



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 353 604**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05744241 .0**
(96) Fecha de presentación : **20.04.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1745295**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

(54) Título: **Métodos, composiciones y ensayos de compuestos para inhibir la producción de proteína β -amiloide.**

(30) Prioridad: **20.04.2004 US 563661 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.03.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.03.2011

(73) Titular/es: **GALAPAGOS N.V.**
Generaal de Wittelaan L11 A3
2800 Mechelen, BE

(72) Inventor/es: **Merchiers, Pascal, Gerard;**
Spittaels, Koenraad, Frederik, Florentina y
Hoffmann, Marcel

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 353 604 T3

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

DESCRIPCION

Campo de la Invención

Esta invención se refiere al campo de los trastornos de las células neuronales de mamíferos, y, en particular, a métodos para identificar compuestos eficaces útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades asociadas a la pérdida progresiva de la capacidad intelectual en seres humanos.

El trastorno neurológico más conocido por su pérdida progresiva de capacidad intelectual es la enfermedad de Alzheimer (EA). En todo el mundo, alrededor de 20 millones de personas padecen la enfermedad de Alzheimer. La EA se caracteriza clínicamente por la pérdida inicial de memoria, seguida por desorientación, deterioro del juicio y del razonamiento, que se denomina habitualmente deterioro cognitivo, y finalmente por la demencia completa. Los pacientes de EA caen finalmente en un estado inmóvil, gravemente debilitado, entre cuatro y doce años tras el inicio de la enfermedad.

La prueba patológica clave de EA es la presencia de placas amiloides extracelulares y ovillos intracelulares de proteína tau en el cerebro, que están asociados a la degeneración neuronal (Ritchie y Lovestone (2002)). Se cree que las placas amiloides extracelulares son el resultado de un incremento del péptido β -amiloide 1-42 insoluble producido por el metabolismo de la proteína precursora de β -amiloide (APP). Tras la secreción, estos péptidos β -amiloides 1-42 forman fibrillas amiloides más fácilmente que los péptidos β -amiloides 1-40, que se producen predominantemente en las personas sanas. Parece que el péptido β -amiloide está en lo alto de la cascada neurotóxica: los experimentos demuestran que las fibrillas β -amiloides, cuando se inyectan en los cerebros de ratones transgénicos P301L tau, estimulan la formación de ovillos neurofibrilares (Gotz et al. (2001)). De hecho, una variedad de péptidos β -amiloides se ha identificado como péptidos β -amiloides 1-42, 1-40, 1-39, 1-38, 1-37, que se pueden hallar en las placas y que se observan a menudo en el líquido cefalorraquídeo.

Los péptidos β -amiloides se generan (o se procesan) a partir de la APP anclada a la membrana, tras la escisión mediante una β -secretasa y una γ -secretasa en la posición 1 y 40 ó 42, respectivamente (Figura 1A) (Annaert y De Strooper (2002)). Además, la actividad elevada de la β -secretasa da como resultado un desplazamiento de la escisión de la posición 1 a la posición 11. La escisión de la proteína precursora de β -amiloide mediante la actividad de la α -secretasa en la posición 17 y mediante la actividad de la γ -secretasa en 40 ó 42 genera el péptido p3 no patológico. La β -secretasa se identificó como la aspartil proteasa BACE anclada a membranas, mientras la γ -secretasa es un complejo proteico que comprende presenilina 1 (PS1) o presenilina 2

(PS2), nicastrina, proteína deficiente de faringe anterior 1 (APH1) y estimulador de presenilina 2 (PEN2). De estas proteínas, se considera de forma generalizada que las presenilinas constituyen la actividad catalítica de la γ -secretasa, mientras los otros componentes desempeñan un papel en la maduración y la localización del complejo.

- 5 La identidad de la α -secretasa es todavía dudosa, aunque algunos resultados apuntan hacia las proteasas ADAM 10 y TACE, que podrían tener funciones redundantes.

Una pequeña fracción de casos de EA (en su mayor parte EA de inicio temprano) están provocados por mutaciones autosómicas dominantes en los genes que codifican las presenilinas 1 y 2 (PS1; PS2) y la proteína precursora de β -amiloide (APP), y se ha demostrado que las mutaciones en APP, PS1 y PS2 alteran el metabolismo de la proteína precursora de β -amiloide, lo que conduce a tales niveles incrementados de β -amiloide 1-42 producido en el cerebro. Aunque no se han identificado mutaciones en PS1, PS2 y la proteína precursora de β -amiloide en los pacientes de EA de inicio tardío, las características patológicas son sumamente similares a las de los pacientes de EA de inicio temprano. Estos niveles incrementados de péptido β -amiloide se podrían originar de manera progresiva con la edad a partir de un procesamiento alterado de la proteína precursora de β -amiloide (p.ej. los niveles elevados de colesterol incrementan la producción del péptido β -amiloide) o a partir de un catabolismo disminuido del péptido β -amiloide. Por lo tanto, está aceptado en general que la EA en pacientes de EA de inicio tardío está provocada también por niveles anormales incrementados de péptido amiloide en los cerebros. El nivel de estos péptidos β -amiloides, y más en particular del péptido β -amiloide 1-42, está incrementado en los pacientes de Alzheimer en comparación con los niveles de estos péptidos en personas sanas. Así, es probable que la reducción de los niveles de estos β -amiloides sea beneficiosa para los pacientes con deterioro cognitivo.

Merchiers et al. (2003) (Soc Neurosci Abs) describe el cribado de alto rendimiento basado en células para la identificación de genes supuestamente susceptibles al tratamiento con fármacos que modifiquen la enfermedad de Alzheimer, que modulan los niveles de amiloide. Entre los genes de procesamiento de APP, también se identifican 3 nuevos receptores acoplados a proteína G que modulan el procesamiento de APP.

Eggerickx et al. (1995) (Biochem J, 309, 837-843) describe la expresión de GPR3 en el cerebro.

Desarrollos Informados

Las principales terapias actuales para la EA se limitan a retrasar la pérdida progresiva de memoria inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, lo que incrementa los niveles del neurotransmisor acetilcolina, lo cual falla debido a que las neuronas colinérgicas son las primeras neuronas en degenerar durante la EA. Esta terapia no detiene la progresión de la enfermedad.

Se están investigando cada vez más las terapias dirigidas a disminuir los niveles de los péptidos β -amiloides en el cerebro y se centran en el procesamiento alterado de la proteína precursora de β -amiloide que implica a las enzimas β - o γ -secretasas.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos polipéptidos conocidos son factores en la estimulación y/o la inducción del procesamiento del precursor β -amiloide en las células neuronales, y que la inhibición de la función de tales polipéptidos es eficaz en la reducción de los niveles de los péptidos β -amiloides.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a la relación entre la función de el/los receptor(es) acoplado(s) a proteína G ("GPCR(s)") y el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en las células de mamíferos.

Un aspecto de la presente invención es un método para identificar un compuesto que inhibe el procesamiento de una proteína precursora de β -amiloide en una célula de mamífero, tal como se define en la reivindicación 1.

Los aspectos del presente método incluyen el ensayo *in vitro* de compuestos mediante el uso de dominios polipeptídicos del GPCR, y ensayos celulares en los que se sigue la inhibición de GPCR observando indicadores de eficacia, que incluyen los niveles de segundos mensajeros y/o los niveles de péptido β -amiloide.

Se describe un método de tratamiento o prevención de una afección que implica deterioro cognitivo, o una susceptibilidad a la afección, en un sujeto que padece o que es susceptible a ello, administrando una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un antagonista de GPCR o agonista inverso que inhibe el procesamiento del precursor β -amiloide.

Se describe una composición farmacéutica para el uso en dicho método, en el que dicho inhibidor comprende un polinucleótido seleccionado del grupo de un polinucleótido inverso, una ribozima, y un ARN pequeño de interferencia (siARN), en el que dicho agente comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a, o modifi-

cada a partir de, una secuencia polinucleotídica natural que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6.

Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista o agonista inverso de GPCR o una sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo que inhibe el procesamiento del precursor β -amiloide, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de polinucleótidos y de antagonistas y agonistas inversos de GPCR son útiles también para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1A: Procesamiento de APP: La proteína precursora de amiloide (APP) anclada a membranas se procesa mediante dos rutas: la ruta amiloidogénica y la ruta no amiloidogénica. En esta última ruta, APP es escindida primero por una α -secretasa y después por una γ -secretasa, lo que produce los péptidos p3 (17-40 ó 17-42). La ruta amiloidogénica genera los péptidos β -amiloides patógenos (β A) tras la escisión mediante una β - y γ -secretasa, respectivamente. Los números representados son las posiciones de los aminoácidos que comprenden las secuencias β A.

Figura 1B: Representación gráfica de la estructura transmembrana de las proteínas GPCR.

Figura 2: Evaluación del ensayo de procesamiento de APP: Se infectan virus positivos (PS1G384L; PS1L392V y BACE1) y negativos (eGFP, LacZ y vacío) de control en Hek293APPwt a una MOI aleatoria, imitando un cribado. A y B: La transducción se lleva a cabo respectivamente con 1 y 0,2 μ l de virus, y se determinan los niveles de β -amiloide 1-42. Los datos se representan en forma de unidades relativas de luz y se correlacionan con la concentración pM de β -amiloide 1-42.

Figura 3: Implicación de GPR3 en el procesamiento de APP: Se transducen células HEK293 APPwt con Ad5/GPR3 y con virus negativos de control (Ad5/vacío, Ad5/LacZ, Ad5/eGFP y Ad5/luciferasa) a diferentes MOIs (2, 10, 50, 250). Se midieron los péptidos β -amiloides 1-42, 1-40, 11-42, x-42 y 1-x resultantes con los ELISAs apropiados. Los datos se representan en

concentración pM o como unidades relativas de luz (url), lo cual se correlaciona con la concentración pM de β -amiloide.

Figura 4: La transfección con siARN de GPR3 reduce el β -amiloide 1-42: Se transfectaron células HEK293 APPwt cl29 con siARN de GPR3, eGFP, Luciferasa y BACE, y se determinan los niveles de β -amiloide 1-42. Las células se transfectan, y 24 horas tras la transfección, el medio se sustituye y se deja que las células acumulen β -amiloide durante 24 horas (48 horas post-transfección (p.t.)). Se determina el β -amiloide por medio del ELISA de β -amiloide 1-42 tal como se describió anteriormente. Los datos se presentan en concentración pM de β -amiloide. Se determinan los niveles de ARN de GPR3 a partir estas muestras.

Figura 5: Alineación de secuencias de proteínas mediante ClustalW de GPR3, GPR6 y GPR12.

Figura 6: Gráfico de los niveles de péptido β -amiloide en neuronas transfectadas con una diversidad de virus de expresión de proteínas a diferentes MOIs. El gráfico demuestra que los niveles incrementados de sobreexpresión de GPR3 en las neuronas primarias dan como resultado un incremento dependiente de la dosis correspondiente de los niveles de β -amiloide 1-42 en comparación con los controles negativos.

Descripción Detallada

Los siguientes términos pretenden tener los significados presentados con ellos a continuación, y son útiles para entender la descripción y el alcance deseado de la presente invención.

Definiciones:

El término "agonista" se refiere a un ligando que activa la respuesta intracelular del receptor al que se une el agonista.

La expresión "péptido β -amiloide" significa los péptidos β -amiloides procesados a partir de la proteína precursora de β -amiloide (APP). Los péptidos más habituales incluyen los péptidos β -amiloides 1-40, 1-42, 11-40 y 11-42. Otras especies menos prevalentes de péptidos β -amiloides se describen como y-42, en el que y oscila entre 2-17, y 1-x en el que x oscila entre 24-39 y 41.

El término "antagonista" significa un resto que se une de forma competitiva al receptor en el mismo lugar que el agonista, pero que no activa la respuesta intracelular iniciada por la forma activa del receptor, y por lo tanto puede inhibir las respuestas

intracelulares de los agonistas. Los antagonistas no disminuyen la respuesta intracelular basal en ausencia de agonista o agonista parcial.

El término "vehículo" significa un material atóxico usado en la formulación de composiciones farmacéuticas para proporcionar un medio, masa y/o forma utilizable para una composición farmacéutica. Un vehículo puede comprender uno o más materiales tales como un excipiente, estabilizante, o una disolución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen los ingredientes de tamponamiento acuosos o sólidos que incluyen fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; un polipéptido de peso molecular bajo (menor de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicocola, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de carbohidratos tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG), y PLURONICSTM.

El término "compuesto" se usa en la presente memoria en el contexto de un "compuesto de ensayo" o de un "compuesto candidato a fármaco" descrito con relación a los ensayos de la presente invención. Como tales, estos compuestos comprenden compuestos orgánicos o inorgánicos, derivados de forma sintética o de fuentes naturales. Los compuestos incluyen compuestos inorgánicos u orgánicos tales como polinucleótidos, lípidos o análogos de hormonas que se caracterizan por pesos moleculares relativamente bajos. Otros compuestos de ensayo orgánicos biopoliméricos incluyen los péptidos que comprenden de alrededor de 2 a alrededor de 40 aminoácidos y los polipéptidos mayores que comprenden de alrededor de 40 a alrededor de 500 aminoácidos, tales como anticuerpos o conjugados de anticuerpos.

La expresión "activación constitutiva de receptores" significa la estabilización de un receptor en el estado activo por medios distintos de la unión del receptor con su ligando endógeno o con un equivalente químico del mismo.

El término "contacto" o "poner en contacto" significa juntar al menos dos restos, en un sistema in vitro o en un sistema in vivo.

El término "afección" o "enfermedad" significa la presentación manifiesta de síntomas (es decir, enfermedad) o la manifestación de indicadores clínicos anormales (p.ej., indicadores bioquímicos), que es el resultado de defectos en el procesamiento de un precursor de proteína β -amiloide. De forma alternativa, el término "enfermedad"

se refiere a un riesgo genético o ambiental o a la propensión hacia el desarrollo de tales síntomas o indicadores clínicos anormales.

El término "endógeno" significa un material que produce de forma natural un mamífero. Endógeno con respecto al término "receptor", por ejemplo y no a modo de limitación, significa que es producido de forma natural por un mamífero (por ejemplo, y no a modo de limitación, un ser humano) o un virus. En contraste, el término no endógeno en este contexto significa que no es producido de forma natural por un mamífero (por ejemplo, y no a modo de limitación, un ser humano) o un virus. Por ejemplo, y no a modo de limitación, un receptor que no es activo de forma constitutiva en su forma endógena, pero que cuando se manipula se hace activo de forma constitutiva, se denomina preferiblemente en la presente memoria un "receptor no endógeno activado de forma constitutiva". Se pueden usar ambos términos para describir los sistemas tanto "in vivo" como "in vitro". Por ejemplo, y no a modo de limitación, en una aproximación de cribado, el receptor endógeno o no endógeno puede hacer referencia a un sistema de cribado in vitro. Como ejemplo adicional y no a modo de limitación, cuando el genoma de un mamífero se ha manipulado para incluir un receptor no endógeno activado de forma constitutiva, es viable el cribado de un compuesto candidato por medio de un sistema in vivo.

El término "expresión" comprende tanto la expresión endógena como la sobreexpresión mediante transducción.

El término "ácido nucleico expresable" significa un ácido nucleico que codifica una molécula proteica, una molécula de ARN, o una molécula de ADN.

El término "hibridación" significa cualquier proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria por medio del emparejamiento de bases. La expresión "complejo de hibridación" se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácidos nucleicos en virtud de la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias. Se puede formar un complejo de hibridación en disolución (p.ej., análisis C_0t o R_0t) o se puede formar entre una secuencia de ácido nucleico presente en disolución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido (p.ej., papel, membranas, filtros, chips, varillas o portaobjetos de vidrio, o cualquier otro sustrato apropiado al que se hayan fijado las células o sus ácidos nucleicos). La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones que permiten la hibridación entre polinucleótidos y los polinucleótidos reivindicados. Las condiciones rigurosas se pueden definir por la concentración salina, la concentración de disolvente orgánico, p.ej., formamida, la temperatura, y otras condi-

ciones bien conocidas en la técnica. En particular, la reducción de la concentración de sales, el incremento de la concentración de formamida, o la elevación de la temperatura de hibridación pueden incrementar la rigurosidad.

El término "inhibir" o "inhibición", en relación al término "respuesta", significa
5 que se disminuye o se evita una respuesta en presencia de un compuesto, a diferencia de la ausencia del compuesto.

La expresión "agonista inverso" significa un resto que se une a la forma endógena del receptor, y que inhibe la respuesta intracelular basal iniciada por la forma endógena activa del receptor por debajo del nivel basal normal de actividad que se
10 observa en ausencia del ligando endógeno, o agonista, o disminuye la unión de GTP a las membranas. Preferiblemente, la respuesta intracelular basal se disminuye en presencia del agonista inverso al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 50%, y lo más preferiblemente al menos un 75%, en comparación con la respuesta basal en ausencia del agonista inverso.

El término "ligando" significa una molécula endógena natural específica de un
15 receptor endógeno natural.

La expresión "profármacos farmacéuticamente aceptables", tal como se usa en la presente memoria, significa los profármacos de los compuestos útiles en la presente invención, que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para el
20 uso en contacto con los tejidos de pacientes sin una toxicidad innecesaria, irritación, respuesta alérgica, proporcionados a una tasa razonable de beneficio/riesgo, y eficaces para el uso deseado de los compuestos de la invención. El término "profármaco" significa un compuesto que se transforma in vivo para producir un compuesto eficaz útil en la presente invención o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable
25 del mismo. La transformación se puede dar mediante diversos mecanismos, tal como por medio de la hidrólisis en la sangre. Los compuestos que albergan grupos metabólicamente escindibles tienen la ventaja de que pueden exhibir una biodisponibilidad mejorada como resultado de una solubilidad incrementada y/o de una velocidad de absorción incrementada otorgada por el compuesto original en virtud de la presencia
30 del grupo escindible metabólicamente, así, tales compuestos actúan como profármacos. Se proporciona una discusión minuciosa en Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier (1985); Methods in Enzymology; K. Widder et al, Ed., Academic Press, 42, 309-396 (1985); A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen y H. Bandaged, ed., capítulo 5; "Design and Applications of Prodrugs" 113-191 (1991);
35 Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgard, 8, 1-38, (1992); J. Pharm. Sci, 77, 285

(1988); Chem. Pharm. Bull., N. Nakeya et al, 32, 692 (1984); Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi y V. Stella, 14 A.C.S. Symposium Series, y Bioreversible Carriers in Drug Design, E.B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987, que se incorporan en la presente memoria como referencia.

