteurs par un insérat codant pour un polypeptide de l'invention, d'assurer l'expression de cet insérat dans les organismes choisis et leur transport dans les membranes de ces hôtes cellulaires.

15 L'invention concerne également les anticorps dirigés de façon spécifique contre l'un des polypeptides de l'invention, ces anticorps étant tels qu'ils ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique  $\beta 1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta 2$ . En  
20 particulier, ces anticorps reconnaissent les séquences d'acides aminés suivantes :

1 à 36	178 à 201
64 à 74	223 à 291
101 à 108	314 à 325
25 133 à 135	345 à 403

Pour obtenir les anticorps, on peut injecter chez l'animal l'un de susdits polypeptides.

30 On prépare des anticorps monoclonaux par fusion cellulaire entre des cellules de myélome et des cellules spléniques de souris immunisées, selon les procédés classiques.

L'invention concerne également les sondes nucléotidiques synthétiques ou non, s'hybridant avec  
35 l'un des acides nucléiques définis ci-dessus ou

leurs séquences complémentaires ou leur ARN correspondant, ces sondes étant telles qu'elles s'hybrident ni avec le gène ou l'ARN messager des récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques.

Les sondes de l'invention comportent au minimum 10, avantageusement 15 acides nucléiques et peuvent comporter au maximum la totalité de la séquence nucléotidique représentée sur la figure 1bis.

Pour les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont les suivantes:

750 mM de NaCl, 75 mM de Tri-sodium citrate, 50  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN de sperme de saumon, 50 mM de phosphate de sodium, 1 mM de pyrophosphate de sodium, 100  $\mu\text{M}$  d'ATP, 10 à 25% de formamide, 1% Ficoll (Pharmacia poids moléculaire moyen de 400,00), 1% de polyvinylpyrrolidone, 1% de serum albumine bovine - pendant 14 à 16 h à 42°C.

Pour les sondes les plus longues, c'est-à-dire présentant plus d'environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont celles indiquées précédemment pour les sondes les plus courtes, mais dans lesquelles le milieu sus-défini contient 40% de formamide au lieu de 10 à 25% de formamide et contient en plus 10% de sulfate de dextrane.

L'invention concerne en particulier les sondes nucléotidiques suivantes :

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le

nucléotide en position 1, à celle constituée par le  
nucléotide en position 637

5 . - celle définie par la séquence d'acides  
nucléiques représentée sur la Figure 1bis,  
s'étendant de l'extrémité constituée par le  
nucléotide en position 638 à celle constituée par le  
nucléotide en position 745,

10 . - celle définie par la séquence d'acides  
nucléiques représentée sur la Figure 1bis,  
s'étendant de l'extrémité constituée par le  
nucléotide en position 1313, à celle constituée par  
le nucléotide en position 1513,

15 . - celle définie par la séquence d'acides  
nucléiques représentée sur la Figure 1bis,  
s'étendant de l'extrémité constituée par le  
nucléotide en position 1679, à celle constituée par  
le nucléotide en position 1843,

20 . - celle définie par la séquence d'acides  
nucléiques représentée sur la Figure 1bis,  
s'étendant de l'extrémité constituée par le  
nucléotide en position 1844, à celle constituée par  
le nucléotide en position 2022,

25 . - celle définie par la séquence d'acides  
nucléiques représentée sur la Figure 1bis,  
s'étendant de l'extrémité constituée par le  
nucléotide en position 638, à celle constituée par  
le nucléotide en position 1843.

30 Les polypeptides de l'invention peuvent être  
préparés par culture dans un milieu approprié d'un  
hôte cellulaire préalablement transformé par un  
vecteur recombinant contenant l'un des acides  
nucléiques définis précédemment et par récupération  
à partir de la susdite culture du polypeptide  
produit par ledit hôte cellulaire transformé.

35

S'agissant de réaliser l'expression des récepteurs adrénergiques  $\beta 3$  dans une bactérie, telle que E. coli ou dans une cellule eucaryote telle qu'une cellule CHO, on effectue les étapes suivantes

5

:

- la transformation d'un hôte cellulaire compétent avec un vecteur, notamment un plasmide ou un phage, dans lequel a auparavant été insérée une séquence de nucléotides codant pour le récepteur  $\beta 3$  (insérat), sous le contrôle d'éléments de régulation, notamment d'un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire et permettant l'expression dans l'hôte cellulaire utilisé de ladite séquence de nucléotides,

10

- la culture de l'hôte cellulaire transformé dans des conditions permettant l'expression dudit insérat, et le transport du récepteur  $\beta 3$  exprimé vers la membrane de façon telle que les séquences transmembranaires du récepteur  $\beta 3$  soient exposées à la surface de l'hôte cellulaire transformé.

15

20

S'agissant de l'expression en cellules eucaryotes, les éléments de régulation peuvent comporter le promoteur endogène des récepteurs adrénergiques ou des promoteurs viraux tels que ceux des virus 5V40 ou du virus du sarcom de Roux (RSV).

25

S'agissant de l'expression dans E. coli, les éléments de régulation peuvent comporter le promoteur de l'opéron lactose ou de l'opéron tryptophane.

30

L'invention concerne également un procédé de détection de la capacité d'une molécule à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un polypeptide de l'invention, lequel procédé comprend : - la mise en contact de la molécule avec un hôte cellulaire

35

préalablement transformé par un vecteur lui-même  
modifié par un insérat codant pour le susdit  
polypeptide, cet hôte portant à sa surface un ou  
plusieurs sites spécifiques de ce polypeptide, le  
5 cas échéant après induction de l'expression de cet  
insérat, cette mise en contact étant effectuée dans  
des conditions permettant la formation d'une liaison  
entre l'un au moins de ces sites spécifiques et  
ladite molécule dès lors qu'elle s'avèrerait  
10 effectivement posséder une affinité pour ce  
polypeptide,

- la détection de la formation éventuelle d'un  
complexe du type ligand-polypeptide.