- 5 Un ejemplo de los profármacos es un profármaco de éster. Un "profármaco de éster" significa un compuesto que es convertible in vivo por medios metabólicos (p.ej., mediante hidrólisis) en un compuesto inhibidor según la presente invención. Por ejemplo, un profármaco de éster de un compuesto de contiene un grupo carboxilo puede ser convertible mediante hidrólisis in vivo en el grupo carboxilo correspondiente.

- 10 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales atóxicas de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, y a las sales atóxicas de adición de bases, de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de los compuestos útiles en la presente invención.

- 15 El término "polinucleótido" significa un ácido nucleico, en forma monocatenaria o bicatenaria, y en la orientación directa o inversa, ácidos nucleicos complementarios que hibridan a un ácido nucleico particular en condiciones rigurosas, y polinucleótidos que son homólogos en al menos alrededor de un 60 por ciento de sus pares de bases, y más preferiblemente tienen en común un 70 por ciento de sus pares de bases, lo
20 más preferiblemente un 90 por ciento, y en una realización especial un 100 por ciento de sus pares de bases. Los polinucleótidos incluyen ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos, y los análogos sintéticos de los mismos. Los polinucleótidos se describen mediante secuencias cuyas longitudes varían, que oscilan de alrededor de 10 a alrededor de 5000 bases, preferiblemente alrededor de 100 a alrededor de 4000
25 bases, más preferiblemente alrededor de 250 a alrededor de 2500 bases. Una realización de polinucleótido preferido comprende de alrededor de 10 a alrededor de 30 bases de longitud. Una realización especial del polinucleótido es un polirribonucleótido de alrededor de 10 a alrededor de 22 nucleótidos, más habitualmente descrito como ARNs pequeños de interferencia (siARNs). Otra realización especial son los ácidos
30 nucleicos con esqueletos modificados tales como los ácidos nucleicos peptídicos (APN), polisiloxano, y 2'-O-(2-metoxi)etilfosforotioato, o que incluyen residuos de ácidos nucleicos que no se dan de forma natural, o uno o más sustituyentes de ácidos nucleicos, tales como metil-, tio-, sulfato, benzoil-, fenil-, amino-, propil-, cloro-, y metanocarbanucleósidos, o una molécula indicadora para facilitar su detección.

El término "polipéptido" se refiere a proteínas, moléculas proteicas, fracciones de proteínas (tales como quinasas, proteasas, GPCRs), péptidos y oligopéptidos.

El término "solvato" significa una asociación física de un compuesto útil en esta invención con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física incluye los
5 enlaces de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato se podrá aislar, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente están incorporadas en la estructura cristalina del sólido cristalino. "Solvato" abarca tanto los solvatos en fase de disolución como los aislables. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

El término "sujeto" incluye seres humanos y otros animales.

10 El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto o agente que provocará una respuesta biológica o médica en un sujeto que desea un médico u otro profesional sanitario. En particular, con respecto al tratamiento de un trastorno neurológico, la expresión "cantidad eficaz" pretende significar la cantidad eficaz que inhibe el procesamiento del precursor β -amiloide
15 de un compuesto o agente que provocará una disminución biológicamente significativa de los niveles de péptido β -amiloide en el tejido cerebral del sujeto.

El término "tratar" significa una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de, y por tanto aliviar, un trastorno, enfermedad o afección, que incluye uno o más síntomas de tal trastorno o afección. Por lo tanto,
20 "tratar" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. El término relacionado "tratamiento", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al acto de tratar un trastorno, síntoma, enfermedad o afección, tal como se definió anteriormente
25 el término "tratar".

Los antecedentes del descubrimiento de los presentes inventores se describen brevemente a continuación.

Antecedentes de los Receptores Acoplados a Proteína G:

En 1994, Marchese y colaboradores clonaron el gen GPR3 (Marchese et al.,
30 1994) y un año más tarde se descubrió que un único exón codificaba esta proteína receptora de 330 aminoácidos, también denominada activador constitutivo de la adenilato ciclasa (ACCA). Basándose en la secuencia de aminoácidos, GPR3 se puede clasificar en la misma sub-familia que GPR6 y GPR12: GPR3 y GPR6 exhiben un 58% de identidad, y GPR3 y GPR12 un 57% (Figura 5).

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) comparten un motivo estructural común. Todos estos receptores tienen siete secuencias de entre 22 y 24 aminoácidos hidrófobos que forman siete hélices α , cada una de las cuales cruza la membrana formando 7 dominios transmembrana, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular. Las hélices transmembrana están unidas mediante cadenas de aminoácidos que tienen una horquilla mayor entre la cuarta y la quinta hélice transmembrana en el lado extracelular de la membrana. Otra horquilla mayor, compuesta principalmente de aminoácidos hidrófilos, une las hélices transmembrana cinco y seis en el lado intracelular de la membrana. Véase de la Figura 1B.

En condiciones fisiológicas, las GPCRs existen en la membrana celular en equilibrio entre dos estados o conformaciones diferentes: un estado "inactivo" y un estado "activo". Un receptor en un estado inactivo es incapaz de conectarse con la ruta de transducción intracelular para producir una respuesta biológica. El cambio de la conformación del receptor hasta el estado activo permite la conexión con la ruta de transducción y produce una respuesta biológica. Un receptor se puede estabilizar en un estado activo mediante un ligando endógeno o un ligando agonista exógeno. Los descubrimientos recientes, que incluyen, pero no se limitan exclusivamente a, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos del receptor, proporcionan mecanismos alternativos distintos de los ligandos para estabilizar la conformación del estado activo. Estas aproximaciones estabilizan de manera eficaz el receptor en un estado activo simulando el efecto de la unión de un ligando al receptor. La estabilización mediante tales aproximaciones independientes del ligando se denomina "activación constitutiva del receptor".

Las cascadas de transducción de señales principales activadas por los GPCRs se inician mediante la activación de proteínas G heterotriméricas, construidas a partir de tres proteínas diferentes; las subunidades G_α , G_β y G_γ . Se cree que la horquilla que une las hélices cinco y seis, así como el extremo carboxilo, interaccionan con la proteína G. Uhlenbrock y colegas (2002) demostraron que GPR3, GPR6 y GPR12 confieren todas una activación constitutiva de $G(a)(s)$ y $G(a)(i/o)$, y, recientemente, se han identificado la 1-fosfato de esfingosina (SIP) y 1-fosfato de dihidroesfingosina (DHSIP), como ligandos lipídicos bioactivos para GPR3, GPR6 y GPR12 (Uhlenbrock et al., 2002). El perfil de expresión de GPR3, GPR6 y GPR12 también es similar: todos se expresan principalmente en el tejido cerebral.

La cascada de transducción de señales comienza con la activación del receptor por un agonista. Los cambios conformacionales en el receptor se traducen después

hasta la proteína G. La proteína G se disocia en la subunidad G_α y en la subunidad $G_{\beta\gamma}$. Ambas subunidades se disocian del receptor y son capaces de iniciar diferentes respuestas celulares. Los efectos celulares que son iniciados por la subunidad G_α son los más conocidos. Por esta razón, las proteínas G se clasifican por su subunidad G_α .

- 5 Las proteínas G se dividen en cuatro grupos: G_s , $G_{i/o}$, G_q y $G_{12/13}$. Cada una de estas proteínas G es capaz de activar una proteína efectora, lo que da como resultado cambios en los niveles de segundos mensajeros en la célula. Los cambios del nivel del segundo mensajero son los desencadenantes que hacen que la célula responda a la señal extracelular de una manera específica. La actividad de una GPCR se puede medir midiendo el nivel de actividad del segundo mensajero.
- 10

Los dos segundos mensajeros más importantes en la célula son cAMP y Ca^{2+} . La subunidad α de la clase G_s de proteínas G es capaz de activar la adenilato ciclasa, lo que da como resultado una transformación incrementada de ATP a cAMP. La subunidad α de las proteínas G $G_{i/o}$ hace exactamente lo opuesto, e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, lo que da como resultado una disminución de los niveles celulares de cAMP. En conjunto, estas dos clases de proteínas G regulan el segundo mensajero cAMP. El Ca^{2+} se regula mediante la subunidad α de la clase G_q de proteínas G. Por medio de la activación de la fosfolipasa C, el 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) de la membrana celular se hidroliza hasta 1,4,5-trisfosfato de inositol y 1,2-diacilglicerol, y estas dos moléculas actúan como segundos mensajeros. El 1,4,5-trisfosfato de inositol se une a receptores específicos en el retículo endoplásmico, lo que da como resultado la apertura de los canales de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} en el citoplasma.

15

20

No se han asignado funciones claras a las GPCRs. El nivel de expresión de GPR3 y de GPR12 está incrementado en las células endoteliales de la vena umbilical humana tras un esfuerzo de corte (Uhlenbrock et al., 2003). Debido a que el 1-fosfato de esfingosina es un ligando para GPR3 y GPR12, los datos anteriores sugieren un papel para ambos GPCRs en la señalización intracelular mediada por 1-fosfato de esfingosina en las células endoteliales humanas. Debido a que la expresión de GPR3 y GPR6 también está regulada de forma diferencial en los modelos de obesidad en roedores, ambas GPCRs (+GPR12) se consideran como supuestos objetivos de fármacos en el control del apetito, el hambre y la saciedad. GPR12, por otra parte, parece estar implicado en la diferenciación y la maduración de las neuronas post-mitóticas (Ignatov et al., 2003).

25

30

- Referencias: Annaert, W. y B. De Strooper (2002). "A cell biological perspective on Alzheimer's disease". *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 25-51.
- 5 Gotz, J., F. Chen, et al. (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils". *Science* 293(5534): 1491-5.
- Ignatov, A.; Lintzel, J.; Hermans-Borgmeyer, L; Kreienkamp, H-J., Joost, P.; Thomsen, S.; Methner, A. y Schaller, H.C. (2003). Role of the G-protein-coupled receptor GPR12 as high-affinity receptor for sphingosylphosphorylcholine and its expression and function in brain
- 10 development. *J. Neurosci.* 23, 3: 907-914.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., y Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 23, 3-25, 1997.
- Marchese, A.; Docherty, JM.; Nguyen, T.; Heiber, M.; Cheng, R.; Heng, HH.; Tsui, LC; Shi, X.; George SR. y O'Dowd, BF. (1994). Cloning of
- 15 human genes encoding novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 23, 3: 609-618.
- Marinissen, M. J. y J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms". *Trends Pharmacol Sci* 22(7): 368-76.
- 20 Ritchie, K. y S. Lovestone (2002). "The dementias". *Lancet* 360(9347): 1759-66.
- Uhlenbrock, K.; Gassenhuber, H. y Kostenis, E. (2002). Sphingosine-1-phosphate is a ligand of the human GPR3, GPR6 and GPR12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell Signal*, 14, 11:
- 25 941- 953.
- Uhlenbrock, K.; Huber, J.; Ardati, A; Bush, AE. y Kostenis, E. (2003). Fluid shear stress differentially regulates GPR3, GPR6 and GPR12 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Physiol. Biochem.* 13, 2: 75- 84.
- 30 Wess, J. (1998). "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity". *Pharmacol Ther* 80(3): 231-64.

Invencción de los Solicitantes Basada en el Descubrimiento de la Relación de GPCR con los Péptidos β -Amiloides

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de los presentes inventores de que el/los receptor(es) acoplado(s) a proteína G ("GPCR(s)") son factores en la estimulación y/o la inducción del procesamiento del precursor β -amiloide en mamíferos, y principalmente, en las células neuronales, y que la inhibición de la función de tales polipéptidos es eficaz para reducir los niveles de péptidos de proteína β -amiloide.

Los presentes inventores no conocen ningún conocimiento previo que relacione GPR3 y la formación y secreción del péptido β -amiloide. Tal como se discute con más detalle en la sección Experimental más adelante, los presentes inventores demuestran que la sobreexpresión de GPR3 incrementa, y la inactivación de GPR3 reduce, el péptido β -amiloide 1-42 en el medio condicionado de las células transducidas. La presente invención se basa en estos hallazgos y en el reconocimiento de que las GPCRs son supuestos objetivos para fármacos para la enfermedad de Alzheimer, ya que la expresión predominante de GPR3, GPR6 y GPR12 se da en el tejido del sistema nervioso central.

La presente invención es un método basado en el descubrimiento anteriormente mencionado para identificar un compuesto que inhibe el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en una célula de mamífero, y por lo tanto es útil para reducir los niveles de péptido β -amiloide en un sujeto. El presente método comprende poner en contacto un compuesto candidato a fármaco con un polipéptido GPR3, o un fragmento de dicho polipéptido, y medir el nivel de un péptido β -amiloide.

Dependiendo de la elección del técnico experto, el presente método de ensayo se puede diseñar para funcionar como una serie de medidas, cada una de las cuales está diseñada para determinar si el compuesto candidato a fármaco está actuando de hecho en GPR3 hacia la ruta del péptido β -amiloide. Por ejemplo, un ensayo diseñado para determinar la afinidad de unión de un compuesto a GPR3, o a un fragmento del mismo, puede ser necesario, pero no suficiente, para determinar si el compuesto de ensayo sería útil para reducir los niveles de péptido β -amiloide cuando se administrase a un sujeto. Sin embargo, tal información de unión sería útil para identificar un grupo de compuestos de ensayo para el uso en un ensayo que midiese una propiedad diferente, más adelante en la ruta bioquímica. Tal segundo ensayo se puede diseñar para confirmar que el compuesto de ensayo, que tiene afinidad de unión por un péptido GPR3, realmente reduce o inhibe, como un agonista o agonista inverso, la función de

GPR3 en una célula de mamífero. Este ensayo adicional puede medir un segundo mensajero que es una consecuencia directa de la activación o la desactivación de GPR3, o un sistema indicador sintético que responde al mensajero. La medida de un segundo mensajero diferente, y/o la confirmación de que el propio sistema de ensayo
5 no se está viendo afectado directamente, y no la ruta de GPR3, puede validar adicionalmente el ensayo. A este último respecto, se deberían utilizar siempre controles adecuados para asegurar que no se hacen lecturas positivas falsas.

No se cree que sea crítico el orden de la toma de estas medidas para la práctica de la presente invención, que se puede poner en práctica en cualquier orden. Por
10 ejemplo, se puede llevar a cabo primero un ensayo de cribado con un grupo de compuestos de los que no se tiene información con respecto a la afinidad de unión de los compuestos a GPR3. De forma alternativa, se puede cribar un grupo de compuestos que se ha identificado que tienen afinidad de unión a un dominio del péptido GPR3, o una clase de compuestos que se ha identificado que son agonistas o agonistas inver-
15 sos de GPR3. No es esencial conocer la afinidad de unión a GPR3, debido a la posible interacción del compuesto en el dominio intra-membrana del polipéptido GPR3, cuya conformación puede no ser posible reproducir en un experimento de afinidad. Sin embargo, para que el presente ensayo sea valioso para el uso final de los compuestos candidatos a fármacos, es necesaria una medida de los niveles de péptido β -amiloides.
20 Los estudios de validación que incluyen controles, y las medidas de la afinidad de unión a GPR3 son útiles sin embargo para identificar un compuesto útil en cualquier aplicación terapéutica o diagnóstica.

El presente método de ensayo se puede poner en práctica *in vitro*, mediante el uso de una o más de las proteínas GPR3, o fragmentos de las mismas, o preparacio-
25 nes de membrana producidas a partir de células transducidas con vectores que sobreexpresan los polipéptidos GPR3. Las secuencias de aminoácidos, y los fragmentos útiles de las mismas, se hallan en SEQ ID N°: 4, 289 a 303. La afinidad de unión del compuesto con el polipéptido se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mediante el uso de biosensores de resonancia de plasmón superficial
30 (Biacore), mediante análisis de unión por saturación con un compuesto marcado (p.ej. análisis de Scatchard y Lindmo), mediante espectrometría UV diferencial, ensayo de polarización de fluorescencia, el sistema Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR®), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, y transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia. La afinidad de unión de los compuestos se puede
35 expresar también como la constante de disociación (Kd) o como CI50 o CE50. La CI50

representa la concentración de un compuesto que es necesaria para una inhibición del 50% de la unión de otro ligando al polipéptido. La CE50 representa la concentración necesaria para obtener un 50% del efecto máximo en cualquier ensayo que mida la función del receptor. La constante de disociación, K_d , es una medida del grado de unión de un ligando al polipéptido, y es equivalente a la concentración de ligando necesaria para saturar exactamente la mitad de los sitios de unión del polipéptido. Los compuestos con una unión de afinidad elevada tienen valores bajos de K_d , CI50 y CE50, es decir, en el intervalo de 100 nM a 1 pM; una unión de afinidad moderada a baja se relaciona con valores elevados de K_d , CI50 y CE50, es decir, en el intervalo micromolar.

El presente método de ensayo se puede poner en práctica también en un ensayo celular. Una célula hospedadora que expresa un polipéptido GPR3 puede ser una célula con una expresión endógena del polipéptido o una célula que sobreexpresa el polipéptido, p.ej. mediante transducción. Cuando la expresión endógena del polipéptido no es suficiente para determinar un valor basal que se pueda medir fácilmente, se pueden usar células hospedadoras que sobreexpresan GPR3. La sobreexpresión tiene la ventaja de que el nivel del segundo mensajero es superior que el nivel de actividad por la expresión endógena. Por lo tanto, la medida de tales niveles mediante el uso de las técnicas disponibles actualmente es más fácil. En tal ensayo celular, se puede medir la actividad biológica de GPR3 mediante el uso de un segundo mensajero, tal como AMP cíclico o Ca^{2+} , GMP cíclico, trifosfato de inositol (IP3) y/o diacilglicerol (DAG). El AMP cíclico o Ca^{2+} son los segundos mensajeros preferidos para la medida. La activación del segundo mensajero se puede medir mediante varias técnicas diferentes, directamente mediante ELISA o técnicas radiactivas, o indirectamente mediante un análisis de genes indicadores, discutidas más adelante. Preferiblemente, el método comprende además poner en contacto la célula hospedadora con un agonista de GPCR antes de determinar el nivel basal. La adición de un agonista estimula adicionalmente GPCR, por lo que se incrementa el nivel de actividad del segundo mensajero. Se conocen en la técnica una variedad de tales agonistas (ligandos); preferentemente, el agonista es 1-fosfato de esfingosina o 1-fosfato de dihidroesfingosina. Los polipéptidos GPR3, cuando se sobreexpresan, activan el nivel de los péptidos β -amiloides secretados.

Se describe un método para identificar un compuesto que inhibe el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en una célula de mamífero, que comprende:

- (a) poner en contacto un compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6,
- (b) determinar la afinidad de unión del compuesto al polipéptido,
- 5 (c) poner en contacto una población de células de mamífero que expresan dicho polipéptido con el compuesto que exhibe una afinidad de unión de al menos 10 micromolar, y
- (d) identificar el compuesto que inhibe el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en las células.

10 Se describe un método para identificar un compuesto que inhibe el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en una célula, en el que el nivel de actividad del polipéptido GPCR se mide determinando el nivel de uno o más segundos mensajeros, en el que el nivel del uno o más segundos mensajeros se determina con un indicador controlado por un promotor, que responde al segundo mensajero. El indi-

15 cador es un gen indicador bajo la regulación de un promotor que responde a nivel celular de los segundos mensajeros. Tales segundos mensajeros preferidos son AMP cíclico o Ca^{2+} . El gen indicador debería tener un producto génico que se detecte fácilmente, y que se pueda infectar de manera estable en la célula hospedadora. Cualquier experto en la técnica conoce bien tales métodos.

20 El gen indicador se puede seleccionar de fosfatasa alcalina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), proteína fluorescente verde desestabilizada (dGFP), luciferasa, β -galactosidasa, y otros. El indicador es preferiblemente luciferasa o β -galactosidasa, que están fácilmente disponibles y son fáciles de medir a lo largo de un gran intervalo. El promotor de la construcción

25 indicadora es preferiblemente un promotor que responde a AMP cíclico, un promotor que responde a NF-KB, o un promotor que responde a NF-AT. El promotor que responde a AMP cíclico responde a los niveles de AMP cíclico en la célula. El promotor que responde a NF-AT es sensible a los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} en la célula. El promotor que responde a NF-KB es sensible a los niveles de NF- κ B activado en la

30 célula.

La presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto que inhibe el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en una célula, en el que se mide el nivel de actividad del polipéptido GPR3 determinando el nivel de los péptidos β -amiloides. Los niveles de estos péptidos se pueden medir con ELISAs es-

35 pecíficos mediante el uso de anticuerpos que reconocen específicamente las diferen-

tes especies de péptidos meta-amiloides (véase, p.ej., el Ejemplo 1). La secreción de los diversos péptidos β -amiloides se puede medir también mediante el uso de anticuerpos que se unen a todos los péptidos. Los niveles de los péptidos β -amiloides se pueden medir también mediante análisis de espectrometría de masas.

5 Para fines de alto rendimiento, se pueden usar bibliotecas de compuestos tales como bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de expresión peptídica en fagos, bibliotecas peptídicas (p.ej., LOPAPTM, Sigma Aldrich), bibliotecas lipídicas (BioMol), bibliotecas de compuestos sintéticos (p.ej. LOPACTM, Sigma Aldrich) o bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec).

10 Los compuestos candidatos a fármacos preferidos son compuestos de pesos moleculares bajos. Es probable que los compuestos de pesos moleculares bajos, es decir, con un peso molecular de 500 Daltons o menos, tengan una buena absorción y penetración en los sistemas biológicos, y por lo tanto es probable que sean candidatos a fármacos más satisfactorios que los compuestos con un peso molecular por encima
15 de 500 Daltons (Lipinski et al. (1997)). Los péptidos comprenden otra clase preferida de compuestos candidatos a fármacos, ya que los péptidos son antagonistas de GPR3 conocidos. Los péptidos pueden ser excelentes candidatos a fármacos, y hay múltiples ejemplos de péptidos valiosos comercialmente tales como hormonas de fertilidad e inhibidores de la agregación plaquetaria. Los compuestos naturales son otra clase
20 preferida de compuestos candidatos a fármacos. Tales compuestos se hallan y se extraen de fuentes naturales, y se pueden sintetizar a partir de ellos. Los lípidos son otra clase preferida de compuestos candidatos a fármacos. Los lípidos pueden ser antagonistas del GPR3 enumerado en la Tabla 2 (SEQ ID N°: 4).

Otra clase preferida de compuestos candidatos a fármacos es un anticuerpo.
25 La presente invención también proporciona anticuerpos dirigidos contra los dominios extracelulares de GPR3. Estos anticuerpos se deberían unir de forma específica a uno o más de los dominios extracelulares de GPR3, o, tal como se describe adicionalmente más adelante, se deberían modificar para producirse de forma endógena para unirse al dominio intracelular de GPR3. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos mo-
30 noclonales o anticuerpos policlonales. La presente descripción incluye anticuerpos quiméricos, de cadena simple, y humanizados, así como los fragmentos de FAb y los productos de una biblioteca de expresión de FAb, y los fragmentos Fv y los productos de una biblioteca de expresión de Fv.

En ciertas realizaciones, se pueden usar anticuerpos policlonales en la práctica
35 de la invención. El experto conoce métodos para preparar anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. En general, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en un mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. También se pueden ge-
5 nerar anticuerpos contra la proteína o el polipéptido GPR3 intacto, o contra un frag-
mento tal como los péptidos de su dominio extracelular, los derivados que incluyen los
conjugados, u otro epítipo de la proteína o el polipéptido GPR3, tal como GPR3 in-
crustado en una membrana celular, o una biblioteca de regiones variables de anticuer-
pos, tal como una biblioteca de expresión en fagos.

10 Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe
que es inmunógena en el mamífero a inmunizar. Los ejemplos de tales proteínas in-
munógenas incluyen, pero sin limitación, la hemocianina de lapa californiana, albúmina
de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de los ad-
yuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyu-
15 vante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Un
experto en la técnica puede seleccionar el protocolo de inmunización sin experimenta-
ción excesiva.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el uso de métodos cono-
20 cidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden
"humanizar" para evitar que el hospedador desarrolle una respuesta inmunitaria hacia
los anticuerpos. Un "anticuerpo humanizado" es uno en el que las regiones determi-
nantes de la complementariedad (CDRs) y/o otras porciones de la estructura de los
dominios variables de las cadenas ligeras y/o pesadas proceden de una inmunoglobu-
25 lina no humana, pero el resto de porciones de la molécula proceden de una o más
inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanizados pueden incluir además an-
ticuerpos caracterizados por una cadena pesada humanizada asociada a una cadena
ligera sin modificar donante o aceptora o una cadena ligera quimérica, o viceversa. La
humanización de los anticuerpos se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos
30 en la técnica (véase, p.ej., Mark y Padlan, (1994) "Chapter 4. Humanization of
Monoclonal Antibodies", The Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 113,
Springer-Verlag, Nueva York). Se pueden usar animales transgénicos para expresar
anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos humanos se pueden producir también mediante el uso de
35 diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen las bibliotecas de expresión en

fagos (Hoogenboom y Winter, (1991) J. Mol. Biol. 227:381-8; Marks et al. (1991). J. Mol. Biol. 222:581-97). También están disponibles las técnicas de Cole, et al. y Boerner, et al. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77; Boerner, et al (1991). J. Immunol., 147(1):86-95).

Los métodos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos de cadena simple se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena simple para los polipéptidos y proteínas GPR3. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de una cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca en general en cualquier punto de la región Fc para evitar el entrecruzamiento de las cadenas pesadas. De forma alternativa, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otros residuos de aminoácidos o se eliminan para evitar el entrecruzamiento.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión hacia al menos dos antígenos diferentes, y preferiblemente hacia una proteína de la superficie celular o receptor o subunidad de receptor. En el caso presente, una de las especificidades de unión es hacia un dominio extracelular de GPR3, y la otra es hacia otro dominio extracelular.

Se conocen métodos para producir anticuerpos biespecíficos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, (1983) Nature 305:537-9). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. Las etapas de cromatografía de afinidad normalmente consiguen la purificación de la molécula correcta. Se describen procedimientos similares en Trauneeker, et al. (1991) EMBO J. 10:3655-9.

Según otra realización preferida, el método de ensayo comprende usar un compuesto candidato a fármaco que se ha identificado que tiene una afinidad de unión hacia GPR3, y/o que ya se ha identificado que tiene una actividad inhibidora tal como una actividad de antagonista o de agonista inverso con respecto a GPR3. Los ejem-

plos de tales compuestos son los compuestos de ariloxiditiourea descritos en el documento US 6.420.563 (documento WO 01/62765).

Se describe un método para reducir el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en una célula de mamífero, que comprende poner en contacto dicha
5 célula con un agente de inhibición de la expresión que inhibe la traducción en la célula de un polirribonucleótido que codifica un polipéptido GPCR. Una realización particular se refiere a una composición que comprende un polinucleótido que incluye al menos una cadena inversa que funciona para emparejar el agente con el mRNA de GPCR, y por lo tanto inhibir o bloquear la expresión del polipéptido GPCR. El agente inhibidor
10 comprende preferiblemente un polinucleótido inverso, una ribozima, y un ARN pequeño de interferencia (siARN), en el que dicho agente comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a, o modificada a partir de, una secuencia polinucleotídica natural que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6.

15 Una realización especial se refiere a un método en el que el agente de inhibición de la expresión se selecciona del grupo que consiste en ARN inverso, oligodesoxinucleótido (ODN) inverso, una ribozima que escinde el polirribonucleótido que codifica SEQ ID N°: 4-6, un ARN pequeño de interferencia (siARN) que es lo suficientemente homólogo a una porción del polirribonucleótido que corresponde a SEQ
20 ID N°: 4-6 de forma que el siARN interfiere con la traducción del polirribonucleótido de GPCR hasta el polipéptido GPCR.

Se describe un método en el que el agente de inhibición de la expresión es un ácido nucleico que expresa el ARN inverso, oligodesoxinucleótido (ODN) inverso, una ribozima que escinde el polirribonucleótido que codifica SEQ ID N°: 4-6, un ARN pequeño de interferencia (siARN) que es lo suficientemente homólogo a una porción del polirribonucleótido que corresponde a SEQ ID N°: 4-6 de forma que el siARN interfiere con la traducción del polirribonucleótido de GPCR hasta el polipéptido GPCR. Preferi-
25 blemente, el agente de inhibición de la expresión es un ARN inverso, ribozima, oligodesoxinucleótido inverso, o siARN que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 7-287.
30

La inhibición de la expresión génica mediante el uso de ácidos nucleicos inversos se puede llevar a cabo a nivel traduccional o transcripcional. Los ácidos nucleicos inversos de la invención son preferiblemente fragmentos de ácidos nucleicos capaces de hibridar de manera específica con todo o parte de un ácido nucleico que codifica un
35 polipéptido GPCR o el ARN mensajero correspondiente. Además, se pueden diseñar

ácidos nucleicos inversos que disminuyen la expresión de la secuencia de ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido GPCR inhibiendo el corte y empalme de su transcrito primario. Es adecuada cualquier longitud de la secuencia inversa para la práctica de la invención, con tal de que sea capaz de inhibir o bloquear la expresión de un ácido nucleico que codifica una GPCR. Preferiblemente, la secuencia inversa tiene al menos alrededor de 17 nucleótidos de longitud. Se conoce en la técnica la preparación y el uso de ácidos nucleicos inversos, ADN que codifica ARNs inversos y el uso de oligonucleótidos y secuencias genéticas inversas.

Una realización del agente de inhibición de la expresión es un ácido nucleico que es inverso respecto de un ácido nucleico que comprende SEQ ID N°: 1-3. Por ejemplo, se puede introducir un ácido nucleico inverso (p.ej., ADN) en las células *in vitro*, o se puede administrar a un sujeto *in vivo*, como terapia génica para inhibir la expresión celular de los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID N°: 1-3. Los oligonucleótidos inversos comprenden preferiblemente una secuencia que contiene de alrededor de 17 a alrededor de 100 nucleótidos, y más preferiblemente los oligonucleótidos inversos comprenden de alrededor de 18 a alrededor de 30 nucleótidos. Se pueden preparar ácidos nucleicos inversos de alrededor de 10 a alrededor de 30 nucleótidos contiguos seleccionados de las secuencias de SEQ ID N°: 1-3, expresados en la orientación opuesta.

Los ácidos nucleicos inversos pueden ser oligonucleótidos que pueden consistir completamente en desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, o cierta combinación de ambos. Los ácidos nucleicos inversos pueden ser oligonucleótidos sintéticos. Los oligonucleótidos pueden estar modificados químicamente, si se desea, para mejorar la estabilidad y/o la selectividad. Debido a que los oligonucleótidos son susceptibles a la degradación por las nucleasas intracelulares, las modificaciones puede incluir, por ejemplo, el uso de un grupo azufre para sustituir el oxígeno libre del enlace fosfodiéster. Esta modificación se denomina enlace de fosforotioato. Los oligonucleótidos inversos de fosforotioato son hidrosolubles, polianiónicos, y resistentes a las nucleasas endógenas. Además, cuando el oligonucleótido inverso de fosforotioato se hibrida en su sitio seleccionado como objetivo, la molécula doble ARN-ADN activa a la enzima endógena ribonucleasa (RNasa) H, que escinde el componente de mARN de la molécula híbrida.

Además, se pueden sintetizar oligonucleótidos inversos con enlaces de fosforamidita y poliamida (péptido). Estas moléculas deberían ser resistentes a la degradación por nucleasas. Además, se pueden añadir grupos químicos en el carbono 2'

del resto de carbohidrato y en el carbono 5 (C-5) de las pirimidinas para incrementar la estabilidad y facilitar la unión del oligonucleótido inverso en su sitio seleccionado como objetivo. Las modificaciones pueden incluir 2'-desoxi, O-pentoxi, O-propoxi, O-metoxi, fluoro, metoxietoxi fosforotioatos, bases modificadas, así como otras modificaciones conocidas para los expertos en la técnica.

Otro tipo de agentes de inhibición de la expresión que reducen los niveles de los GPCRs son las ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas (enzimas de ARN) que tienen distintos dominios catalíticos y de unión al sustrato. La secuencia de unión al sustrato combina la complementariedad de nucleótidos y, posiblemente, interacciones que no son por enlaces de hidrógeno con su secuencia objetivo. La porción catalítica escinde el ARN objetivo en un sitio específico. El dominio del sustrato de una ribozima se puede modificar para dirigirlo hacia una secuencia de mARN especificada. La ribozima reconoce y después se une al mARN objetivo por medio del emparejamiento de bases complementarias. Una vez que se ha unido al sitio correcto seleccionado como objetivo, la ribozima actúa de forma enzimática para cortar el mARN objetivo. La escisión del mARN por una ribozima destruye su capacidad de dirigir la síntesis del polipéptido correspondiente. Una vez que la ribozima ha escindido su secuencia objetivo, se libera y se puede unir y escindir repetidamente a otros mARNs.

Las formas de las ribozimas incluyen un motivo de cabeza de martillo, un motivo de horquilla, intrón del grupo I o ARN de RNasaP (en asociación con una secuencia de guía de ARN) del virus de la hepatitis delta, o un motivo de ARN VS de *Neurospora*. Las ribozimas que poseen una estructura de cabeza de martillo o de horquilla se preparan fácilmente, ya que estas moléculas de ARN catalíticas se pueden expresar dentro de las células a partir de promotores eucariotas (Chen, et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:4581-9). Se puede expresar una ribozima de la presente invención en las células eucarióticas a partir de un vector de ADN apropiado. Si se desea, la actividad de la ribozima se puede aumentar mediante su liberación del transcrito primario mediante una segunda ribozima (Ventura, et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21 :3249-55).

Las ribozimas se pueden sintetizar químicamente combinando un oligodesoxirribonucleótido con un dominio catalítico de ribozima (20 nucleótidos) flanqueado por secuencias que hibridan con el mARN objetivo tras la transcripción. El oligodesoxirribonucleótido se amplifica mediante el uso de las secuencias de unión al

sustrato como cebadores. El producto de la amplificación se clona en un vector de expresión en eucariotas.

Las ribozimas se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en el ADN, ARN, o vectores virales. La transcripción de las secuencias de ribozimas se controlan a partir de un promotor para la ARN polimerasa I (pol I), ARN polimerasa II (pol II), o ARN polimerasa III (pol III) eucariótica. Los transcritos de los promotores de pol II o pol III se expresarán a niveles elevados en todas las células; los niveles de un promotor de pol II dado en un tipo dado de células dependerá de las secuencias reguladoras génicas cercanas. También se usan los promotores de la ARN polimerasa procariótica, con tal de que la enzima ARN polimerasa procariótica se exprese en las células apropiadas (Gao y Huang, (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2867-72). Se ha demostrado que las ribozimas expresadas a partir de estos promotores pueden funcionar en las células de mamífero (Kashani-Sabet, et al. (1992) *Antisense Res. Dev.* 2:3-15).

Un agente inhibidor puede ser un ARN pequeño de interferencia (siARN). Los siARNs actúan como mediadores en el proceso postraduccional del silenciamiento génico mediante un ARN bicatenario (dsARN) que tiene una secuencia homóloga al ARN silenciado. El siARN según la presente invención comprende una cadena directa de 17-25 nucleótidos complementaria u homóloga a una secuencia nucleotídica de 17-25 contigua seleccionada del grupo de secuencias descritas en SEQ ID N°: 1-3, y una cadena inversa de 17-23 nucleótidos complementaria a la cadena directa. El siARN más preferido comprende cadenas directas e inversas que son complementarias en un 100% entre sí y la secuencia polinucleotídica seleccionada como objetivo. Preferiblemente, el siARN comprende además una región de horquilla que enlaza las cadenas directa e indirecta.

Una molécula polinucleotídica de siARN monocatenaria autocomplementaria comprende una porción directa y una porción inversa conectadas por una región ligadora de horquilla. Preferiblemente, la secuencia de la región de horquilla tiene una longitud de 4-30 nucleótidos, más preferiblemente 5-15 nucleótidos y lo más preferiblemente 8 nucleótidos. En la realización más preferida, la secuencia ligadora es UUGCUAUA (SEQ ID N°: 288). Los siARNs monocatenarios autocomplementarios forman horquillas y son más estables que los dsARN habituales. Además, se producen más fácilmente a partir de vectores.

De forma análoga al ARN inverso, el siARN se puede modificar para confirmar la resistencia a la degradación nucleolítica, o para aumentar la actividad, o para aumentar la distribución celular, o para aumentar la absorción celular, y tales modifica-

ciones pueden consistir en enlaces internucleósido modificados, bases de ácidos nucleicos modificadas, carbohidratos modificados y/o la unión química del siARN a uno o más restos o conjugados. Las secuencias nucleotídicas se seleccionan según las reglas de diseño del siARN que proporcionan una reducción mejorada de las secuencias objetivo en comparación con las secuencias nucleotídicas que no cumplen estas reglas de diseño del siARN (para una discusión de estas reglas y ejemplos de preparación del siARN, véase el documento WO2004094636, publicado el 4 de noviembre de 2004, y el documento UA20030198627).