L'invention concerne également un procédé pour  
15 l'étude de l'affinité d'un polypeptide de  
l'invention pour un ou plusieurs ligands déterminés,  
lequel procédé comprend :

- la transformation d'un hôte cellulaire compétent  
avec un vecteur, notamment un plasmide ou un phage,  
20 dans lequel avait auparavant été insérée une  
séquence de nucléotides codant pour le récepteur  $\beta 3$   
(insérat), sous le contrôle d'éléments de  
régulation, notamment d'un promoteur reconnu par les  
polymérases de l'hôte cellulaire et permettant  
25 l'expression dans l'hôte cellulaire utilisé de  
ladite séquence de nucléotides,

- la culture de l'hôte cellulaire transformé dans  
des conditions permettant l'expression dudit  
insérat, et le transport du récepteur  $\beta 3$  exprimé  
30 vers la membrane de façon telle que les séquences  
transmembranaires du récepteur  $\beta 3$  soient exposées à  
la surface de l'hôte cellulaire transformé,

- la mise en contact de cet hôte cellulaire avec ces  
ligands déterminés,

35

- la détection d'une réaction affine entre ledit hôte cellulaire transformé et lesdits ligands déterminés.

5 Le procédé décrit ci-dessus permet également l'identification des "fragments contenant les sites" dont question précédemment et qui ne comportent qu'une partie de la séquence de 402 acides aminés de la figure 1.

10 Cette identification consiste à utiliser des insérats de taille plus réduite que l'acide nucléique codant pour la susdite séquence, à mettre en oeuvre les étapes relatives à l'expression, au transport du produit d'expression et à l'exposition  
15 appelées ci-dessus. Lorsqu'on obtient l'expression, le transport du produit d'expression et son exposition sur la membrane, ainsi que la réaction avec les ligands telle que précédemment définie, on peut déterminer ainsi les fragments contenant les sites essentiels. Par conséquent, l'absence de  
20 réaction avec les ligands, telle que précédemment définie, en utilisant des fragments de taille plus réduite que la séquence complète, tendrait à montrer qu'on a éliminé certains sites essentiels.

25 L'invention concerne également un kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un polypeptide de l'invention, lequel kit comprend:  
- une culture d'hôtes cellulaires transformés par un vecteur modifié tel que défini précédemment ou une  
30 culture d'hôtes cellulaires définis précédemment,  
- des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression de la séquence nucléotidiques contenue dans le vecteur modifié lorsque le promoteur placé en amont de cette séquence est un promoteur

35

inductible par lesdits moyens physiques ou chimiques, et obtenir une protéine,

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour le susdit polypeptide,
- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique de la protéine exprimée.

L'invention concerne également un procédé de criblage de médicaments destinés au traitement de l'obésité, du diabète gras, ainsi que des hyperlipidémies.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples, notamment en rapport avec les dessins et tableaux dans lesquels :

- La Figure 1 représente les séquences d'acides aminés du récepteur adrénergique  $\beta 1$  (deuxième ligne) humain, du récepteur adrénergique  $\beta 2$  humain (troisième ligne), alignées avec celles du récepteur adrénergique  $\beta 3$  humain (première ligne). Dans les séquences des récepteurs adrénergiques  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , les résidus d'acides aminés identiques et en position analogue à ceux du récepteur adrénergique  $\beta 3$  sont marqués par des traits pointillés.

Pour mettre en évidence les homologues, on a effectué des délétions dans les trois séquences, et ces délétions sont représentées par les espaces entre crochets.

Les sept régions hydrophobes de 21 à 27 résidus qui sont considérées comme formant des domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$  sont indiquées avec des traits pleins gras et délimitent des boucles extra-cellulaires et intra-cellulaires, les boucles extra-cellulaires étant représentées par 01-04 sur

la Figure et les boucles intra-cellulaires par il à i4.

Dans les régions N-terminale extra-cellulaires des trois récepteurs, les séquences consensus pour les sites de glycosylation liés à l'asparagine (NXS/T) sont soulignées, étant rappelé que dans la représentation des acides aminés selon DAYHOFF, N représente l'asparagine, S représente la sérine, T représente la thréonine, X représente n'importe quel acide aminé.

Dans la troisième boucle intra-cellulaire et dans la région C-terminale, des triangles montrent les résidus Ser et Thr qui sont probablement impliqués dans la désensibilisation du récepteur.

- La Figure 2 représente l'accumulation d'AMP cyclique dans des cellules CHO- $\beta$ 3 après exposition à A, (l)-isoproterenol ( $\blacktriangle$ ), (l)-noradrénaline (o), (l)-adrénaline ( $\bullet$ ) ou, (d)-isoproterenol ( $\nabla$ ) et B; BRL 7344 ( $\blacksquare$ ), oxprenolol ( $\square$ ), pindolol (o) ou salbutamol ( $\bullet$ ). Les valeurs  $K_{act}$  (nM) sont :  $3.86 \pm 0.43$  pour le (l)-isoproterenol,  $5.65 \pm 1.32$  pour le BRL 37344,  $6.28 \pm 0.80$  pour la noradrénaline,  $47.4 \pm 6.9$  pour l'adrénaline,  $76.3 \pm 1.57$  pour l'oxprenolol,  $108 \pm 3$  pour le (d)-isoproterenol,  $167 \pm 10$  pour le pindolol et  $273 \pm 25$  pour le salbutamol.

Dans ces expériences, l'accumulation d'AMP cyclique varie de 300% à 400% par rapport à des niveaux de base et les résultats sont exprimés en % de réponse maximale (moyenne  $\pm$  écart type [n=4 à 6]) induite par chacun des ligands. Dans les cellules CHO, ni la noradrénaline, ni l'adrénaline, ni l'isoproterenol n'activent l'adénylate cyclase.

L'agoniste procaterol spécifique de  $\beta 2$  stimule l'adénylate cyclase à des concentrations supérieures à  $10^{-5}M$  (non représenté).

C; stimulation de cyclase par isoproterenol, BRL 37344, BRL 28410 et salbutamol dans des cellules CHO exprimant des gènes  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  ou  $\beta 3$ . Pour chacun des panneaux, les résultats sont la moyenne de deux à trois expériences faites deux fois. La moitié de l'écart type est représentée pour chacun par des barres verticales. Trois concentrations de ligands ont été utilisées :  $5 \times 10^{-9}$  (1),  $5 \times 10^{-7}$  (2) et  $10^{-4}$  (3).

Les résultats représentent le % [moyenne  $\pm$  écart type (n=4 à 6)] de la réponse induite par l'isoproterenol  $10^{-4}M$ .