Se describen composiciones y los métodos de uso de dichas composiciones, que comprenden un vector de expresión de ADN capaz de expresar un polinucleótido capaz de inhibir el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide tal como se describió anteriormente en la presente memoria como agente de inhibición de la expresión.

Un aspecto especial de estas composiciones y métodos se refiere a la inhibición o el bloqueo de la expresión de un polipéptido GPCR mediante la expresión inducida de un polinucleótido que codifica una proteína de unión intracelular que es capaz de interactuar selectivamente con el polipéptido GPCR. Una proteína de unión intracelular incluye cualquier proteína capaz de interactuar selectivamente, o unirse, con el polipéptido en la célula en la que se expresa y neutralizar la función del polipéptido. La proteína de unión intracelular puede ser un anticuerpo neutralizante o un fragmento de un anticuerpo neutralizante que tiene afinidad de unión con un dominio intracelular del polipéptido GPCR de SEQ ID N°: 4-6. La proteína de unión intracelular puede ser un anticuerpo de cadena simple.

Esta composición puede comprender el agente de inhibición de la expresión seleccionado del grupo que consiste en ARN inverso, oligodesoxinucleótido (ODN) inverso, una ribozima que escinde el polirribonucleótido que codifica SEQ ID N°: 4-6, y un ARN pequeño de interferencia (siARN) que es lo suficientemente homólogo a una porción del polirribonucleótido que corresponde a SEQ ID N°: 4-6 de forma que el siARN interfiere con la traducción del polirribonucleótido de GPCR hasta el polipéptido GPCR.

El polinucleótido que expresa el agente de inhibición de la expresión o el que codifica una proteína de unión intracelular se puede incluir dentro de un vector. El ácido nucleico se une de manera operable a señales que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico, y se introduce en una célula mediante la utilización, preferiblemente, de construcciones de vectores recombinantes, que expresarán el ácido

nucleico inverso una vez que el vector se introduzca en la célula. Hay disponibles una diversidad de sistemas basados en virus, que incluyen los sistemas de vectores adenovirales, retrovirales, virales adenoasociados, lentivirales, virales de herpes simple o sendavirales, y todos se pueden usar para introducir y expresar una secuencia polinucleotídica para los agentes que inhiben la expresión en las células objetivo.

Los vectores virales usados en los métodos pueden ser deficientes de replicación. Tales vectores deficientes de replicación carecerán normalmente de al menos una región que es necesaria para la replicación del virus en la célula infectada. Estas regiones se pueden eliminar (completamente o parcialmente), o se pueden hacer no funcionales mediante cualquier método conocido para un experto en la técnica. Estas técnicas incluyen la eliminación total, la sustitución, la delección parcial o la adición de una o más bases en una región esencial (para la replicación). Tales técnicas se pueden llevar a cabo in vitro (sobre el ADN aislado) o in situ, mediante el uso de técnicas de manipulación genética o mediante el tratamiento con agentes mutagénicos. Preferiblemente, el virus deficiente de replicación mantiene las secuencias de su genoma, que son necesarias para la encapsulación de las partículas virales.

El elemento viral puede proceder de un adenovirus. El vehículo puede incluir un vector adenoviral encapsulado en una cápside adenoviral, o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo. La biología del adenovirus es también muy conocida comparativamente a nivel molecular. Se han desarrollado y se siguen desarrollando muchas herramientas para los vectores adenovirales, lo que hace que la cápside adenoviral sea un vehículo preferido para la incorporación en una biblioteca de la invención. Un adenovirus es capaz de infectar una amplia diversidad de células. Sin embargo, diferentes serotipos adenovirales tienen diferentes preferencias por las células. Para combinar y ampliar la población celular objetivo en la que puede entrar una cápside adenoviral de la invención en una realización preferida, el vehículo incluye proteínas fibrosas adenovirales de al menos dos adenovirus.

El ácido nucleico puede proceder de un adenovirus e incluye el ácido nucleico que codifica una proteína tardía adenoviral o una parte, derivado y/o análogo funcional de la misma. Se puede usar de manera favorable una proteína tardía adenoviral, por ejemplo una proteína fibrosa adenoviral, para dirigir el vehículo a una cierta célula o para inducir la administración mejorada del vehículo a la célula. El ácido nucleico derivado de un adenovirus puede codificar esencialmente todas las proteínas tardías adenovirales, lo que permite la formación de las cápsides adenovirales completas o de partes, análogos y/o derivados funcionales de las mismas. El ácido nucleico derivado

de un adenovirus puede incluir el ácido nucleico que codifica el adenovirus E2A o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. El ácido nucleico derivado de un adenovirus puede incluir el ácido nucleico que codifica al menos una proteína de la región E4 o una parte, derivado y/o análogo funcional de la misma, que facilita, al menos en parte, la replicación de un ácido nucleico derivado de adenovirus en una célula. Los vectores adenovirales usados en los ejemplos de esta solicitud son ejemplares de los vectores.

Se describen ciertas realizaciones que usan sistemas de vectores retrovirales. Los retrovirus son virus de integración que infectan las células en división, y su construcción se conoce en la técnica. Los vectores retrovirales se pueden construir a partir de diferentes tipos de retrovirus, tales como MoMuLV ("virus de la leucemia murina de Moloney") MSV ("virus de sarcoma murino de Moloney"), HaSV ("virus de sarcoma de Harvey"); SNV ("virus de la necrosis esplénica"); RSV ("virus de sarcoma de Rous") y virus de Friend. También se pueden usar sistemas de vectores lentivirales en la práctica de la presente invención. Los sistemas retrovirales y el sistema de virus herpes pueden ser vehículos para la transfección de las células neuronales.

Se pueden usar virus adenoasociados ("AAV"). Los virus AAV son virus de ADN de un tamaño relativamente pequeño que se integran, de una manera estable y específica de sitio, en el genoma de las células infectadas. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, la morfología o la diferenciación, y no parecen estar implicados en las patologías humanas.

En la construcción del vector, los agentes polinucleotídicos pueden estar unidos a una o más regiones reguladoras. La selección de la región o regiones reguladoras apropiadas es una cuestión rutinaria, que está dentro de la experiencia habitual en la técnica. Las regiones reguladoras incluyen promotores, y pueden incluir potenciadores, represores, etc.

Los promotores que se pueden usar en los vectores de expresión incluyen tanto promotores constitutivos como promotores regulados (inducibles). Los promotores pueden ser procarióticos o eucarióticos dependiendo del hospedador. Entre los promotores procarióticos (que incluyen los bacteriófagos) útiles para la práctica están los promotores lac, lacZ, T3, T7, lambda P_r, P₁, y trp. Entre los promotores eucarióticos (que incluyen los virales) útiles para la práctica están los promotores ubicuos (p.ej. HPRT, vimentina, actina, tubulina), los promotores de los filamentos intermedios (p.ej. desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP), los promotores de genes terapéuticos

(p.ej. de tipo MDR, CFTR, factor VIII), los promotores específicos de tejido (p.ej. el promotor de actina en las células musculares lisas, o los promotores Flt y Flk activos en las células endoteliales), que incluyen las regiones de control transcripcional de animales, que exhiben especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que es activa en las células acinares pancreáticas (Swift, et al. (1984) *Cell* 38:639-46; Ornitz, et al. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, (1987) *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en las células β pancreáticas (Hanahan, (1985) *Nature* 315:115-22), la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en las células linfoides (Grosschedl, et al. (1984) *Cell* 38:647-58; Adames, et al. (1985) *Nature* 318:533-8; Alexander, et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-44), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en las células testiculares, mamas, linfoides y en los mastocitos (Leder, et al. (1986) *Cell* 45:485-95), la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert, et al. (1987) *Genes and Devel.* 1 :268-76), la región de control del gen de α -fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf, et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-48; Hammer, et al. (1987) *Science* 235:53-8), la región de control del gen de α 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey, et al. (1987) *Genes and Devel.*, 1: 161-71), la región de control del gen de β -globina que es activa en las células mieloides (Mogam, et al. (1985) *Nature* 315:338-40; Kollias, et al. (1986) *Cell* 46:89-94), la región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activa en las células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead, et al. (1987) *Cell* 48:703-12), la región de control del gen de la cadena ligera de miosina 2 que es activa en el músculo esquelético (Sani, (1985) *Nature* 314.283-6), y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en el hipotálamo (Mason, et al. (1986) *Science* 234:1372-8).

Otros promotores que se pueden usar en la práctica incluyen los promotores que se activan preferentemente en las células en división, los promotores que responden a un estímulo (p.ej., receptor de hormonas esteroideas, receptor de ácido retinoico), moduladores transcripcionales regulados por tetraciclina, promotores inmediatos tempranos de citomegalovirus, LTR retroviral, metalotioneina, SV-40, Ela, y MLP.

Los vectores pueden incluir también otros elementos, tales como potenciadores, sistemas represores, y señales de localización. Una señal de localización de la membrana es un elemento preferido cuando se expresa una secuencia que codifica una proteína de unión intracelular, que funciona poniendo en contacto el dominio intra-

celular de GPR3, y es más eficaz cuando el producto del vector se dirige a la superficie interna de la membrana celular, donde reside su objetivo. Las señales de localización de la membrana son muy conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, un dominio de localización de la membrana adecuado para localizar un polipéptido en la membrana plasmática es la secuencia C-terminal CaaX para la farnesilación (en la que "a" es un residuo de aminoácido alifático, y "X" es cualquier residuo de aminoácido, en general leucina), por ejemplo, Cisteína-Alanina-Alanina-Leucina, o Cisteína-Isoleucina-Valina-Metionina. Otras señales de localización de la membrana incluyen la supuesta secuencia de localización de la membrana del extremo C-terminal de Bcl-2 o el extremo C-terminal de otros miembros de la familia Bcl-2 de proteínas.

Los sistemas de vectores adicionales incluyen los sistemas no virales que facilitan la introducción de agentes polinucleotídicos en un paciente. Por ejemplo, se puede introducir un vector de ADN que codifica una secuencia deseada in vivo mediante lipofección. Se pueden usar lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades encontradas con la transfección mediada por liposomas para preparar liposomas para la transfección in vivo de un gen que codifica un marcador (Felgner, et. al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7); véase Mackey, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31; Ulmer, et al. (1993) Science 259:1745-8). El uso de lípidos catiónicos puede favorecer la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y también puede favorecer la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner y Ringold, (1989) Nature 337:387-8). Los compuestos lipídicos y las composiciones especialmente útiles para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en las publicaciones de patentes internacionales WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la pat. de EE.UU. nº 5.459.127. El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en los órganos específicos in vivo tiene ciertas ventajas prácticas, y el dirigir la transfección hacia tipos celulares particulares sería ventajoso en particular en un tejido con heterogeneidad celular, por ejemplo, páncreas, hígado, riñón, y cerebro. Los lípidos se pueden unir químicamente a otras moléculas con el propósito de la selección del objetivo. Se podrían unir químicamente péptidos que seleccionan el objetivo, p.ej., hormonas o neurotransmisores, y proteínas, por ejemplo anticuerpos, o moléculas no peptídicas a liposomas. Otras moléculas son útiles también para facilitar la transfección de un ácido nucleico in vivo, por ejemplo, un oligopéptido catiónico (p.ej., la publicación de patente internacional WO 95/21931), los péptidos derivados de proteínas de unión al ADN (p.ej., la publicación de patente internacional WO

96/25508), o un polímero catiónico (p.ej., la publicación de patente internacional WO 95/21931).

También es posible introducir un vector de ADN in vivo en forma de un plásmido de ADN desnudo (véanse las pat. de EE.UU. n°s 5.693.622, 5.589.466 y 5.580.859). Los vectores de ADN desnudo para fines terapéuticos se pueden introducir en las células hospedadoras deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, p.ej., transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato cálcico, el uso de una pistola de genes, o el uso de un transportador de vectores de ADN (véase, p.ej., Wilson, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:963-7; Wu y Wu, (1988) J. Biol. Chem. 263:14621-4; Hartmut, et al. solicitud de patente canadiense n° 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990; Williams, et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-30). También se pueden usar las aproximaciones de administración de ADN mediada por receptores (Curiel, et al. (1992) Hum. Gene Ther. 3:147- 54; Wu y Wu, (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-32).

Se describen composiciones biológicamente compatibles que comprenden los compuestos identificados como antagonistas y/o agonistas inversos de GPCR, y los agentes de inhibición de la expresión tal como se describieron anteriormente en la presente memoria.

Una composición biológicamente compatible es una composición que puede estar en forma de un sólido, líquido, gel, u otra forma, en la que el compuesto, polinucleótido, vector, y anticuerpo de la invención se mantiene en una forma activa, p.ej., en una forma capaz de llevar a cabo una actividad biológica. Por ejemplo, un compuesto tendría una actividad de agonista inverso o antagonista sobre GPR3; un ácido nucleico sería capaz de replicarse, traducirse a un mensaje, o hibridar con un mRNA complementario de GPR3; un vector sería capaz de transfectar una célula objetivo y expresar la molécula inversa, anticuerpo, ribozima o siARN tal como se describió anteriormente en la presente memoria; un anticuerpo se uniría a un dominio del polipéptido GPR3.

Una composición biológicamente compatible puede ser una disolución acuosa que está tamponada mediante el uso, p.ej., de tampón Tris, fosfato, o HEPES, que contienen iones salinos. Normalmente, la concentración de los iones salinos será similar a los niveles fisiológicos. Las disoluciones biológicamente compatibles pueden incluir agentes estabilizantes y conservantes. En una realización más preferida, la composición biocompatible es una composición farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones se pueden formular para la administración mediante vía tópica, oral, parenteral, intranasal, subcutánea, e intraocular. La administración parenteral pretende

incluir la inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraarterial o las técnicas de infusión. La composición se puede administrar de forma parenteral en formulaciones unitarias que contienen vehículos y adyuvantes habituales atóxicos fisiológicamente aceptables muy conocidos, según se desee.

5 Se describe una composición farmacéutica para la mejora cognitiva que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de inhibición de la expresión tal como se describió anteriormente en la presente memoria, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otra composición es una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una afección que implica el deterioro
10 cognitivo o una susceptibilidad a la afección, que comprende una cantidad eficaz de inhibición del péptido β -amiloide de un antagonista o agonista inverso de GPCR o las sales, hidratos, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden comprender un compuesto de ariloxiditiourea.

15 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden formular mediante el uso de vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica en dosis adecuadas para la administración oral. Tales vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión por
20 parte del paciente. Las composiciones farmacéuticas para uso oral se pueden preparar combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras la adición de agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de grageas o comprimidos. Los excipientes adecuados son rellenos de carbohidratos o proteínas, tales como azú-
25 cares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa, tal como metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, o carboximetil-celulosa sódica; gomas que incluyen goma arábica y tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico,
30 o una sal del mismo, tal como alginato sódico. Se pueden usar núcleos de grageas junto con revestimientos adecuados, tales como disoluciones concentradas de azúcares, que pueden contener además goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a

los revestimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosis.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar de forma oral incluyen las cápsulas duras hechas de gelatina, así como las cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un revestimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden 5 contener ingredientes activos mezclados con rellenos o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato magnésico, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos, o 10 polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Las preparaciones inyectables estériles pueden ser una disolución o suspensión en un disolvente o diluyente atóxico parenteralmente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución salina tamporada, solución salina isotónica (p.ej., fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, 15 potásico, cálcico o magnésico, o mezclas de tales sales), disolución de Ringer, dextrosa, agua, agua estéril, glicerol, etanol, y las combinaciones de los mismos. Se emplean convenientemente 1,3-butanodiol y aceites fijos estériles como disolventes o medios de suspensión. Se puede emplear cualquier aceite fijo suave, lo que incluye mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico también 20 tienen uso en la preparación de composiciones inyectables.

El medio de la composición también puede ser un hidrogel, que se prepara a partir de cualquier homo- o hetero-polímero biocompatible o no citotóxico, tal como un polímero de poli(ácido acrílico) hidrófilo que puede actuar como una esponja de absorción de fármacos. Algunos de ellos, tales como, en particular, los obtenidos del óxido 25 de etileno y/o propileno están disponibles comercialmente. Se puede depositar un hidrogel directamente sobre la superficie del tejido a tratar, por ejemplo durante una intervención quirúrgica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vector viral recombinante deficiente de replicación que codifica el agente inhibidor polinucleotídico de la presente invención y un potenciador de la transfección, tal como un poloxámero. Un 30 ejemplo de un poloxámero es el Poloxámero 407, que está disponible comercialmente (BASF, Parsippany, N.J.) y que es un poliol atóxico biocompatible. Se puede depositar un poloxámero impregnado con virus recombinantes directamente sobre la superficie del tejido a tratar, por ejemplo durante una intervención quirúrgica. El poloxámero po-

see esencialmente las mismas ventajas que el hidrogel, aunque tiene una viscosidad menor.

Los agentes de inhibición de la expresión activos se pueden atrapar también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante polimerización interfacial, por ejemplo, cápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed.

Se pueden preparar preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, y cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, p.ej. películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (pat. de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™, (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque los polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares por medio del intercambio tio-disulfuro, se puede llevar a cabo la estabilización modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Se describen métodos para inhibir el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en un sujeto que padece o que es susceptible al procesamiento normal de dicha proteína, que comprenden la administración a dicho sujeto de una cantidad

terapéuticamente eficaz de un agente de inhibición de la expresión de la invención. Otro aspecto del método es el tratamiento o la prevención de una afección que implica el deterioro cognitivo o la susceptibilidad a la afección. Una realización especial de esto es un método en el que la afección es la enfermedad de Alzheimer.

5 Tal como se definió anteriormente, una dosis terapéuticamente eficaz significa la cantidad de proteína, polinucleótido, péptido, o sus anticuerpos, agonistas o antagonistas, que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos habituales en cultivos celulares o en animales de experimentación, p.ej., la DE50 (la
10 dosis terapéuticamente eficaz en un 50% de la población) y la DL50 (la dosis letal para un 50% de la población). La proporción de dosis de los efectos tóxicos respecto de los terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción DL50/DE50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos a partir de los ensayos con cultivos celulares y
15 de los estudios con animales se usan para formular un intervalo de dosis para el uso en seres humanos. Las dosis de tales compuestos se hallan preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada, la sensibilidad del paciente, y la vía de administración.