La méthode utilisée est la suivante : la région codante du gène du récepteur adrénergique  $\beta 3$  a été insérée sous contrôle d'un promoteur SV40 dans un vecteur d'expression (20) qui contient également le gène de dihydrofolate réductase murine (DHFR) utilisé pour la sélection des cellules transfectantes. Cette construction a été introduite dans des cellules de CHO (21) déficientes en DHFR, donnant des colonies résistantes au milieu sélectif à partir duquel des sous-clones stables sont obtenus. L'expression du gène récepteur adrénergique  $\beta 3$  est démontrée par hybridation de l'ARN à une sonde spécifique du récepteur adrénergique  $\beta 3$  (Figure 4). Pour le test de l'AMP cyclique, des cellules sont cultivées et récoltées après traitement avec Versene/EDTA (Eurobio, Paris), lavées et resuspendues dans un milieu de Hank contenant 20 mM d'Hepes tamponnés à pH 7.4, de l'acide ascorbique 1 mM et de l'isobutyl-méthyle-

incubées pendant 30 min., dans un volume total de 1 ml avec des concentrations indiquées d'agonistes et des niveaux de cAMP sont mesurés selon les spécifications de la trousse d'essai Amersham.

5 - La Figure 3 représente l'inhibition par les antagonistes  $\beta$ -adrénergiques de l'accumulation d'AMP cyclique induite par l'isoproterenol dans des cellules de CHO- $\beta$ 1, CHO- $\beta$ 2 et CHO- $\beta$ 3. Les résultats sont exprimés en % (moyenne  $\pm$  SD (n=4 à 6])  
10 d'accumulation d'AMP cyclique induite par l'isoproterenol seul. Les composés ICI, 118551 (fabriqué par la société IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRY) et CGP 20712A (fabriqué par la société CIBA-GEIGY), bloquent l'accumulation d'AMP cyclique avec des Ki  
15 respectif calculés de  $0,77 \pm 0,08 \mu\text{M}$  et de  $6,70 \pm 0,87 \mu\text{M}$ . Le metoprol n'a pas d'effet à des concentrations inférieures à  $10^{-5}\text{M}$ .

La méthode utilisée est la suivante : les cellules, comme dans la Figure 2, sont incubées  
20 pendant 30 min., avec les inhibiteurs à  $10^{-4}\text{M}$  avant l'addition de  $5 \cdot 10^{-9}\text{M}$  d'isoproterenol. L'incubation est poursuivie encore pendant 30 min., et on mesure les niveaux d'AMP cyclique.

- La Figure 4 représente des analyses de Northern Blot d'ARN de tissus et de lignées cellulaires.  
25 L'ARN à analyser provient de tissus de rats (2 $\mu\text{g}$  d'ARN polyA- de : cerveau total, cortex, hippocampe, hypothalamus, hypophyse, bulbe olfactif, striatum, cervelet, iléon, foie, coeur, poumon, rein, peau et muscle) et de lignées cellulaires  
30 humaines (5 $\mu\text{g}$  d'ARN polyA+ de : neuroblastomes, poumon et fibroblastes de poumon et d'épiderme, lymphocytes B et T, erythroblastes et myeloblastes).  
Aucun de ces ARN ne donne de signal détectable (les  
35

Aucun de ces ARN ne donne de signal détectable (les résultats sont montrés pour l'ileum). Un message spécifique est détecté dans l'ARN (15 $\mu$ G d'ARN total) à partir de lignées de cellules adipeuses 3T3-F442A ou à partir de cellules de CHO- $\beta$ 3 transfectées. Les valeurs S pour les marqueurs de poids moléculaire d'ARN sont représentés dans la marge gauche.

La méthode utilisée est la suivante : l'ARN est soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 0.7%, transféré sur des membranes de nylon et hybridé avec des sondes spécifiques des récepteurs adrénergiques  $\beta$ 3 marqués radioactivement par la méthode d'initiation aléatoire. Cette sonde dérive de la troisième boucle intracytoplasmique du récepteur adrénergique  $\beta$ 3 dont la séquence est faiblement conservée entre les trois récepteurs (positions 1313 à 1513 de la Figure 1bis). Suite à l'hybridation, les filtres sont lavés dans 0.1xSSC (c'est-à-dire 0.015 M NaCl et 0.0015 M citrate de sodium, pH 7.0) -0.05% SDS à 55°C. Dans ces conditions, aucun signal n'est obtenu avec l'ARN préparé à partir de cellules de CHO exprimant le récepteur adrénergique  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 2.

**EXEMPLE :**

Détermination et expression du récepteur adrénergique  $\beta$ 3 humain dans des cellules CHO :

On a investigué une banque génomique humaine avec les régions entières codantes du gène du récepteur adrénergique  $\beta$ 1 de la dinde (14) et du gène humain du récepteur adrénergique  $\beta$ 2 (8). Les gènes codant respectivement pour les récepteurs adrénergiques humains  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 ont été identifiés parmi les clones positifs. L'homologie entre leurs régions codantes est de 48.9%. On a obtenu d'autres clones contenant un gène sans intron, dont la région

(Figure 1). Ce gène a été désigné par gène du récepteur adrénergique  $\beta 3$ . Plus précisément, sur la Figure 1, chaque groupe de trois lignes correspond pour la première ligne à  $\beta 3$ , pour la seconde ligne à  $\beta 1$  et pour la troisième ligne à  $\beta 2$ .

Le gène du récepteur adrénergique  $\beta 3$  code pour un polypeptide de 402 résidus amino acides (poids moléculaire 42881D) qui présente les principales caractéristiques communes aux autres récepteurs membranaires de la famille  $R_7G$  (Figure 1). Il possède sept groupes, de 21 à 27 amino acides essentiellement hydrophobes, susceptibles de constituer des domaines transmembranaire en hélice  $\alpha$ . Ces domaines transmembranaires jouent un rôle important dans la formation des sites de reconnaissance des catécholamines par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (15-18) et sont assurément les régions les plus homologues entre les trois protéines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  (Figure 1). En particulier, les résidus Asp en position 79 et 113 du récepteur adrénergique  $\beta 2$ , qui peuvent agir comme des contre-ions vis-à-vis de l'amine chargée positivement des ligands adrénergiques (18), sont conservés aux positions analogues du récepteur adrénergique  $\beta 3$ . D'autres résidus fonctionnellement importants tels que les résidus Cys en position 106, et 184, Asn en position 318 et Pro en position 323 de la séquence du récepteur adrénergique  $\beta 2$  sont présents aux positions correspondantes sur le récepteur adrénergique  $\beta 3$ .

Comme les autres protéines  $R_7G$ , le récepteur adrénergique  $\beta 3$  comprend dans sa région amino terminale des séquences consensus pour les sites de glycosylation liés à l'Asn. Dans sa troisième boucle

intra-cytoplasmique et dans sa région C-terminale, le récepteur adrénergique  $\beta_3$  présente plusieurs résidus Ser et Thr, encadrés par des résidus basiques (Arg et Lys) et des résidus cassant les structures en hélice  $\alpha$  (Pro et Gly), qui peuvent servir de substrats pour les kinases éventuellement engagées dans la désensibilisation du récepteur (19).

Pour mieux caractériser le récepteur adrénergique  $\beta_3$ , son gène a été transfecté dans des cellules CHO et plusieurs clones, produisant l'ARN correspondant, ont été stabilisés. Ces cellules sont désignées par cellules "CHO- $\beta_3$ ". Des cellules CHO exprimant soit le gène du récepteur adrénergique  $\beta_1$ , soit le gène du récepteur adrénergique  $\beta_2$ , ont été également préparées pour comparer les propriétés pharmacologiques des trois récepteurs dans un environnement identique. Ces cellules sont désignées par cellules CHO- $\beta_1$  et CHO- $\beta_2$ . Les cellules CHO- $\beta_3$  synthétisent une protéine de poids moléculaire apparent d'environ 65000D, qui peut être visualisée par marquage d'affinité avec l' $^{125}$ I-iodocyanopindolol-diazirine. L'addition post-transcriptionnelle de résidus glucidiques à l'un ou aux deux sites de glycosylation de l'extrémité amino-terminale du récepteur adrénergique  $\beta_3$ , est certainement responsable de ce poids moléculaire supérieur à celui déduit de la séquence d'acides aminés.

L'exposition des cellules CHO- $\beta_3$  aux agonistes  $\beta$ -adrénergiques (Figure 2) tels que l'adrénaline, la noradrénaline, l'isoproterenol, le salbutamol, le BRL 28410 ou le BRL 37344 accroît la concentration intracellulaire d'AMP cyclique de 300% à 400% par

35

rapport à des niveaux de base, tandis qu'il n'y a pas d'influence sur des cellules CHO non transfectées. Cet effet est stéréospécifique, étant donné que l'isoproterenol-(l) est presque 30 fois plus puissant que le (d)-isoproterenol vis-à-vis de l'activation de la cyclase. D'autres agonistes- $\beta$  tels que le procaterol et le CGP 361A conduisent à une stimulation de cyclase seulement lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations supérieures à  $10^{-5}$ M.

L'ordre dans lequel les composés suivants : (l)-isoproterenol, BRL 37344, BRL 28410 et salbutamol activent l'adénylate cyclase dans les cellules CHO- $\beta$ 3 est clairement différent de celui obtenu pour les réponses médiatisées par les récepteurs adrénergiques  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 2 (Figure 2C). Pour les cellules CHO- $\beta$ 3, cet ordre est voisin de celui déterminé pour la stimulation de la lipolyse des cellules adipeuses de rats. La seule différence est l'ordre relatif de l'isoproterenol comparé au BRL 37344. Cependant, dans la référence citée, c'est le (dl)-isoproterenol racémique qui a été utilisé alors que, dans l'invention, on a utilisé le lévogyre (l)-isoproterenol.

On a effectué l'analyse dans des cellules CHO- $\beta$ 3, de la capacité de plusieurs  $\beta$ -antagonistes classiques à bloquer l'activation de l'adénylate cyclase stimulée par l'isoproterenol (Figure 3). A part l'ICI 118,551, le CGP 20,712A et le metoprolol, aucun de ces composés utilisés à  $10^{-4}$ M n'est capable d'inhiber cet effet. A des concentrations inférieures à  $10^{-5}$ M, le metoprolol n'a plus d'effets et l'ICI 118,551 et le CGP 20,712A bloquent l'accumulation d'AMP cyclique avec des  $K_i$  respectifs de  $0.77 \pm 0.08 \mu\text{M}$  et  $6.70 \pm 0.87 \mu\text{M}$ . En accord avec

ces résultats, ni les cellules CHO- $\beta$ 3 intactes, ni leurs fractions membranaires ne représentent de liaison spécifique et saturable vis-à-vis de l'alprenolol ou du CGP 12,177 marqué au  $^3\text{H}$ . De plus, le  $K_D$  de  $^3\text{H}$ -iodocyanopindolol pour le récepteur adrénergique  $\beta$ 3 ( $488 \pm 90$  pM) est environ 10 fois supérieur à celui pour les récepteurs adrénergiques  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 2.

Selon des études in vitro, le pindolol et l'oxprenolol sont considérés comme des antagonistes  $\beta$ -adrénergiques. Cependant, ils sont aussi considérés comme des agonistes partiels puisqu'in vivo ils peuvent présenter une légère activité sympathomimétique (22). Dans les cellules CHO transfectées avec un seul type de récepteur, ces composés sont complètement agonistes vis-à-vis du récepteur adrénergique  $\beta$ 3 (Figure 2), tandis qu'ils bloquent totalement l'accumulation d'AMP cyclique médiatisée par les récepteurs adrénergiques  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 (Figure 3).

Ce nouveau sous-type de récepteur adrénergique  $\beta$ , pourrait moduler différentes fonctions telles que la lipolyse, la sécrétion d'insuline ou la relaxation intestinale. Les contractions de l'iléon de cobaye induites par la voie cholinergique sont modulées par les agonistes adrénergiques. Cependant, en dépit du blocage total avec la phentolamine et le propranolol des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques, l'isoproterenol peut toujours inhiber la survenue des contractions. Le récepteur  $\beta$ 3 présente une affinité faible pour le propranolol et d'autres  $\beta$  bloquants classiques, mais une réponse marquée vis-à-vis de l'agoniste BRL 37344, qui est un

puissant stimulant de la lipolyse dans le tissu adipeux (1).

5 L'hypothèse selon laquelle le récepteur  $\beta 3$  est présent dans les tissus adipeux a été confirmée par l'analyse de la capacité de l'ARN provenant de  
tissus d'origines diverses à s'hybrider à des sondes  
spécifiques de récepteur adrénergique  $\beta 3$  (Figure 4):  
un signal d'hybridation avec les sondes utilisées a  
été observé uniquement avec l'ARN de la lignée  
10 adipocytaire 3T3-F442A (23).