20 Para cualquier compuesto, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz en ensayos con cultivos celulares o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal se usa también para conseguir un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Tal información se puede usar después para determinar las dosis y las vías de administración útiles en
25 seres humanos. La dosis exacta es elegida por el propio médico en vista del paciente a tratar. La dosis y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores adicionales que pueden tomarse en consideración incluyen la gravedad y el estado de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente; la dieta, la duración deseada del tratamiento, el
30 método de administración, el tiempo y la frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármaco(s), la sensibilidad de las reacciones, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Se podrían administrar composiciones farmacéuticas de acción prolongada cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y de la velocidad de aclaramiento de la formulación particular.

Las composiciones farmacéuticas descritas se pueden administrar a un sujeto mediante una diversidad de métodos. Se pueden añadir directamente a los tejidos seleccionados como objetivo, complejadas con lípidos catiónicos, empaquetadas dentro de liposomas, o administradas a las células seleccionadas como objetivo mediante otros métodos conocidos en la técnica. La administración localizada en los tejidos deseados se puede llevar a cabo mediante un catéter, una bomba de infusión o una malla. El ADN, los complejos ADN/vehículo, o las partículas de virus recombinantes se administran localmente en el sitio de tratamiento. Las vías de administración alternativas incluyen, pero sin limitación, la inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inhalación de aerosoles, administración oral (en forma de comprimidos o píldoras), tópica, sistémica, ocular, intraperitoneal y/o intratecal. Los ejemplos de administración de ribozimas se proporcionan en Sullivan et al., documento WO 94/02595.

Se describen anticuerpos que se pueden administrar en forma de una inyección rápida solamente, en forma de infusión a lo largo del tiempo, o que se pueden administrar tanto en forma de inyección rápida como de infusión a lo largo del tiempo. Los expertos en la técnica pueden emplear formulaciones diferentes para los polinucleótidos o para las proteínas. De manera similar, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células, afecciones, localizaciones particulares, etc.

Tal como se discutió anteriormente en la presente memoria, se pueden usar virus recombinantes para introducir ADN que codifica agentes polinucleotídicos. Los virus recombinantes según la invención se formulan y se administran en general en forma de dosis de alrededor de 10^4 a alrededor de 10^{14} ufc. En el caso de los AAVs y adenovirus, se usan preferiblemente dosis de alrededor de 10^6 a alrededor de 10^{11} ufc. El término ufc ("unidad formadora de placas") corresponde al poder infeccioso de una suspensión de viriones, y se determina infectando un cultivo celular apropiado y midiendo el número de placas formadas. Los métodos para determinar el título de ufc de una disolución viral están bien documentados en el estado de la técnica.

Se describe un método para diagnosticar una afección patológica que implica el deterioro cognitivo o una susceptibilidad a la afección en un sujeto, que comprende determinar la cantidad de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6 en una muestra biológica, y comparar la cantidad con la cantidad del polipéptido en un sujeto sano, en el que un incremento de la cantidad de polipéptido en comparación con el sujeto sano indica la presencia de la afección patológica.

Sección ExperimentalEJEMPLO 1: GPR3 Incrementa los Niveles de β -Amiloide 1-42.

Para identificar nuevos objetivos para fármacos que cambian el procesamiento de APP, se genera una línea celular estable que sobreexpresa APP. Esta línea celular estable se produce transfectando células HEK293 con cADN APP770wt clonado en pcADN3.1, seguido por la selección con G418 durante 3 semanas. En ese momento se escogen las colonias y los clones estables se expanden y se analizan los niveles de péptido β -amiloide secretado. Se selecciona un clon que secreta β -amiloide a nivel elevado, HEK293 APPwt, para los experimentos para identificar los objetivos para fármacos. Esto se lleva a cabo transduciendo HEK293 APPwt con bibliotecas de cADN adenoviral y midiendo los cambios en los niveles de β -amiloide 1-42 resultantes por medio de ELISA.

Las células sembradas en placas revestidas con colágeno a una densidad celular de 15000 células/pocillo (placas de 384 pocillos) en DMEM (10% de FBS), se infectan 24 h más tarde con 1 μ l o 0,2 μ l de adenovirus (que corresponde a una multiplicidad de infección (MOI) media de 120 y 24, respectivamente). El siguiente día el virus se elimina mediante lavado y se añade DMEM (Hepes 25 mM; 10% de FBS) a las células. Se deja acumular el péptido β -amiloide durante 24h. Se prepara la placa de ELISA mediante revestimiento con un anticuerpo de captura (JRF/cAbeta42/26) (obtenido de M Mercken, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, B-2340 Beerse, Bélgica) durante la noche en tampón 42 (Tabla 1) a una concentración de 2,5 μ g/ml. El exceso del anticuerpo de captura se elimina mediante lavado la siguiente mañana con PBS, y la placa de ELISA se bloquea después durante la noche con tampón de caseína (véase la Tabla 1) a 4°C. Tras la eliminación del tampón de bloqueo, se transfieren 30 μ l de la muestra a la placa de ELISA y se incuba durante la noche a 4°C. Tras un lavado exhaustivo con PBS-Tween20 y PBS, se diluyen 30 μ l del anticuerpo de detección marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Peroxidase Labeling Kit, Roche), JRF/AbetaN/25-HRP (obtenido de M Mercken, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, B-2340 Beerse, Bélgica) 1/5000 en tampón C (véase la Tabla 1) y se añade a los pocillos durante otras 2 h. Tras la eliminación del exceso del anticuerpo de detección mediante un lavado con PBS-Tween20 y PBS, se detecta la actividad de HRP por medio de la adición de sustrato de luminol (Roche), que se convierte en una señal quimioluminiscente mediante la enzima HRP.

TABLA 1: Tampones y disoluciones usados para ELISA

Tampón 42	NaHCO ₃ 30 mM, Na ₂ CO ₃ 70 mM, 0,05% de NaN ₃ , pH 9,6
Tampón de caseína	0,1% de caseína en PBS 1x
Tampón EC	fosfato sódico 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 400 mM, 0,2% de BSA, 0,05% de CHAPS, 0,4% de caseína, 0,05% de NaN ₃ , pH 7
Tampón C	fosfato sódico 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 400 mM, 1% de BSA, pH 7
PBS 10x	80 g de NaCl + 2 g de KCl + 11,5 g de Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O + 2 g de KH ₂ PO ₄ en 1 l de milli Q, pH 7,4
PBST	PBS 1x con 0,05% de Tween 20

Para validar el ensayo, se estudia el efecto de la sobreexpresión adenoviral con un título aleatorio de dos mutantes clínicos de PS1 y BACE sobre la producción β-amiloide 1-42 en las células HEK293 APPwt. Tal como se muestra en la Figura 2, todas las construcciones de PS1 y BACE inducen niveles de β-amiloide 1-42 tal como se esperaba.

Se construyó una biblioteca adenoviral de cADN de GPCR como sigue. Se amplifican fragmentos de ADN que cubren la región codificante completa de los GPCRs mediante PCR a partir de una biblioteca mixta de cADN de placenta e hígado fetal (InvitroGen). Todos los fragmentos se clonan en un vector adenoviral tal como se describe en el documento US 6.340.595, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia, y posteriormente se producen adenovirus que albergan los cADNs correspondientes. Durante el cribado de la biblioteca de GPCR adenoviral en las células HEK293 APPwt, la sobreexpresión de GPR3 conduce a niveles incrementados de péptidos β-amiloide 1-42 en los medios condicionados de células HEK293 APPwt. Estos resultados indican que GPR3 se identificó como un modulador del procesamiento de APP.

Se confirma el efecto estimulador de GPR3 en el re-cribado de los virus con un título conocido (partículas virales/ml), tal como se determina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El virus de GPR3 se infecta a MOIs que oscilan de 2 a 250, y se lleva a cabo el experimento como se describió anteriormente. Los niveles de β-amiloide 1-42 son 2 veces mayores en comparación con los controles negativos para Ad5/GPR3 (Figura 3A). Además, se comprueba el efecto de GPR3 sobre los niveles de β-amiloide 1-40, 11-42, 1-x e y-42 en condiciones similares a las anteriores (Figura 3B-3E). Se llevan a cabo los ELISAs respectivos tal como se describió anteriormente, excepto en que se usaron los siguientes anticuerpos: para el ELISA de β-amiloide 1-

40, los anticuerpos de captura y de detección son, respectivamente, JRF/cAbeta40/10 y JRF/AbetaN/25-HRP (obtenidos de M Mercken, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, B-2340 Beerse, Bélgica) para el ELISA de β -amiloide 11-42, los anticuerpos de captura y de detección son, respectivamente, 5 JRF/cAbeta42/26 y JRF/hAb11/1 (obtenidos de M Mercken, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, B-2340 Beerse, Bélgica), para el ELISA de β -amiloide y-42 (y oscila en 1-17), los anticuerpos de captura y de detección son, respectivamente, JRF/cAbeta42/26 y 4G8-HRP (obtenidos respectivamente de M Mercken, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, B-2340 Beerse, Bélgica, y de Signet, EE.UU.), mientras para el ELISA de β -amiloide 1-x (x oscila en 24-42), los anticuerpos de captura y de detección son JRF/AbetaN/25 y 4G8-HRP, respectivamente (obtenidos respectivamente de M Mercken, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, B-2340 Beerse, Bélgica, y de Signet, EE.UU.). El ELISA de β -amiloide 1-x se usa para la detección de péptidos 15 amiloides con un extremo C-terminal variable (β -amiloide 1-37; 1-38; 1-39; 1- 40; 1- 42). Los resultados de estos experimentos demuestran claramente un incremento de las especies de β -amiloide 1-40, 11-42, y-42 y 1-x tras la transducción de GPR3 (Figura 3B-3E). Se usa el mismo procedimiento para el análisis del procesamiento de APP mediante GPR6 y GPR12.

20

EJEMPLO 2: Identificación de homólogos de GPR3.

Se usó la secuencia de aminoácidos del receptor GPR3 humano como secuencia problema en una búsqueda BLAST respecto de todas las GPCRs humanas para hallar sus homólogos más cercanos. La Tabla 2 (SEQ ID N°: 5-6) muestra los 2 25 homólogos más cercanos del receptor GPR3. Mediante el uso de ClustalW, se construyó una alineación que mostraba el grado de homología entre GPR3 y sus homólogos más cercanos, GPR6 y GPR12 (Figura 5).

Tabla 2: GPCRs implicados en el procesamiento de APP (SEQ ID N°: 1-3; 4-6), 30 secuencias para el agente de inhibición de la expresión (SEQ ID N°: 7-287), la secuencia de la horquilla del ARNi (SEQ ID N°: 288), y los dominios de GPR3, GPR6, y GPR 12 (SEQ ID N°: 289-333):

SEQ ID N°	ID Galápagos	Acceso	Secuencia		Tipo
1	1772	NM_005281		GPR3	ADN
2	1780	NM_005284		GPR6	ADN
3	1763	NM_005288		GPR12	ADN
4	1772	NP_005272		GPR3	Proteína

5	1780	NP_005275		GPR6	Proteína
6	1763	NP_005279		GPR12	Proteína
7	NM_005281_idx127	NM_005281	TGGGATGTGGTGTCTGTCATC	GPR3	ADN
8	NM_005281_idx129	NM_005281	GGATGTGGTGTCTGTCATCTC	GPR3	ADN
9	NM_005281_idx172	NM_005281	AATGCGCTAGTGGTGGCCATC	GPR3	ADN
10	NM_005281_idx280	NM_005281	GTCTGTCACITTTGCTGTCTGTC	GPR3	ADN
11	NM_005281_idx283	NM_005281	CTGCACTTTGCTGTCTGCTTC	GPR3	ADN
12	NM_005281_idx286	NM_005281	CACITTTGCTGTCTGCTTCTGC	GPR3	ADN
13	NM_005281_idx289	NM_005281	TTTGTGCTGTCTTCTGTCATC	GPR3	ADN
14	NM_005281_idx294	NM_005281	TGCTGTCTTCTGTCATCGGCTC	GPR3	ADN
15	NM_005281_idx297	NM_005281	TGTCTTCTGTCATCGGCTCAGC	GPR3	ADN
16	NM_005281_idx342	NM_005281	CGTGCTGGCAATGGCCTTTAC	GPR3	ADN
17	NM_005281_idx343	NM_005281	GTGCTGGCAATGGCCTTTACC	GPR3	ADN
18	NM_005281_idx352	NM_005281	ATGGCCTTTACCGCCAGCATC	GPR3	ADN
19	NM_005281_idx370	NM_005281	ATCGGCAGTCTACTGGCCATC	GPR3	ADN
20	NM_005281_idx376	NM_005281	AGTCTACTGGCCATCACTGTC	GPR3	ADN
21	NM_005281_idx379	NM_005281	CTACTGGCCATCACTGTCGAC	GPR3	ADN
22	NM_005281_idx380	NM_005281	TACTGGCCATCACTGTCGACC	GPR3	ADN
23	NM_005281_idx390	NM_005281	CACGTGCGACCGCTACCTTTC	GPR3	ADN
24	NM_005281_idx392	NM_005281	CTGTGCGACCGCTACCTTCTC	GPR3	ADN
25	NM_005281_idx397	NM_005281	GACCGCTACCTTCTCTGTAC	GPR3	ADN
26	NM_005281_idx402	NM_005281	CTACCTTTCTCTGTACAATGC	GPR3	ADN
27	NM_005281_idx403	NM_005281	TACCTTTCTCTGTACAATGCC	GPR3	ADN
28	NM_005281_idx404	NM_005281	ACCTTTCTCTGTACAATGCC	GPR3	ADN
29	NM_005281_idx406	NM_005281	CTTTCTCTGTACAATGCCCTC	GPR3	ADN
30	NM_005281_idx408	NM_005281	TTCTCTGTACAATGCCCTCAC	GPR3	ADN
31	NM_005281_idx409	NM_005281	TCTCTGTACAATGCCCTCAC	GPR3	ADN
32	NM_005281_idx412	NM_005281	CTGTACAATGCCCTCACCTAC	GPR3	ADN
33	NM_005281_idx417	NM_005281	CAATGCCCTCACCTACTATTC	GPR3	ADN
34	NM_005281_idx423	NM_005281	CCTCACCTACTATTCAGAGAC	GPR3	ADN
35	NM_005281_idx426	NM_005281	CACCTACTATTCAGAGACAAC	GPR3	ADN
36	NM_005281_idx432	NM_005281	CTATTCAGAGACAACAGTGAC	GPR3	ADN
37	NM_005281_idx434	NM_005281	ATTCAGAGACAACAGTGACAC	GPR3	ADN
38	NM_005281_idx438	NM_005281	AGAGACAACAGTGACACGGAC	GPR3	ADN
39	NM_005281_idx439	NM_005281	GAGACAACAGTGACACGGACC	GPR3	ADN
40	NM_005281_idx449	NM_005281	TGACACGGACCTATGTGATGC	GPR3	ADN
41	NM_005281_idx453	NM_005281	ACGGACCTATGTGATGCTGGC	GPR3	ADN
42	NM_005281_idx545	NM_005281	CCACATGTGGCGTGGTTTATC	GPR3	ADN
43	NM_005281_idx546	NM_005281	CACATGTGGCGTGGTTTATCC	GPR3	ADN
44	NM_005281_idx548	NM_005281	CATGTGGCGTGGTTTATCCAC	GPR3	ADN
45	NM_005281_idx550	NM_005281	TGTGGCGTGGTTTATCCACTC	GPR3	ADN
46	NM_005281_idx552	NM_005281	TGGCGTGGTTTATCCACTCTC	GPR3	ADN
47	NM_005281_idx553	NM_005281	GGCGTGGTTTATCCACTCTCC	GPR3	ADN
48	NM_005281_idx559	NM_005281	GTTTATCCACTCTCCAAGAAC	GPR3	ADN
49	NM_005281_idx560	NM_005281	TTTATCCACTCTCCAAGAACC	GPR3	ADN
50	NM_005281_idx563	NM_005281	ATCCACTCTCCAAGAACCATC	GPR3	ADN
51	NM_005281_idx572	NM_005281	CCAAGAACCATCTGGTAGTTC	GPR3	ADN
52	NM_005281_idx576	NM_005281	GAACCATCTGGTAGTTCGGC	GPR3	ADN