Ce récepteur adrénergique  $\beta 3$  pourrait également  
être impliqué dans la régulation par les  
catécholamines de l'action de l'insuline sur le  
métabolisme du glucose et des acides gras.  
15

20

25

30

35

## REFERENCES

1. Arch, J.R.S., Ainsworth, A.T., Cawthorne, M.A., Piercy, V., Sennitt, M.V., Thody, V.E., Wilson, C. and Wilson, S. (1984), *Nature* **309**, 163-165.
2. Jacobson, B., Vauquelin, G., Wesslau, C., Smith, U. and Strosberg, A.D. (1981), *Eur. J. Biochem.* **114**, 349-354.
3. Bond, R.A. and Clarke, D.E. (1987), *Br. J. Pharmac.* **91**, 683-686.
5. Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. and Kobilka, B.K. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7159-7163
6. Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.L., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Regan, J.W. (1987), *Science* **238**, 650-656.
7. Frielle, T., Collins, S., Daniel, K.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Kobilka, B.K. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7920-7924.
8. Emorine, L.J., Marullo, S., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S.V., Durieu-Trautman, O. and Strosberg, A.D. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6995-6999.
9. Dixon, R.A.F., Strader, C.D. and Sigal, I.S. (1988), *Annual Reports in Medicinal chemistry*, 221-233. Ed. Seamon, K.B., Food and Drug Administration, Bethesda, Md 20892.
10. Emorine, L.J., Marullo, S., Sutren, M., Delavier, C., Eshdat, Y., Raposo, G. and Strosberg, A.D. (1988), *Proc. NATO Adv. Res.*

- Workshop: "Molecular biology of neuroreceptors and ion channels",  
Santorini, Ed. by A., Maelicke (in the press).
11. Bonner, T.I., Young, A.C., Brann, M.R. and Buckley, N.J. (1988),  
*Neuron* **1**, 403-410.
  12. Regan, J.W., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz,  
R.J. and Kobilka, B.K. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**,  
6301-6305.
  13. Bahouth, S.W. and Malbon, C.C. (1988), *Molec. Pharmacol.* **34**,  
318-328.
  14. Yarden, Y., Rodriguez, H., Wong, S.K.F., Brandt, D.R., May, D.C.,  
Burnier, J., Harkins, R.N., Chen, E.Y., Ramachandran, J., Ullrich, A.  
and Ross, E.M. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6795-6799.
  15. Dixon, R.A.F., Sigal, I., Candelore, M.R., Register, R.B., Scattergood,  
W., Rands, E. and Strader, C.D. (1987), *EMBO J.* **6**, 3269-3275.
  16. Dohlman, H.G., Caron, M.G., Strader, C.D., Amlaiky, N. and  
Lefkowitz, R.J. (1988), *Biochem.* **27**, 1813-1817.
  17. Kobilka, B.K., Kobilka, T.S., Daniel, K., Regan, J.W., Caron, M.G.  
and Lefkowitz, R.J. (1988), *Science* **240**, 1310-1316.
  18. Strader, C.D., Sigal, I.S., Candelore, M.R., Rands, E., Hill, W.S. and  
Dixon, R.A.F. (1988), *J. Biol. Chem.* **263** 10267-10271.
  19. Bouvier, M., Hausdorff, P., De Biasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilka, B.K.,  
Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1988), *Nature* **333**, 370-373.
  20. Larsky, L.A., Dowbenko, D., Simonsen, C.C. and Berman, P.W.  
(1984), *Biotechnology* **2**, 527-532.
  21. Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**,  
4216-4220.

22. Goodman and Gilman's (1980), *The pharmacological basis of therapeutics* 6<sup>th</sup> ed., Macmillan Publishing Co., Inc.
23. Green, H. and Kehinde, O. (1976), *Cell* 7, 105-113.

## REVENDEICATIONS

1. Polypeptide ayant une activité de récepteur  $\beta$ -adrénergique contenant :

5 . la séquence de 402 acides aminés de la Figure 1,

. ou un fragment de cette séquence, ce fragment étant tel que

10 \* soit il contient néanmoins les sites contenus dans cette séquence et dont la présence est nécessaire pour que, lorsque ce fragment est exposé à la surface d'une cellule, il soit capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'un agoniste, cette activation étant  
15 croissante dans l'ordre des agonistes suivants : salbutamol, BRL 28410, BRL 37344 et (1)-isoproterenol,

20 \* soit il est susceptible d'être reconnu par des anticorps qui reconnaissent également la susdite séquence de 402 acides aminés, mais ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique  $\beta_1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta_2$ .

25 \* soit il est susceptible de générer des anticorps reconnaissant la susdite séquence de 402 acides aminés mais ne reconnaissant ni le récepteur adrénergique  $\beta_1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta_2$ .

30 2. Polypeptide selon la revendication 1, dont la capacité à stimuler l'adénylate cyclase et/ou l'accumulation de CAMP induite par l'isoproterenol, n'est pas inhibée par les composés suivants:

- practolol,
- nadolol,
- CGP 12,177,
- butoxamine,

35

- alprenolol,
- propanolol,
- pindolol,
- oxprenolol,

5 utilisés à des concentrations inférieures ou égales à  $10^{-4}$  M, dans les conditions suivantes :

10 en ce qui concerne l'accumulation de l'AMP cyclique, des cellules sont cultivées et récoltées après traitement avec Versene/EDTA (Eurobio, Paris), lavées et resuspendues dans un milieu de Hank contenant 20 mM d'Hepes tamponnés à pH 7.4, de l'acide ascorbique 1 mM et de l'isobutyl-méthyle-xanthine 0.1 mM; des aliquotes de  $10^6$  cellules sont incubées pendant 30 minutes, avec les inhibiteurs à 15  $10^{-4}$  M avant l'addition de  $5 \cdot 10^{-9}$  M d'isoproterenol ; l'incubation est poursuivie encore pendant 30 minutes, et on mesure les niveaux d'AMP cyclique par exemple selon les spécifications de la trousse d'essais Amersham.

20 3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le pindolol et l'oxprenolol stimulent l'adénylate cyclase et/ou l'accumulation d'AMP cyclique dans des cellules CHO transfectées avec le susdit polypeptide, dans les conditions 25 suivantes :

30 en ce qui concerne l'accumulation de l'AMP cyclique, des cellules sont cultivées et récoltées après traitement avec Versene/EDTA (Eurobio, Paris), lavées et resuspendues dans un milieu de Hank contenant 20 mM d'Hepes tamponnés à pH 7.4, de l'acide ascorbique 1 mM et de l'isobutyl-méthyle-xanthine 0.1 mM ; des aliquotes de  $10^6$  cellules sont incubées pendant 30 minutes, dans un volume total de 1 ml avec des concentrations 35

de pindolol ou d'oxprenolol supérieures à  $10^{-11}$ M et les niveaux de cAMP sont mesurés par exemple selon les spécifications de la trousse d'essai Amersham.

4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence, représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par l'acide aminé en position 1 à celle constituée par l'extrémité en position 402.

5. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par un enchaînement de nucléotides codant pour les polypeptides selon les revendications 1 à 4.

6. Acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par l'enchaînement de nucléotides représenté sur la Figure 1 bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide 1 à celle constituée par le nucléotide 2022.

7. Vecteur recombinant, en particulier pour le clonage et/ou l'expression, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique selon l'une des revendications 5 et 6 en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication.

8. Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur M13mp18-Hu $\beta$ 3, (n°1085), constitué par un bactériophage déposé sous le n°I-833 le 20 janvier 1989 à la CNCM, 25 rue du Docteur Roux, Paris.

9. Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il contient en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression

d'une séquences d'acides aminés selon les revendications 1 à 4, dans un hôte cellulaire et éventuellement un promoteur reconnu par les polymérase de l'hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence signal et une séquence d'ancrage.

10. Hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 dans cet hôte.

11. Hôte cellulaire transformé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les bactéries, notamment E. coli.

12. Hôte cellulaire transformé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les organismes eucaryotes tels que des cellules CHO.

13. Anticorps caractérisé(s) en ce qu'il(s) est (ou sont) dirigé(s) de façon spécifique contre un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, et en ce qu'il(s) ne reconnaît (ou reconnaissent) ni le récepteur adrénergique  $\beta 1$ , ni le récepteur adrénergique  $\beta 2$  et en particulier celui ou ceux reconnaissant les séquences d'acides aminés suivantes:

1 à 36	178 à 201
64 à 74	223 à 291
101 à 108	314 à 325
133 à 135	345 à 403

14. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle s'hybride avec l'un des acides nucléiques selon les revendications 5 et 6 ou leur séquence

selon les revendications 5 et 6 ou leur séquence complémentaire dans les conditions d'hybridation telles qu'elle ne s'hybride pas avec les gènes ou ARN messager des récepteurs  $\beta 1$  ou  $\beta 2$  adrénergiques, et en particulier les sondes choisies parmi les sondes nucléotidiques suivantes :

5

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1, à celle constituée par le nucléotide en position 637

10

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 638 à celle constituée par le nucléotide en position 745,

15

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1313, à celle constituée par le nucléotide en position 1513,

20

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1679, à celle constituée par le nucléotide en position 1843,

25

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1844, à celle constituée par le nucléotide en position 2022,

30

. - celle définie par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1bis, s'étendant de l'extrémité constituée par le

35

nucléotide en position 638, à celle constituée par le nucléotide en position 1843.

ou leur séquence nucléotidique complémentaire.

5 15. Procédé de préparation d'un polypeptide  
selon quelconque des revendications 1 à 4,  
caractérisé en ce que l'on cultive dans un milieu  
approprié un hôte cellulaire préalablement  
transformé par un vecteur recombinant contenant un  
10 acide nucléique selon l'une quelconque des  
revendications 7 à 9,  
et on récupère à partir de la susdite culture le  
polypeptide produit par ledit hôte cellulaire  
transformé.

15 16. Procédé de détection de la capacité d'une  
molécule à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un  
polypeptide selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 4, caractérisé par :

- la mise en contact de la molécule avec un hôte  
cellulaire préalablement transformé par un vecteur  
20 lui-même modifié par un insérat codant pour le  
susdit polypeptide, cet hôte portant à sa surface un  
ou plusieurs sites spécifiques de ce polypeptide, le  
cas échéant après induction de l'expression de cet  
insérat, cette mise en contact étant effectuée dans  
25 des conditions permettant la formation d'une liaison  
entre l'un au moins de ces sites spécifiques et  
ladite molécule dès lors qu'elle s'avèrerait  
effectivement posséder une affinité pour ce  
polypeptide,

30 - la détection de la formation éventuelle d'un  
complexe du type ligand-polypeptide.

17. Procédé pour l'étude de l'affinité d'un  
polypeptide selon l'une quelconque des

35

revendications 1 à 4, pour un plusieurs ligands déterminés, caractérisé par :

- 5 - la transformation d'un hôte cellulaire compétent avec un vecteur, notamment un plasmide ou un phage, dans lequel avait auparavant été insérée une séquence de nucléotides ou codant pour le récepteur  $\beta 3$  (insérat), sous le contrôle d'éléments de régulation, notamment d'un promoteur reconnu par les polymérase de l'hôte cellulaire et permettant l'expression dans l'hôte cellulaire utilisé de ladite séquence de nucléotides,
- 10 - la culture de l'hôte cellulaire transformé dans des conditions permettant l'expression dudit insérat, et le transport du récepteur  $\beta 3$  exprimé vers la membrane de façon telle que les séquences transmembranaires de récepteur  $\beta 3$  soient exposées à la surface de l'hôte cellulaire transformé,
- 15 - la mise en contact de cet hôte cellulaire avec ces ligands déterminés,
- 20 - la détection d'une réaction affine entre ledit hôte cellulaire transformé et lesdits ligands déterminés.

18. Kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant :

- 25 - une culture d'hôtes cellulaires transformés par un vecteur modifié tel que défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 12 ou une culture d'hôtes cellulaires selon la revendication 12,
- 30 - des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression de la séquence nucléotidiques contenue dans le vecteur modifié lorsque le promoteur placé en amont de cette séquence est un promoteur

35

inductible par lesdits moyens physiques ou chimiques, et obtenir une protéine,

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour le susdit polypeptide,
- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique de la protéine exprimée.

10

15

20

25

30

35



2/6

agatc tcacc aagc tgagg tct tggg agagg agat ac tggc tgagccc t at tact taatt 60  
 taana tacct taggg agggcc accca agtgg atg agggg ctc t g t g a t c c t t t g c t t g 120  
 ac t c a g e g g g t t a c c t t g c c t e t g a t a c a t a a a g g g t g g g g a t g g g a g e c t e t e t e 180  
 t e t e t t c c c c t g c e t t g c t g t g g g a a t t c t g g g a a a g g a g g t g e a g g g c t c c a g g a a g 240  
 c c a g t g c c c a g g g a g t g c t a t g c t g a g t c c a g g a g c e t g g c c a e g g e a g g g g t g g a c a g a 300  
 t g g t g g c a g a g g a a c c a e g g t g t c c e t t e c t c c a g a t t t a g e t a a a g g a a a e g t g g a g e a 360  
 t c c a t t g g c c a t c e t c e c c a c t e t c c a a t t e g g e t e c a g a g g e c c c t c c a g a c t a t a g g 420  
 c a g e t g c c c t t a a g e g t e g t a c t e c t c c c c a a g a g e g g t g g c a c e g a g g g a g t t g g 480  
 g g t g g g g g a g g c t g a g e g c t e t g g e t g g g a c a g e t a g a g a a g a t g g c c c a g g e t g g g g a 540  
 a g t e g c t e t e a t g c e t t g c t g t c c c c t c c c t g a g c c a g g t g a t t t g g g a g a c c c c e t e c 600  
  
 t t c e t t e t t t e c c t a c e g c c c c a c e g e g a c c c g g g g Met Ala Pro Trp Pro 5  
 ATG GCT CCG TGG CCT 652  
  