53	NM_005281_idx577	NM_005281	AACCATCTGGTAGTTCTGGCC	GPR3	ADN
54	NM_005281_idx582	NM_005281	TCTGGTAGTTCTGGCCATTGC	GPR3	ADN
55	NM_005281_idx583	NM_005281	CTGGTAGTTCTGGCCATTGCC	GPR3	ADN
56	NM_005281_idx586	NM_005281	GTAGTTCTGGCCATTGCCCTTC	GPR3	ADN
57	NM_005281_idx589	NM_005281	GTTCTGGCCATTGCCCTCTTC	GPR3	ADN
58	NM_008154_idx1099	NM_005281	GCCTTCTTCATGGTGTITGGC	GPR3	ADN
59	NM_005281_idx604	NM_005281	TTCTTCATGGTGTITGGCATC	GPR3	ADN
60	NM_005281_idx608	NM_005281	TCATGGTGTITGGCATCATGC	GPR3	ADN
61	NM_005281_idx611	NM_005281	TGGTGTITGGCATCATGCTGC	GPR3	ADN
62	NM_005281_idx614	NM_005281	TGTTTGGCATCATGCTGCAGC	GPR3	ADN
63	NM_005281_idx616	NM_005281	TTTGGCATCATGCTGCAGCTC	GPR3	ADN
64	NM_005281_idx619	NM_005281	GGCATCATGCTGCAGCTCTAC	GPR3	ADN
65	NM_005281_idx621	NM_005281	CATCATGCTGCAGCTCTACGC	GPR3	ADN
66	NM_005281_idx622	NM_005281	ATCATGCTGCAGCTCTACGCC	GPR3	ADN
67	NM_005281_idx628	NM_005281	CTGCAGCTCTACGCCCAAATC	GPR3	ADN
68	NM_005281_idx631	NM_005281	CAGCTCTACGCCCAAATCTGC	GPR3	ADN
69	NM_005281_idx632	NM_005281	AGCTCTACGCCCAAATCTGCC	GPR3	ADN
70	NM_005281_idx637	NM_005281	TACGCCCAAATCTGCCGCATC	GPR3	ADN
71	NM_005281_idx643	NM_005281	CAAATCTGCCGCATCGTCTGC	GPR3	ADN
72	NM_005281_idx644	NM_005281	AAATCTGCCGCATCGTCTGCC	GPR3	ADN
73	NM_005281_idx668	NM_005281	ATGCCCAGCAGATTGCCCTTC	GPR3	ADN
74	NM_005281_idx775	NM_005281	TGCTGGTTCGCCCTTCACTGTC	GPR3	ADN
75	NM_005281_idx778	NM_005281	TGGTTGCCCTTCACTGTCTAC	GPR3	ADN
76	NM_005281_idx781	NM_005281	TTGCCCTTCACTGTCTACTGC	GPR3	ADN
77	NM_005281_idx782	NM_005281	TGCCCTTCACTGTCTACTGCC	GPR3	ADN
78	NM_005281_idx785	NM_005281	CCTTCACTGTCTACTGCCTGC	GPR3	ADN
79	NM_005281_idx816	NM_005281	CCACTCTCCACCTCTCTACAC	GPR3	ADN
80	NM_005281_idx817	NM_005281	CACTCTCCACCTCTCTACACC	GPR3	ADN
81	NM_005281_idx821	NM_005281	CTCCACCTCTCTACACCTATC	GPR3	ADN
82	NM_005281_idx825	NM_005281	ACCTCTCTACACCTATCTTAC	GPR3	ADN
83	NM_005281_idx826	NM_005281	CCTCTCTACACCTATCTTACC	GPR3	ADN
84	NM_005281_idx830	NM_005281	TCTACACCTATCTTACCTTGC	GPR3	ADN
85	NM_005281_idx832	NM_005281	TACACCTATCTTACCTTGCTC	GPR3	ADN
86	NM_005281_idx833	NM_005281	ACACCTATCTTACCTTGCTCC	GPR3	ADN
87	NM_005281_idx834	NM_005281	CACCTATCTTACCTTGCTCCC	GPR3	ADN
88	NM_005281_idx837	NM_005281	CTATCTTACCTTGCTCCCTGC	GPR3	ADN
89	NM_005281_idx838	NM_005281	TATCTTACCTTGCTCCCTGOC	GPR3	ADN
90	NM_005281_idx840	NM_005281	TCTTACCTTGCTCCCTGCCAC	GPR3	ADN
91	NM_005281_idx847	NM_005281	TTGCTCCCTGCCACCTACAAC	GPR3	ADN
92	NM_008154_idx1354	NM_005281	GCCACCTACAACCTCCATGATC	GPR3	ADN
93	NM_005281_idx859	NM_005281	ACCTACAACCTCCATGATCAAC	GPR3	ADN
94	NM_008154_idx1358	NM_005281	CCTACAACCTCCATGATCAACC	GPR3	ADN
95	NM_005281_idx861	NM_005281	CTACAACCTCCATGATCAACCC	GPR3	ADN
96	NM_005281_idx865	NM_005281	AACTCCATGATCAACCCATATC	GPR3	ADN
97	NM_005281_idx868	NM_005281	TCCATGATCAACCCATATCATC	GPR3	ADN
98	NM_005281_idx873	NM_005281	GATCAACCCATATCATCTACGC	GPR3	ADN
99	NM_005281_idx874	NM_005281	ATCAACCCATATCATCTACGCC	GPR3	ADN
100	NM_005281_idx877	NM_005281	AACCCATATCATCTACGCCTTC	GPR3	ADN

101	NM_005281_idx878	NM_005281	ACCCTATCATCTACGCCTTCC	GPR3	ADN
102	NM_005281_idx880	NM_005281	CCTATCATCTACGCCTTCCGC	GPR3	ADN
103	NM_005281_idx883	NM_005281	ATCATCTACGCCTTCCGCAAC	GPR3	ADN
104	NM_005281_idx884	NM_005281	TCATCTACGCCTTCCGCAACC	GPR3	ADN
105	NM_005281_idx902	NM_005281	ACCAGGATGTGCAGAAAGTGC	GPR3	ADN
106	NM_005281_idx909	NM_005281	TGTGCAGAAAGTGCTGTGGGC	GPR3	ADN
107	NM_005281_idx916	NM_005281	AAAGTGCTGTGGGCTGTCTGC	GPR3	ADN
108	NM_005281_idx941	NM_005281	GCTGTTCTCTTCCAAGATCC	GPR3	ADN
109	NM_005284_idx146	NM_005284	GAGCTAATGGGTCTCTGGAGC	GPR6	ADN
110	NM_005284_idx150	NM_005284	TAATGGGTCTCTGGAGCTGTC	GPR6	ADN
111	NM_005284_idx151	NM_005284	AATGGGTCTCTGGAGCTGTCC	GPR6	ADN
112	NM_005284_idx319	NM_005284	ATGTTCTGTGCTGGTAGGCAGC	GPR6	ADN
113	NM_005284_idx373	NM_005284	CTCATCTTGCACTTTGTGTTT	GPR6	ADN
114	NM_005284_idx374	NM_005284	TCATCTTGCACTTTGTGTTCC	GPR6	ADN
115	NM_005284_idx379	NM_005284	TGCACTTTGTGTTCCAGTAC	GPR6	ADN
116	NM_005284_idx386	NM_005284	TGTGTTCAGTACTTGGTGC	GPR6	ADN
117	NM_005284_idx387	NM_005284	TGTGTTCAGTACTTGGTGCC	GPR6	ADN
118	NM_005284_idx388	NM_005284	GTGTTCCAGTACTTGGTGCCC	GPR6	ADN
119	NM_005284_idx390	NM_005284	GTTCCAGTACTTGGTGCCCTC	GPR6	ADN
120	NM_005284_idx409	NM_005284	TCGGAGACTGTGAGTCTGCTC	GPR6	ADN
121	NM_005284_idx411	NM_005284	GGAGACTGTGAGTCTGCTCAC	GPR6	ADN
122	NM_005284_idx496	NM_005284	CGCTACCTGTCCCTGTATAAC	GPR6	ADN
123	NM_005284_idx498	NM_005284	CTACCTGTCCCTGTATAACGC	GPR6	ADN
124	NM_005284_idx500	NM_005284	ACCTGTCCCTGTATAACGCGC	GPR6	ADN
125	NM_005284_idx502	NM_005284	CTGTCCCTGTATAACGCGCTC	GPR6	ADN
126	NM_005284_idx504	NM_005284	GTCCCTGTATAACGCGCTCAC	GPR6	ADN
127	NM_005284_idx505	NM_005284	TCCCTGTATAACGCGCTCACC	GPR6	ADN
128	NM_005284_idx511	NM_005284	TATAACGCGCTCACCTATTAC	GPR6	ADN
129	NM_005284_idx513	NM_005284	TAACGCGCTCACCTATTACTC	GPR6	ADN
130	NM_005284_idx515	NM_005284	ACGCGCTCACCTATTACTCGC	GPR6	ADN
131	NM_005284_idx694	NM_005284	GCCGCTTCTTCATGGTCTTC	GPR6	ADN
132	NM_005284_idx697	NM_005284	GCCTTCTTCATGGTCTTCGGC	GPR6	ADN
133	NM_005284_idx700	NM_005284	TTCTTCATGGTCTTCGGCATC	GPR6	ADN
134	NM_005284_idx704	NM_005284	TCATGGTCTTCGGCATCATGC	GPR6	ADN
135	NM_005284_idx707	NM_005284	TGGTCTTCGGCATCATGCTGC	GPR6	ADN
136	NM_005284_idx709	NM_005284	GTCTTCGGCATCATGCTGCAC	GPR6	ADN
137	NM_005284_idx710	NM_005284	TCTTCGGCATCATGCTGCACC	GPR6	ADN
138	NM_005284_idx715	NM_005284	GGCATCATGCTGCACCTGTAC	GPR6	ADN
139	NM_005284_idx719	NM_005284	TCATGCTGCACCTGTACGTGC	GPR6	ADN
140	NM_005284_idx819	NM_005284	CACCAGAAAGGGTGTGGGTAC	GPR6	ADN
141	NM_005284_idx821	NM_005284	CCAGAAAGGGTGTGGGTACAC	GPR6	ADN
142	NM_005284_idx825	NM_005284	AAAGGGTGTGGGTACACTGGC	GPR6	ADN
143	NM_005284_idx877	NM_005284	CTGCCCTTCGCCATCTATTGC	GPR6	ADN
144	NM_005284_idx889	NM_005284	ATCTATTGCGTGGTGGGCAGC	GPR6	ADN
145	NM_005284_idx926	NM_005284	TCTACACTTACGCCACCCTGC	GPR6	ADN
146	NM_005284_idx956	NM_005284	CCTACAACCCATGATCAATC	GPR6	ADN
147	NM_005284_idx957	NM_005284	CTACAACCCATGATCAATCC	GPR6	ADN
148	NM_005284_idx958	NM_005284	TACAACCCATGATCAATCCC	GPR6	ADN

149	NM_005284_idx961	NM_005284	AACCTCATGATCAATCCCATC	GPR6	ADN
150	NM_005284_idx964	NM_005284	TCCATGATCAATCCCATCATC	GPR6	ADN
151	NM_005284_idx969	NM_005284	GATCAATCCCATCATCTATGC	GPR6	ADN
152	NM_005284_idx970	NM_005284	ATCAATCCCATCATCTATGCC	GPR6	ADN
153	NM_000647_idx981	NM_005284	AATCCCATCATCTATGCCTTC	GPR6	ADN
154	NM_005284_idx974	NM_005284	ATCCCATCATCTATGCCTTCC	GPR6	ADN
155	NM_005284_idx976	NM_005284	CCCATCATCTATGCCTTCCGC	GPR6	ADN
156	NM_005284_idx979	NM_005284	ATCATCTATGCCTTCCGCAAC	GPR6	ADN
157	NM_005284_idx980	NM_005284	TCATCTATGCCTTCCGCAACC	GPR6	ADN
158	NM_005284_idx1024	NM_005284	CTCCTGCTCTGTGGCTGTTTC	GPR6	ADN
159	NM_005284_idx1025	NM_005284	TCCTGCTCTGTGGCTGTTTCC	GPR6	ADN
160	NM_005284_idx1029	NM_005284	GCTCTGTGGCTGTTTCCAGTC	GPR6	ADN
161	NM_005284_idx1030	NM_005284	CTCTGTGGCTGTTTCCAGTCC	GPR6	ADN
162	NM_005284_idx1037	NM_005284	GCTGTTTCCAGTCCAAAGTGC	GPR6	ADN
163	NM_005284_idx1038	NM_005284	CTGTTTCCAGTCCAAAGTGCC	GPR6	ADN
164	NM_005284_idx1039	NM_005284	TGTTTCCAGTCCAAAGTGCCC	GPR6	ADN
165	NM_005284_idx1043	NM_005284	TCCAGTCCAAAGTGCCCTTTC	GPR6	ADN
166	NM_005284_idx1047	NM_005284	GTCCAAAGTGCCCTTTCGTTTC	GPR6	ADN
167	NM_005284_idx1048	NM_005284	TCCAAAGTGCCCTTTCGTTCC	GPR6	ADN
168	NM_005284_idx1053	NM_005284	AGTGCCCTTTCGTTCCAGGTC	GPR6	ADN
169	NM_005284_idx1055	NM_005284	TGCCCTTTCGTTCCAGGTCTC	GPR6	ADN
170	NM_005284_idx1060	NM_005284	TTTCGTTCCAGGTCTCCAGC	GPR6	ADN
171	NM_005288_idx115	NM_005288	GAGCCTGAGCTCGTAGTCAAC	GPR12	ADN
172	NM_005288_idx116	NM_005288	AGCCTGAGCTCGTAGTCAACC	GPR12	ADN
173	NM_005288_idx138	NM_005288	CTGGGACATTGTCTTGTGTAC	GPR12	ADN
174	NM_005288_idx139	NM_005288	TGGGACATTGTCTTGTGTACC	GPR12	ADN
175	NM_005288_idx141	NM_005288	GGACATTGTCTTGTGTACCTC	GPR12	ADN
176	NM_005288_idx147	NM_005288	TGTCTTGTGTACCTCGGGAAC	GPR12	ADN
177	NM_005288_idx148	NM_005288	GTCCTTGTGTACCTCGGGAACC	GPR12	ADN
178	NM_005288_idx149	NM_005288	TCTTGTGTACCTCGGGAACCC	GPR12	ADN
179	NM_005288_idx151	NM_005288	TTGTGTACCTCGGGAACCCCTC	GPR12	ADN
180	NM_005288_idx154	NM_005288	TGTACCTCGGGAACCCCTCATC	GPR12	ADN
181	NM_005288_idx156	NM_005288	TACCTCGGGAACCCCTCATCTC	GPR12	ADN
182	NM_005288_idx184	NM_005288	AATGCCATTGTGGTCCTTATC	GPR12	ADN
183	NM_005288_idx187	NM_005288	GCCATTGTGGTCCTTATCATC	GPR12	ADN
184	NM_005288_idx191	NM_005288	TTGTGGTCCTTATCATCTTCC	GPR12	ADN
185	NM_005288_idx193	NM_005288	GTGGTCCTTATCATCTTCCAC	GPR12	ADN
186	NM_005288_idx196	NM_005288	GTCCTTATCATCTTCCACAAC	GPR12	ADN
187	NM_005288_idx197	NM_005288	TCCTTATCATCTTCCACAACC	GPR12	ADN
188	NM_005288_idx198	NM_005288	CCTTATCATCTTCCACAACCC	GPR12	ADN
189	NM_005288_idx232	NM_005288	CCCATGTTCCCTGCTAATAGGC	GPR12	ADN
190	NM_005288_idx235	NM_005288	ATGTTCCCTGCTAATAGGCAGC	GPR12	ADN
191	NM_005288_idx236	NM_005288	TGTTCCCTGCTAATAGGCAGCC	GPR12	ADN
192	NM_005288_idx242	NM_005288	TGCTAATAGGCAGCCTGGCTC	GPR12	ADN
193	NM_005288_idx246	NM_005288	AATAGGCAGCCTGGCTCTTGC	GPR12	ADN
194	NM_005288_idx312	NM_005288	CTACCTGCTTCAGTCAGAAGC	GPR12	ADN
195	NM_005288_idx313	NM_005288	TACCTGCTTCAGTCAGAAGCC	GPR12	ADN
196	NM_005288_idx315	NM_005288	CCTGCTTCAGTCAGAAGCCAC	GPR12	ADN

197	NM_005288_idx316	NM_005288	CTGCTTCAGTCAGAAGCCACC	GPR12	ADN
198	NM_005288_idx320	NM_005288	TTCAGTCAGAAGCCACCAAGC	GPR12	ADN
199	NM_005288_idx325	NM_005288	TCAGAAGCCACCAAGCTGGTC	GPR12	ADN
200	NM_005288_idx327	NM_005288	AGAAGCCACCAAGCTGGTCAC	GPR12	ADN
201	NM_005288_idx343	NM_005288	GTCACGATCGGCCTCATGTGC	GPR12	ADN
202	NM_005288_idx352	NM_005288	GGCCTCATGTGCGCCTCTTTC	GPR12	ADN
203	NM_005288_idx354	NM_005288	CCTCATGTGCGCCTCTTTCTC	GPR12	ADN
204	NM_005288_idx357	NM_005288	CATTGTGCGCCTCTTTCTCTGC	GPR12	ADN
205	NM_005288_idx358	NM_005288	ATTGTGCGCCTCTTTCTCTGCC	GPR12	ADN
206	NM_005288_idx360	NM_005288	TGTCGCGCTCTTTCTCTGCC	GPR12	ADN
207	NM_005288_idx364	NM_005288	GCCTCTTTCTCTGCGCTCTGTC	GPR12	ADN
208	NM_005288_idx367	NM_005288	TCCTTTCTCTGCGCTCTGTCTGC	GPR12	ADN
209	NM_005288_idx370	NM_005288	TTCTCTGCGCTCTGTCTGCAGC	GPR12	ADN
210	NM_005288_idx382	NM_005288	GTCTGCAGCTTGCTGGCTATC	GPR12	ADN
211	NM_005288_idx384	NM_005288	CTGCAGCTTGCTGGCTATCAC	GPR12	ADN
212	NM_005288_idx391	NM_005288	TTGCTGGCTATCACTGTTGAC	GPR12	ADN
213	NM_005288_idx392	NM_005288	TGCTGGCTATCACTGTTGACC	GPR12	ADN
214	NM_005288_idx394	NM_005288	CTGGCTATCACTGTTGACCGC	GPR12	ADN
215	NM_005288_idx397	NM_005288	GCTATCACTGTTGACCGCTAC	GPR12	ADN
216	NM_005288_idx398	NM_005288	CTATCACTGTTGACCGCTACC	GPR12	ADN
217	NM_005288_idx400	NM_005288	ATCACTGTTGACCGCTACCTC	GPR12	ADN
218	NM_005288_idx402	NM_005288	CACTGTTGACCGCTACCTCTC	GPR12	ADN
219	NM_005288_idx404	NM_005288	CTGTTGACCGCTACCTCTCAC	GPR12	ADN
220	NM_005288_idx409	NM_005288	GACCGCTACCTCTCACTGTAC	GPR12	ADN
221	NM_005288_idx412	NM_005288	CGCTACCTCTCACTGTACTAC	GPR12	ADN
222	NM_005288_idx414	NM_005288	CTACCTCTCACTGTACTACGC	GPR12	ADN
223	NM_005288_idx416	NM_005288	ACCTCTCACTGTACTACGCTC	GPR12	ADN
224	NM_005288_idx420	NM_005288	CTCACTGTACTACGCTCTGAC	GPR12	ADN
225	NM_005288_idx424	NM_005288	CTGTACTACGCTCTGACGTAC	GPR12	ADN
226	NM_005288_idx425	NM_005288	TGTACTACGCTCTGACGTACC	GPR12	ADN
227	NM_005288_idx429	NM_005288	CTACGCTCTGACGTACCATTC	GPR12	ADN
228	NM_005288_idx438	NM_005288	GACGTACCATTCGGAGAGGAC	GPR12	ADN
229	NM_005288_idx442	NM_005288	TACCATTCGGAGAGGACGGTC	GPR12	ADN
230	NM_005288_idx450	NM_005288	GGAGAGGACGGTCACGTTTAC	GPR12	ADN
231	NM_005288_idx451	NM_005288	GAGAGGACGGTCACGTTTACC	GPR12	ADN
232	NM_005288_idx457	NM_005288	ACGGTCACGTTTACCTATGTC	GPR12	ADN
233	NM_005288_idx461	NM_005288	TCACGTTTACCTATGTCATGC	GPR12	ADN
234	NM_005288_idx463	NM_005288	ACGTTTACCTATGTCATGCTC	GPR12	ADN
235	NM_005288_idx466	NM_005288	TTTACCTATGTCATGCTCGTC	GPR12	ADN
236	NM_005288_idx470	NM_005288	CCTATGTCATGCTCGTCATGC	GPR12	ADN
237	NM_005288_idx472	NM_005288	TATGTCATGCTCGTCATGCTC	GPR12	ADN
238	NM_005288_idx571	NM_005288	GTCAGACCGCTACCAAGAAGAC	GPR12	ADN
239	NM_005288_idx574	NM_005288	AGACCGCTACCAAGAACAAC	GPR12	ADN
240	NM_005288_idx576	NM_005288	ACCGCTACCAAGAACAACGC	GPR12	ADN
241	NM_005288_idx583	NM_005288	ACCAAGAACAACGCGGCCATC	GPR12	ADN
242	NM_005288_idx586	NM_005288	AAGAACAACGCGGCCATCCTC	GPR12	ADN
243	NM_005288_idx601	NM_005288	ATCCTCTCGGTGTCCTTCTC	GPR12	ADN
244	NM_005288_idx604	NM_005288	CTCTCGGTGTCCTTCTCTTC	GPR12	ADN