 His Glu Asn Ser Ser Leu Ala Pro Trp Pro Asp Leu Pro Thr Leu 20  
 CAC GAG AAC AAG TCT CTT GCC CCA TGG CCG GAC CTC CCC ACC CTG 697  
  
 Ala Pro Asn Thr Ala Asn Thr Ser Gly Leu Pro Gly Val Pro Trp 35  
 GCG CCC AAT ACC GCC AAC ACC AAT GGG CTG CCA GGG GTT CCG TGG 742  
  
 Glu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Val Leu Ala 50  
 GAG GCG GCC CTA GCC GGG GCC CTG CTG GCG CTG GCG GTG CTG GCC 787  
  
 Thr Val Gly Gly Asn Leu Leu Val Ile Val Ala Ile Ala Trp Thr 65  
 ACC GTG GGA GGC AAC CTG CTG GTC ATC GTG GCC ATC GCC TGG ACT 832

Figure Ibis

Pro Arg Leu Gln Thr Met Thr Asn Val Phe Val Thr Ser Leu Ala	88
CCG AGR CTC CAG ACC ATG ACC AAC GTG TTC GTG ACT TCG CTG GCC	877
Ala Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val Pro Pro Ala Ala	95
GCA GCC GAC CTG GTG ATG GGA CTC CTG GTG GTG CCG CCG GCG GCC	922
Thr Leu Ala Leu Thr Gly His Trp Pro Leu Gly Ala Thr Gly Cys	110
ACC TTG GCG CTG ACT GGC CAC TGG CCG TTG GGC GCC ACT GGC TGC	967
Glu Leu Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile	125
GAG CTG TGG ACC TCG GTG GAC GTG CTG TGT GTG ACC GCC ACG ATC	1012
Glu Thr Leu Cys Ala Leu Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Thr	140
GAA ACC CTG TGC GCC CTG GCC GTG GAC CCG TAC CTG GCT GTG ACC	1057
Asn Pro Leu Arg Tyr Gly Ala Leu Val Thr Lys Arg Cys Ala Arg	155
AAC CCG CTG CGT TAC GGC GCA CTG GTC ACC AAG CCG TCC GCC CCG	1102
Thr Ala Val Val Leu Val Trp Val Val Ser Ala Ala Val Ser Phe	170
ACA GCT GTG GTC CTG GTG TGG GTC GTG TCG GCC GCG GTG TCG TTT	1147
Ala Pro Ile Met Ser Gln Trp Trp Arg Val Gly Ala Asp Ala Glu	185
GCG CCC ATC ATG ACG CAG TGG TGG CCG GTA GGG GCC GAC GCC GAG	1192
Ala Gln Arg Cys His Ser Asn Pro Arg Cys Cys Ala Phe Ala Ser	200
GCG CAG CCG TGC CAC TCC AAC CCG CCG TGC TGT GCC TTC GCC TCC	1237
Asn Met Pro Tyr Val Leu Leu Ser Ser Ser Val Ser Phe Tyr Leu	215
AAC ATG CCC TAC GTG CTG CTG TCC TCC TCC GTC TCC TTC TAC CTT	1282
Pro Leu Leu Val Met Leu Phe Val Tyr Ala Arg Val Phe Val Val	230
CCT CTT CTC GTG ATG CTC TTC GTC TAC GCG CCG GTT TTC GTG GTG	1327
Ala Thr Arg Gln Leu Arg Leu Leu Arg Gly Glu Leu Gly Arg Phe	245
GCT ACG CCG CAG CTG CCG TTG CTG CCG GGG GAG CTG GGC CCG TTT	1372

Figure 1bis (suite 1)

Pro Pro Glu Glu Ser Pro Pro Ala Pro Ser Arg Ser Leu Ala Pro	268
CCG CCC GAG GAG TCT CCG CCG GCG CCG TCG CGC TCT CTG GCC CCG	1417
Ala Pro Val Gly Thr Cys Ala Pro Pro Glu Gly Val Pro Ala Cys	275
GCC CCG GTG GGG ACG TGC GCT CCG CCC GAA GGG GTG CCC GCC TGC	1462
Gly Arg Arg Pro Ala Arg Leu Leu Pro Leu Arg Glu His Arg Ala	290
GGC CCG CCG CCC GCG CCG CTC CTG CCT CTC CCG GAA CAC CCG GCC	1507
Leu Cys Thr Leu Gly Leu Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp	305
CTG TGC ACC TTG GGT CTC ATC ATG GGC ACC TTC ACT CTC TGC TGG	1552
Leu Pro Phe Phe Leu Ala Asn Val Leu Arg Ala Leu Gly Gly Pro	320
TTG CCC TTC TTT CTG GCC AAC GTG CTG CCG GCC CTG GGG GGC CCC	1597
Ser Leu Val Pro Gly Pro Ala Phe Leu Ala Leu Asn Trp Leu Gly	335
TCT CTA GTC CCG GGC CCG GCT TTC CTT GCC CTG AAC TGG CTA GGT	1642
Tyr Ala Asn Ser Ala Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro	350
TAT GCC AAT TCT GCC TTC AAC CCG CTC ATC TAC TGC CGC AGC CCG	1687
Asp Phe Arg Ser Ala Phe Arg Arg Leu Leu Cys Arg Cys Gly Arg	365
GAC TTT CCG AGC GCC TTC CCG CCG CTT CTG TGC CCG TGC GGC CGT	1732
Arg Leu Pro Pro Glu Pro Cys Ala Ala Ala Arg Pro Ala Leu Phe	380
CGC CTG CCT CCG GAG CCC TGC GCC GCC GCC CGC CCG GCC CTC TTC	1777
Pro Ser Gly Val Pro Ala Ala Arg Ser Ser Pro Ala Gln Pro Arg	395
CCC TCG GGC GTT CCT GCG GCC CCG AGC AGC CCA GCG CAG CCC AGG	1822
Leu Cys Gln Arg Leu Asp Gly	402
CTT TGC CAA CCG CTC GAC GCG TAGgtaacccggggcagagggaccggggctca	1875
gggtcggggaagcatgcgatgtgtccgtgggtcaactttttgagtgaggagtttattaaga	1935
gaaggtaggagtgcttttcttggagagaaaaagggaacgaggagtgcgaacccaaaaagg	1995
accacgggtccctttttcttcggatcc	2022