245	NM_005288_idx612	NM_005288	GTCTTCTCTTCATGTTTGC	GPR12	ADN
246	NM_005288_idx614	NM_005288	CCCTTCTCTTCATGTTTGC	GPR12	ADN
247	NM_005288_idx616	NM_005288	TTCTTCTTCATGTTTGC	GPR12	ADN
248	NM_005288_idx620	NM_005288	TCTTCATGTTTGC	GPR12	ADN
249	NM_005288_idx623	NM_005288	TCATGTTTGC	GPR12	ADN
250	NM_005288_idx626	NM_005288	TGTTTGC	GPR12	ADN
251	NM_005288_idx628	NM_005288	TTTGC	GPR12	ADN
252	NM_005288_idx631	NM_005288	GCGCTCATGCTTCAGCTCTAC	GPR12	ADN
253	NM_005288_idx634	NM_005288	CTCATGCTTCAGCTCTACATC	GPR12	ADN
254	NM_005288_idx635	NM_005288	TCATGCTTCAGCTCTACATCC	GPR12	ADN
255	NM_005288_idx640	NM_005288	CTTCAGCTCTACATCCAGATC	GPR12	ADN
256	NM_005288_idx659	NM_005288	TCTGTAAAGATTGTGATGAGGC	GPR12	ADN
257	NM_005288_idx661	NM_005288	TGTAAGATTGTGATGAGGCAC	GPR12	ADN
258	NM_005288_idx663	NM_005288	TAAGATTGTGATGAGGCACGC	GPR12	ADN
259	NM_005288_idx664	NM_005288	AAGATTGTGATGAGGCACGCC	GPR12	ADN
260	NM_005288_idx665	NM_005288	AGATTGTGATGAGGCACGCC	GPR12	ADN
261	NM_005288_idx668	NM_005288	TTGTGATGAGGCACGCCATC	GPR12	ADN
262	NM_005288_idx685	NM_005288	CATCAGATAGCCCTGCAGCAC	GPR12	ADN
263	NM_005288_idx686	NM_005288	ATCAGATAGCCCTGCAGCAC	GPR12	ADN
264	NM_005288_idx691	NM_005288	ATAGCCTGCAGCACCACTTC	GPR12	ADN
265	NM_005288_idx717	NM_005288	CACGTCGCACTATGTGACCAC	GPR12	ADN
266	NM_005288_idx718	NM_005288	ACGTCGCACTATGTGACCACC	GPR12	ADN
267	NM_005288_idx748	NM_005288	GTCTCCACCCTGGCTATCATC	GPR12	ADN
268	NM_005288_idx749	NM_005288	TCTCCACCCTGGCTATCATCC	GPR12	ADN
269	NM_005288_idx776	NM_005288	CGTTTGCTGCTTGCTGGATGC	GPR12	ADN
270	NM_005288_idx777	NM_005288	GTTTGCTGCTTGCTGGATGCC	GPR12	ADN
271	NM_005288_idx781	NM_005288	GCTGCTTGCTGGATGCCITTC	GPR12	ADN
272	NM_005288_idx784	NM_005288	GCTTGCTGGATGCCITTCACC	GPR12	ADN
273	NM_005288_idx811	NM_005288	TCCTTGATAGCGGATTACACC	GPR12	ADN
274	NM_005288_idx835	NM_005288	CCCTCCATCTATACCTACGCC	GPR12	ADN
275	NM_005288_idx838	NM_005288	TCCATCTATACCTACGCCACC	GPR12	ADN
276	NM_005288_idx839	NM_005288	CCATCTATACCTACGCCACCC	GPR12	ADN
277	NM_005288_idx842	NM_005288	TCTATACCTACGCCACCCTCC	GPR12	ADN
278	NM_005288_idx865	NM_005288	CCCGCCACCTACAATTCCATC	GPR12	ADN
279	NM_005288_idx868	NM_005288	GCCACCTACAATTCCATCATC	GPR12	ADN
280	NM_005288_idx872	NM_005288	CCTACAATTCCATCATCAACC	GPR12	ADN
281	NM_005288_idx877	NM_005288	AATTCCATCATCAACCCTGTC	GPR12	ADN
282	NM_005288_idx904	NM_005288	GCTTTTCAGAAACCAAGAGATC	GPR12	ADN
283	NM_005288_idx912	NM_005288	AAACCAAGAGATCCAGAAAGC	GPR12	ADN
284	NM_005288_idx914	NM_005288	ACCAAGAGATCCAGAAAGCGC	GPR12	ADN
285	NM_005288_idx928	NM_005288	AAAGCGCTCTGTCTCATTTGC	GPR12	ADN
286	NM_005288_idx931	NM_005288	GCGCTCTGTCTCATTTGCTGC	GPR12	ADN
287	NM_005288_idx941	NM_005288	TCATTTGCTGCGGCTGCATCC	GPR12	ADN
288	Horquilla		TTGCTATA		ADN
289	N-term	MMWGAGSPLAWLSAGSGNVVSVGPAEGPTGPAAPLPSPKA		GPR3	Proteína
290	TM1	WDVVLCSGTLVSCENALVVAII		GPR3	Proteína
291	IL1	VGTPAFRAPMFL		GPR3	Proteína
292	TM2	LVGSLAVADLLAGLGLVLHFAAV		GPR3	Proteína

293	EL1	FCIGSAEMS	GPR3	Proteína
294	TM3	LVLVGLAMAFASIGSLAITV	GPR3	Proteína
295	IL2	DRYLSLYNALTYSETTVTR	GPR3	Proteína
296	TM4	TYVMLALVWGGALGLGLPVLAW	GPR3	Proteína
297	EL2	NCLDGLTTCGVVYPLSKNH	GPR3	Proteína
298	TM5	LVLAIAFFMVFIMLQLYAQIC	GPR3	Proteína
299	IL3	RIVCRHAQQIALQRHLLPASHYVATRK	GPR3	Proteína
300	TM6	GIATLAVVLGAFAACWLPFTVYC	GPR3	Proteína
301	EL3	LLGDAHSPF	GPR3	Proteína
302	TM7	LYTYLTLLPATYNSMINPIIYAF	GPR3	Proteína
303	C-term	RNQDVQKVLWAVCCCCSSSKIPFRSRSPSDV	GPR3	Proteína
304	N-term	MNASASLNDISQVVVAEGAAAAATAAGGPDTEWGPAAAAALG AGGGANGSLELSSQLSAGPPGLLPAVNP	GPR6	Proteína
305	TM1	WDVLLCVSGTVIAGENALVVALI	GPR6	Proteína
306	IL1	ASTPALRTPMFV	GPR6	Proteína
307	TM2	LVGSLATADLLAGCGLILHEVFQ	GPR6	Proteína
308	EL1	YLVPSSETVS	GPR6	Proteína
309	TM3	LLTVGFLVASFAASVSSLLAITV	GPR6	Proteína
310	IL2	DRYLSLYNALTYSSRTLLG	GPR6	Proteína
311	TM4	VHLLAATWTVSLGLGLPVLGW	GPR6	Proteína
312	EL2	NCLAERAACSVVRPLARSH	GPR6	Proteína
313	TM5	VALLSAFFMVFIMLHLYV	GPR6	Proteína
314	IL3	RICQVVRHAHQIALQOHCCLAPPHLAATRK	GPR6	Proteína
315	TM6	GVGTLAVVLGTFGASWLPFAIYC	GPR6	Proteína
316	EL3	VVGSHEDPA	GPR6	Proteína
317	TM7	VVGSHEDPAVYTYATLLPATYNSMINPIIYAF	GPR6	Proteína
318	C-term	RNQEIQRALWLLLCGCFQSKVPFRSRSPSEV	GPR6	Proteína
319	N-term	MNEDLKVNLSGLPRDYLDAAAENISAASVSRVPAVEPEPELVNP	GPR12	Proteína
320	TM1	WDIVLCTSGTLISCENAIIVLII	GPR12	Proteína
321	IL1	FHNPSLRAPMEL	GPR12	Proteína
322	TM2	LIGSLALADLLAGIGLITNEVFA	GPR12	Proteína
323	EL1	YLLQSEATK	GPR12	Proteína
324	TM3	LVTIGLIVASFASVCSLLAITV	GPR12	Proteína
325	IL2	DRYLSLYALTYHSERTVTF	GPR12	Proteína
326	TM4	TYVMLVWLWGTSLICGLLPVMGW	GPR12	Proteína
327	EL2	NCLRDESTCSVVRPLTKNN	GPR12	Proteína
328	TM5	AAILSVSFLFMFALMLQLYIQIC	GPR12	Proteína
329	IL3	KIVMRHAHQIALQHHFLATSHYVTTTRK	GPR12	Proteína
330	TM6	GVSTLAILLGTFACWMPFTLYS	GPR12	Proteína
331	EL3	LIADYTPS	GPR12	Proteína
332	TM7	IYTYATLLPATYNSIINPVIYAF	GPR12	Proteína
333	C-term	RNQEIQKALCLICGCI PSSLAQRARSFSDV	GPR12	Proteína

EJEMPLO 3: Reducción del Péptido β -Amiloide por Medio de la Inactivación de la Expresión de GPCR

- 5 Se puede imitar el efecto de un antagonista por medio del uso de estrategias basadas en siARN, lo que da como resultado niveles de expresión disminuidos de la

proteína seleccionada como objetivo. Por ejemplo, la transfección con siARN de GPR3 reduce el péptido β -amiloide 1-42.

Las células HEK293 APPwt se transfectan con una mezcla adecuada de siARNs de GPR3 (Dharmacon, EE.UU.: Tabla 3), eGFP, Luciferasa y BACE con Oligofectamina. 24 horas tras la transfección, se cambia el medio y se deja que las células acumulen péptidos β -amiloide en el medio condicionado durante 24 horas antes del análisis de ELISA tal como se describió anteriormente. Los datos demuestran claramente que el siARN dirigido contra los niveles de ARN de GPR3 reduce los niveles de β -amiloide 1-42 en comparación con las condiciones de control (Figura 4). En conclusión, estos datos demuestran que GPR3 modula los niveles de β -amiloide secretado. Se usa el mismo procedimiento para el análisis del procesamiento de APP mediante GPR6 y GPR12.

Tabla 3: siARNs específicos para GPR3 (Dharmacon, EE.UU.; SEQ ID N°: 334-337)

Símbolo del gen	Número NM	Número de cat. de Dharmacon	Secuencia completa del siARN	SEQ ID N°
GPR3	NM_005281	D-003951-01	GTTTATCCACTCTCCAAGA	334
GPR3	NM_005281	D-003951-02	TTTATCCACTCTCCAAGAA	335
GPR3	NM_005281	D-003951-03	CCACCTCTCTACACCTATC	336
GPR3	NM_005281	D-003951-04	ACCGCTACCTTTCTCTGTA	337

EJEMPLO 4: Expresión de GPR3 en el Cerebro Humano

Tras la identificación de un modulador del procesamiento de APP, es importante determinar si el modulador se expresa en el tejido y las células de interés. Esto se puede llevar a cabo midiendo los niveles de ARN y/o de proteína en el tejido y las células. En años recientes, se están cuantificando los niveles de ARN por medio de técnicas de PCR en tiempo real, por las que el ARN se transcribe primero a cADN y después se monitoriza la amplificación del cADN de interés durante una reacción de PCR. El gráfico de amplificación y el valor de Ct resultantes son indicadores de la cantidad de ARN presente en la muestra. La determinación de los niveles de genes de mantenimiento permite la normalización de los niveles de ARN del gen seleccionado como objetivo entre diferentes muestras de ARN, representado como los valores de Δ Ct.

Para determinar si los GPCRs de la invención se expresan en el cerebro humano, se lleva a cabo una PCR en tiempo real con cebadores específicos de

GAPDH y cebadores específicos para cada GPCR de la invención con ARN de cerebro total humano, corteza cerebral humana, e hipocampo humano (BD Biosciences) (véase la Tabla 4).

5 TABLA 4: Cebadores Usados en el Análisis de PCR Cuantitativa en Tiempo Real de los Niveles de Expresión de GPR3 (SEQ ID N°: 338-339)

Gen	Nombre del cebador	SEQ ID N°:	Secuencia del cebador
GPR3	GPR3_Hs_For	338	GGCCTTTACCGCCAGCAT TCTGAATAGTAGGTGAG
	GPR3_Hs_Rev	339	GGCATTG

Se detecta GAPDH con la sonda Taqman, mientras para las otras GPCRs se usó SybrGreen. Brevemente, se transcriben inversamente a ADN 40 ng de ARN mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa MultiScribe (50 U/μl) (Applied BioSystems). El cADN resultante se amplifica con la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied BioSystems) durante 40 ciclos mediante el uso de un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7000.

Se analiza la presencia de transcritos de GPCR en el ARN de cerebro total, corteza cerebral e hipocampo por medio de PCR cuantitativa en tiempo real. Para GPR3, los valores obtenidos de Ct indican que se detecta en todas las muestras de ARN (Tabla 5).

Para comprender mejor la expresión celular específica, se lleva a cabo un análisis inmunohistoquímico (nivel de proteínas) y/o hibridación *in situ* (nivel de ARN) con cortes de estructuras hipocámpicas, corticales y subcorticales de cerebros humanos normales y de Alzheimer. Estos resultados indican si la expresión se da en las neuronas, las células de la microglia o los astrocitos. La comparación del tejido enfermo con el tejido sano indica si GPR3 se expresa en el tejido enfermo y si el nivel de expresión cambia en comparación con la situación no patológica. Se usa el mismo procedimiento para realizar el perfil de la expresión de GPR6 y GPR12.

TABLA 5: Valores de Ct de PCR cuantitativa en tiempo real: ARN de cerebro total, corteza cerebral o hipocampo humano analizado en cuanto a la presencia de ARN de GPR3 por medio de PCR cuantitativa en tiempo real. Se usa ARN de GAPDH para normalizar todas las muestras (ΔCt).

Tejido humano	Valores de Ct de GAPDH		Valores de Ct de GPR3		Δ Ct (+RT)
	+RT	-RT	+RT	-RT	
Cerebro total	21,29	NA	24,93	33,07	3,64
Hipocampo	21,65	NA	25,77	36,14	4,12
Corteza cerebral	20,27	NA	25,19	35,73	4,22

EJEMPLO 5: Producción de β -Amiloide en Células Neuronales Primarias de Rata

Para investigar si GPR3 afecta a la producción de β -amiloide en una neurona real, se transducen neuronas hipocámpicas o corticales primarias humanas o de rata con adenovirus que contienen el cADN de GPR3. Se determinan los niveles de β -amiloide mediante ELISA (véase el EJEMPLO 1). Debido a que los genes de APP de roedor portan varias mutaciones en APP en comparación con la secuencia humana, producen menos β -amiloide 1-40 y 1-42. Para conseguir niveles mayores de β -amiloide, se realiza una co-transducción de GPR3 con cADN de APP de tipo natural humano o APP mutante sueco humano (que aumenta la producción de β -amiloide).

Se preparan cultivos de neuronas primarias de rata a partir de cerebro de ratas Sprague Dawley de E18-E19 días de edad según Goslin y Banker (Culturing Nerve cells, segunda edición, 1998 ISBN 0-262-02438-1). Brevemente, se preparan suspensiones de células individuales obtenidas del hipocampo o de la corteza. Se determina el número de células viables y se colocan en placas de 96 pocillos de plástico revestidas con poli-L-lisina en medio esencial mínimo (MEM) complementado con un 10% de suero de caballo. Las células se siembran a una densidad de 50.000 células por pocillo (es decir, alrededor de 166.000 células/cm²). Después de 3-4 h, el medio de cultivo se sustituye por 160 μ l de medio neurobasal sin suero con complemento B27 (GIBCO BRL). Se añade arabinósido de citosina (5 μ M) 24 h tras la colocación en las placas para evitar la proliferación de células no neuronales (gliales).

Se usan neuronas en el día 5 tras la colocación en las placas. Antes de la transducción adenoviral, se transfieren 150 μ l del medio condicionado de estos cultivos a los pocillos correspondientes en una placa vacía de 96 pocillos y se devuelven 50 μ l del medio condicionado a las células. Los 100 μ l/pocillo restantes se almacenan a 37°C y un 5% de CO₂. Los cultivos de neuronas primarias hipocámpicas se infectan con el lisado bruto de virus Ad5C09Att00/A011200-GPR3_v3, Ad5C09Att00/A010801-LacZ_v1, Ad5C09Att00/A010800-eGFP_v1 y Ad5C09Att00/A010800-luc_v17 que contienen el cADN de GPR3, LacZ, eGFP y luciferasa, respectivamente, a diferentes MOIs, que oscilan de 250 a 2000. Además, las células se infectan también con el ade-

novirus purificado Ad5C01Att01/A010800 APP_v6 que expresa APP695 humano de tipo natural a una MOI de 2000. Dieciséis a veinticuatro horas tras la transfección, se elimina el virus y los cultivos se lavan con 100 µl de medio neurobasal nuevo precalentado. Tras la eliminación de la disolución de lavado, se transfiere medio nuevo, que
5 contiene 50 µl del medio condicionado almacenado y 50 µl de medio neurobasal nuevo, a las células correspondientes. El medio se recoge después de 48 y 72 horas. Se determina el número de células en los pocillos determinando los niveles de ATP. Se determinó la concentración de β-amiloide mediante un ELISA específico de β-amiloide 1-42 (véase el EJEMPLO 1). Los niveles de β-amiloide 1-42 se normalizan en
10 función del número de células.