Figure 1bis (suite 2)

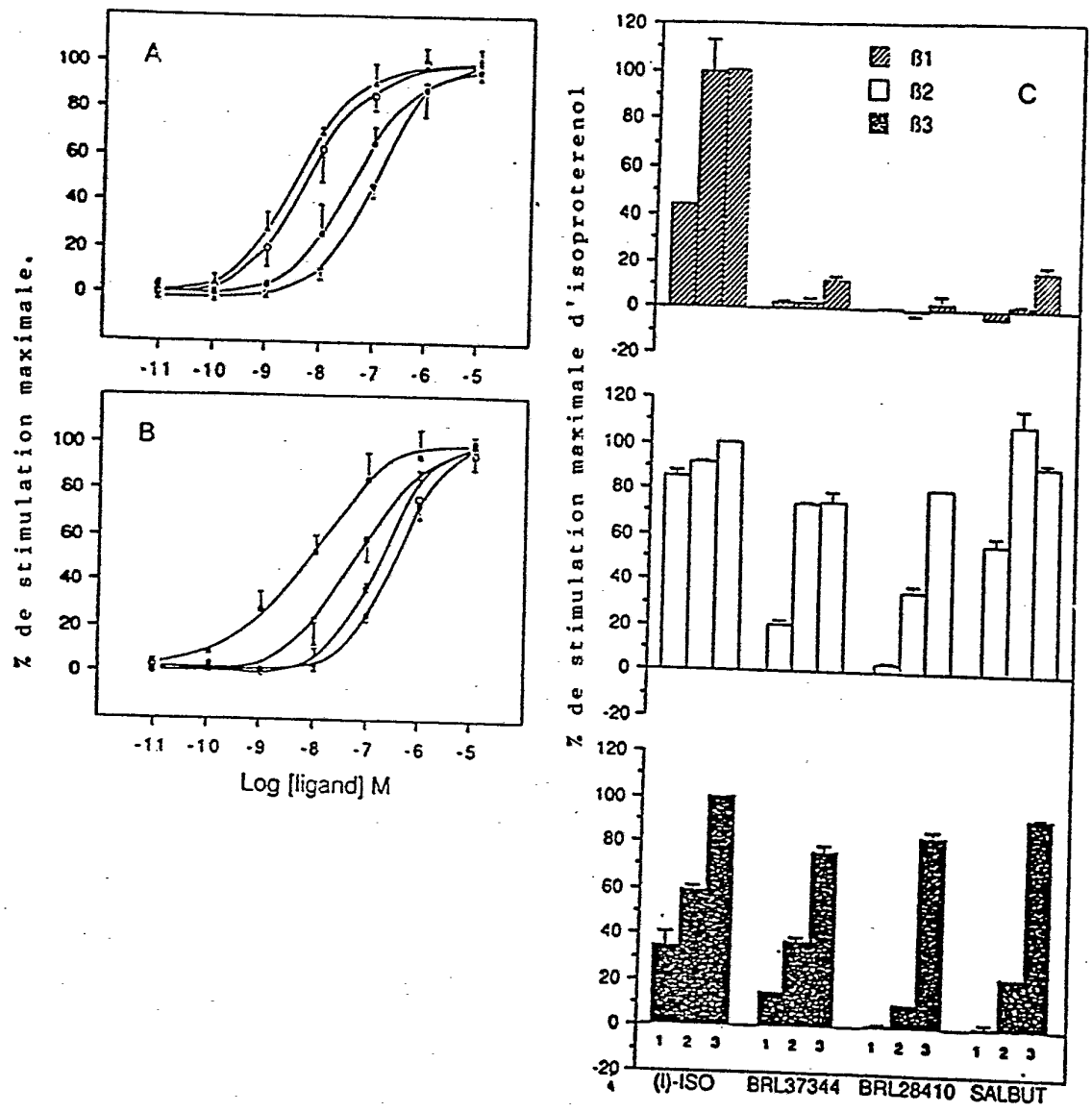


Figure 2

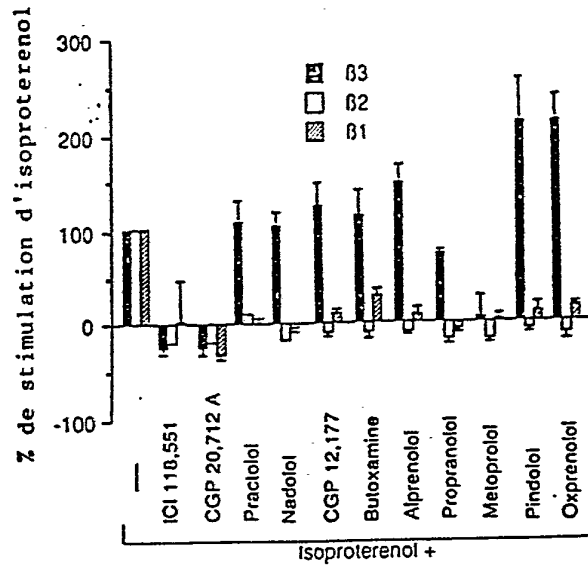


Figure 3

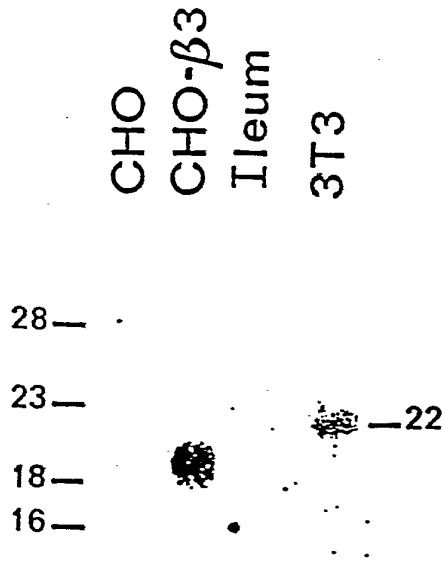


Figure 4