Los datos (Figura 6) indican claramente que los niveles incrementados de sobreexpresión de GPR3 en las neuronas primarias da como resultado un incremento dependiente de la dosis correspondiente de los niveles de β-amiloide 1-42 en comparación con los virus negativos de control.

15

EJEMPLO 6: Cribado de Ligandos para GPCRs.

Cribado de Genes Indicadores.

Se transducen células mamíferas tales como células HEK293 o CHO-K1 de manera estable con un plásmido que alberga el gen de luciferasa bajo el control de un
20 promotor dependiente de cAMP (elementos CRE) o se transducen con un adenovirus que alberga un gen de luciferasa bajo el control de un promotor dependiente de cAMP. Además, se pueden usar construcciones indicadoras con el gen de luciferasa bajo el control de un promotor dependiente de Ca^{2+} (elementos NF-AT) o de un promotor que está controlado por NF-κB activado. Estas células, que expresan la construcción indi-
25 cadora, se transducen después con un adenovirus que alberga el cADN del GPCR de la presente invención. Cuarenta (40) horas tras la transducción, las células se tratan con lo siguiente:

a) un agonista para el receptor (p.ej. 1-fosfato de esfingosina) y se criba con una colección extensa de compuestos de referencia que comprenden péptidos
30 (LOPAP, Sigma Aldrich), lípidos (Biomol, TimTech), carbohidratos (Specs), compuestos naturales (Specs, TimTech), compuestos químicos pequeños (Tocris), bibliotecas de cribado disponibles comercialmente, y compuestos que se ha demostrado que tienen afinidad de unión hacia un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6, 289-333, que incluye

compuestos que comprenden ariloxiditiourea (véase el documento US 6.420.563), sus sales, hidratos o solvatos, o

b) una colección extensa de compuestos de referencia que comprenden péptidos (LOPAP, Sigma Aldrich), lípidos (Biomol, TimTech), carbohidratos (Specs), compuestos naturales (Specs, TimTech), compuestos químicos pequeños (Tocris), bibliotecas de cribado disponibles comercialmente, y compuestos que se ha demostrado que tienen afinidad de unión hacia un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6, 289-333, que incluye compuestos que comprenden ariloxiditiourea (véase el documento US 6.420.563), sus sales, hidratos o solvatos, solamente, ya que se considera que GPR3 es un GPCR constitutivamente activo.

Se considera que los compuestos, que disminuyen el incremento inducido por el agonista de la actividad de luciferasa o la actividad constitutiva, son antagonistas o agonistas inversos para la GPR3. Estos compuestos se criban de nuevo como verificación y se criban con respecto a su efecto sobre los niveles de péptido β -amiloide secretado. Los compuestos se criban también para verificar la unión al GPCR. Los ensayos de unión, de péptido β -amiloide y de actividad del indicador se pueden llevar a cabo esencialmente en cualquier orden para cribar compuestos.

Además, las células que expresan el gen indicador NF-AT se pueden transducir con un adenovirus que alberga el cADN que codifica la subunidad α de G15 o subunidades $G\alpha$ quiméricas. G_{15} es una proteína G promiscua de la clase G_q que se acopla a muchas GPCRs diferentes, y como tal dirige su señalización hacia la liberación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} . Las subunidades $G\alpha$ quiméricas son miembros de la familia G_s y $G_{i/o}$ en las cuales los últimos 5 residuos C-terminales están sustituidos por los de G_{aq} , y estas proteínas G quiméricas también dirigen la señalización del cAMP a la señalización de Ca^{2+} .

Cribado de FLIPR

Se transfectan de manera estable células mamíferas tales como HEK293 o CHO-K1 con una construcción de plásmido de expresión que alberga el cADN de un GPCR de la presente invención. Las células se siembran, se cultivan, y se seleccionan hasta que se pueden obtener suficientes células estables. Las células se cargan con un fluoróforo dependiente de Ca^{2+} tal como Fura3 o Fura4. Después de eliminar mediante lavado el exceso de fluoróforo, las células se criban con respecto a una colección extensa de compuestos de referencia que comprenden péptidos (LOPAP, Sigma Aldrich), lípidos (Biomol, TimTech), carbohidratos (Specs), compuestos naturales

(Specs, TimTech), compuestos químicos pequeños (Tocris), bibliotecas de cribado disponibles comercialmente, y compuestos que se ha demostrado que tienen afinidad de unión hacia un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6, 289-333, que incluye compuestos
5 que comprenden ariloxiditiourea (véase el documento US 6.420.563), sus sales, hidratos, o solvatos, añadiendo simultáneamente un agonista (de manera alternativa, no es necesario añadir un agonista si se usa la actividad constitutiva del receptor) y un compuesto a las células. La activación del receptor se mide como un incremento casi instantáneo de fluorescencia debido a la interacción del fluoróforo y el Ca^{2+} que se libera. Los compuestos que reducen o inhiben el incremento de fluorescencia inducido
10 por el agonista (o la fluorescencia constitutiva) se consideran antagonistas o agonistas inversos del receptor con el que se están cribando. Estos compuestos se cribarán de nuevo para medir la cantidad de péptido β -amiloide así como la unión al GPCR.

AequoScreen.

15 Las células CHO, que expresan de forma estable Apoaecuorina se transfectan de forma estable con una construcción de plásmido que alberga el cADN de un GPCR. Las células se siembran, se cultivan, y se seleccionan hasta que se pueden obtener células suficientemente estables. Las células se cargan con coelenterazina, un cofactor de apoaecuorina. Tras la activación del receptor, las reservas intracelulares de Ca^{2+}
20 se vaciarán y la aecuorina reaccionará con la coelenterazina en un proceso que emite luz. La luz emitida es una medida de la activación del receptor. Las CHO, que expresan de forma estable tanto la apoaecuorina como el receptor, se criban con respecto a una colección extensa de compuestos de referencia que comprenden péptidos (LOPAP, Sigma Aldrich), lípidos (Biomol, TimTech), carbohidratos (Specs), compues-
25 tos naturales (Specs, TimTech), compuestos químicos pequeños (Tocris), bibliotecas de cribado disponibles comercialmente, y compuestos que se ha demostrado que tienen afinidad de unión hacia un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4-6, 289-333, que incluye com-
puestos que comprenden ariloxiditiourea (véase el documento US 6.420.563), sus sa-
30 les, hidratos, o solvatos, añadiendo simultáneamente un agonista (de manera alternativa, no es necesario añadir un agonista si se usa la actividad constitutiva del receptor) y un compuesto a las células. La activación del receptor se mide casi instantánea-
mente como un destello de luz debido a la interacción de la apoaecuorina, coelentera-
zina, y el Ca^{2+} que se libera. Los compuestos que reducen o inhiben el incremento de
35 luz inducido por el agonista por la actividad constitutiva se consideran antagonistas o

agonistas inversos para el receptor con el que se están cribando. Estos compuestos se cribarán de nuevo para medir la cantidad de péptido β -amiloide secretado así como la unión al GPCR.

Además, las células CHO que expresan de forma estable el gen de apoaecuo-
5 rina se transfectan de forma estable con una construcción de plásmido que alberga el cADN que codifica la subunidad α de G_{15} o las subunidades G_α quiméricas. G_{15} es una proteína G promiscua de la clase Gq que se acopla a muchos GPCRs diferentes, y como tal redirige su señalización hacia la liberación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} . Las subunidades G_α quiméricas son miembros de la familia G_s y $G_{i/o}$ en las que
10 los últimos 5 residuos C-terminales están sustituidos por los de $G_{\alpha q}$, y estas proteínas G quiméricas también redirigen la señalización de cAMP a la señalización de Ca^{2+} .

Cribado de compuestos que se unen a los polipéptidos GPCR (experimento de desplazamiento)

Los compuestos se criban en función de la unión a los polipéptidos GPCR. La
15 afinidad de los compuestos a los polipéptidos se determina en un experimento de desplazamiento. Brevemente, los polipéptidos GPCR se incuban con un ligando marcado (radiomarcado, marcado con fluorescencia) que se sabe que se une al polipéptido (p.ej., 1-fosfato de esfingosina o 1-fosfato de dihidroesfingosina) y con un compuesto sin marcar. El desplazamiento del ligando marcado del polipéptido se determina mi-
20 diendo la cantidad de ligando marcado que todavía está asociado con el polipéptido. La cantidad asociada con el polipéptido se representa respecto de la concentración del compuesto para calcular los valores de Cl_{50} . Este valor refleja la afinidad de unión del compuesto a su objetivo, es decir, los polipéptidos GPCR. Las moléculas que se unen intensamente tienen una Cl_{50} en el intervalo nanomolar, e incluso en el intervalo pico-
25 molar. Los compuestos que tienen una Cl_{50} de al menos 10 micromolar o mejor (nmol a pmol) se aplican en el ensayo de secreción de β -amiloide para comprobar su efecto sobre la secreción y el procesamiento del β -amiloide. Los polipéptidos GPCR se pueden preparar de varias maneras dependiendo de si el ensayo se llevará a cabo con células, fracciones celulares o bioquímicamente, sobre proteínas purificadas.

30 Cribado de compuestos que se unen al polipéptido GPCR (ensayo de cribado de GPCR genérico)

Cuando un receptor asociado a proteína G se hace activo de forma constitutiva, se une a una proteína G (G_q , G_s , G_i , G_o) y estimula la unión del GTP a la proteína G. La proteína G actúa entonces como una GTPasa e hidroliza lentamente el GTP hasta
35 GDP, por lo que el receptor, en condiciones normales, se desactiva. Sin embargo, los

receptores activados de forma constitutiva continúan intercambiando GDP por GTP. Se puede usar un análogo no hidrolizable de GTP, [³⁵S]GTPγS, para monitorizar la unión aumentada a las membranas que expresan de forma constitutiva receptores activados. Se informa que se puede usar [³⁵S]GTPγS para monitorizar el acoplamiento

5 de la proteína G a membranas en ausencia y presencia de ligando. Además, una aproximación preferida es el uso de una proteína de fusión GPCR-proteína G. Los expertos en la técnica conocen bien la estrategia para generar una proteína de fusión GPR3-proteína G. Se preparan membranas que expresan una proteína de fusión GPR3-proteína G para el uso en la identificación directa de compuestos candidatos

10 tales como agonistas inversos. Las membranas homogeneizadas con la proteína de fusión GPR3-proteína G se transfieren a una placa de 96 pocillos. Se usa una herramienta de cabezas de alfiler para transferir cada compuesto candidato a cada pocillo más [³⁵S]GTPγS, seguido de incubación en un agitador durante 60 minutos a temperatura ambiente. El ensayo se detiene centrifugando las placas a 4000 RPM durante

15 15 minutos a 22 °C. Las placas se aspiran después y se lee la radiactividad. Se usa el mismo procedimiento para el análisis de GPR6 y GPR12.

Estudio de Unión del Receptor y del Ligando en la Superficie Celular

El receptor se expresa en células de mamífero (HEK293, CHO, COS7) mediante la transducción adenoviral de las células (véase el documento US 6.340.595).

20 Las células se incuban tanto con un ligando marcado (yodado, tritiado, o fluorescente) como con el compuesto sin marcar a diversas concentraciones, que oscilan de 10 pM a 10 μM (3 horas a 4 °C: HEPES 25 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM y 0,2% de BSA, ajustado a pH 7,4). Las mezclas de reacción se aspiran en filtros de vidrio GF/B tratados con PEI mediante el uso de un recolector de células (Packard).

25 Los filtros se lavan dos veces con tampón de lavado helado (HEPES 25 mM, NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, ajustado a pH 7,4). Se añade líquido de centelleo (MicroScint-10; 35 μl) a los filtros secos y los filtros se cuentan en un contador de centelleo (Packard Topcount). Los datos se analizan y se representan mediante el uso del soporte informático Prism (GraphPad Software, San Diego, Calif). Las curvas de

30 competición se analizan, y se calculan los valores de CI₅₀. Si uno o más puntos no se hallan en el intervalo sigmoide de la curva de competición o cercanos al intervalo sigmoide, se repite el ensayo y se adaptan las concentraciones de ligando marcado y sin marcar para tener más datos cercanos o dentro del intervalo sigmoide de la curva.

Estudios de Unión de Receptor y Ligando en Preparaciones de Membranas

El aislamiento de preparaciones de membranas de células de mamífero (HEK293, CHO, COS7) que sobreexpresan del receptor se realiza como sigue: Se aspira el medio de las células transducidas y las células se recogen en PBS 1x ras-

5 cando suavemente. Las células se centrifugan (2500 rpm, 5 min) y se resuspenden en Tris 50 mM de pH 7,4 (10×10^6 células/ml). El sedimento de células se homogeniza mediante sonicación 3 x 5 seg (UP50H; sonotrodo MSI; amplitud máx.: 140 μ m; densi-

10 dad de potencia sónica máx.: 125 W/cm²). Las fracciones de membranas se preparan centrifugando 20 min a velocidad máxima (13000 rpm ~15.000 a 20.000 g o fcr). El sedimento resultante se resuspende en 500 μ l de Tris 50 mM de pH 7,4 y se sonica de nuevo durante 3 x 5 seg. La fracción de membranas se aísla mediante centrifugación y finalmente se resuspende en PBS. La competición de unión y la derivación de los valores de CI_{50} se determinan tal como se describió anteriormente.

Cribado de interiorización (1)

15 La activación de una ruta de transducción de señales asociadas a GPCR conduce habitualmente a la translocación de moléculas de transducción de señales específicas desde el citoplasma hasta la membrana plasmática o desde el citoplasma hasta el núcleo. Norak ha desarrollado su ensayo de Transfluor basado en la translocación inducida por agonistas del complejo receptor- β -arrestina-GFP desde el citosol hasta la

20 membrana plasmática y la interiorización posterior de este complejo, que se da durante la desensibilización del receptor. Un ensayo similar usa un receptor marcado con GFP en vez de β -arrestina. Las células HEK293 se transducen con un vector GPR3-eGFP que se traduce a una proteína de fusión GPR3-eGFP. 48 horas tras la transduc-

25 ción, las células se colocan en medio nuevo exento de suero durante 60 minutos y se tratan con un ligando (p.ej., 1-fosfato de esfingosina 100 nM) durante 15, 30, 60 ó 120 minutos a 37 °C y un 5% de CO₂. Tras los tiempos de exposición indicados, las células se lavan con PBS y se fijan con un 5% de paraformaldehído durante 20 minutos a TA. Se visualiza la fluorescencia de GFP con un microscopio Zeiss con una cámara digital. Este método se dirige a la identificación de compuestos que inhiben la translocación

30 mediada por ligandos (mediada por la actividad constitutiva) de la proteína de fusión a los compartimentos intracelulares. Se usa el mismo procedimiento para el análisis de GPR6 y GPR12.

Cribado de interiorización (2)

Existen diversas variaciones de los ensayos de translocación mediante el uso

35 de complementación de la enzima β -galactosidasa y β -arrestina y ensayos basados en

BRET con el receptor como donante de energía y β -arrestina como aceptor de energía. Además, se usan anticuerpos específicos del receptor marcados con colorantes sensibles al pH para detectar la translocación del receptor inducida por el agonista hasta los lisosomas ácidos. Todos los ensayos de translocación se usan para cribar en busca de ligandos que actúan como agonistas y como antagonistas.

Ensayo de melanóforo (Arena Pharmaceutical)

El ensayo de melanóforo se basa en la capacidad de los GPCRs de alterar la distribución de melanosomas que contienen melanina en melanóforos de *Xenopus*. La distribución de los melanosomas depende del receptor exógeno que está acoplado a G_i/o o G_s/q . La distribución de los melanosomas (dispersos o agregados) se detecta fácilmente midiendo la absorción de luz. Se usa este tipo de ensayo para los cribados de compuestos tanto agonistas como antagonistas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un compuesto que inhibe el procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide en una célula de mamífero, que comprende:
 - 5 (a) poner en contacto un compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 4, 289 a 303; y
 - (b) medir el nivel de un péptido β -amiloide.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido está asociado a membranas.
3. El método según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido está presente en un receptor celular transmembrana en una célula de mamífero.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho método comprende además la etapa de medir la activación de una ruta biológica que produce un indicador del procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide, en el que dicho indicador es un segundo mensajero.
- 20 5. El método en la reivindicación 4, en el que dicho segundo mensajero es AMP cíclico o Ca^{2+} .
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho péptido β -amiloide se selecciona del grupo que consiste en uno o más de los péptidos β -amiloides 1-42, 1-40, 11-42 y 11-40.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho péptido β -amiloide es el péptido β -amiloide 1-42.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho método comprende además la etapa de medir la expresión de un indicador en dicha célula de mamífero.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el indicador se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, GFP, eGFP, dGFP, luciferasa y β -galactosidasa.

5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de una biblioteca de cribado disponible comercialmente.

10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho compuesto es un péptido de una biblioteca de expresión en fagos o una biblioteca de fragmentos de anticuerpos.

15 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho compuesto es una ariloxiditiourea, sus sales, hidratos, o solvatos.

Figura 1A

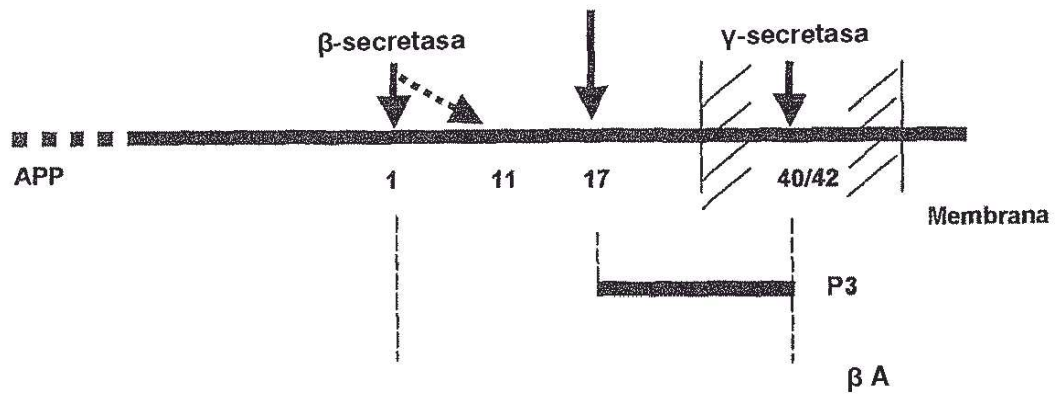


Figura 1B

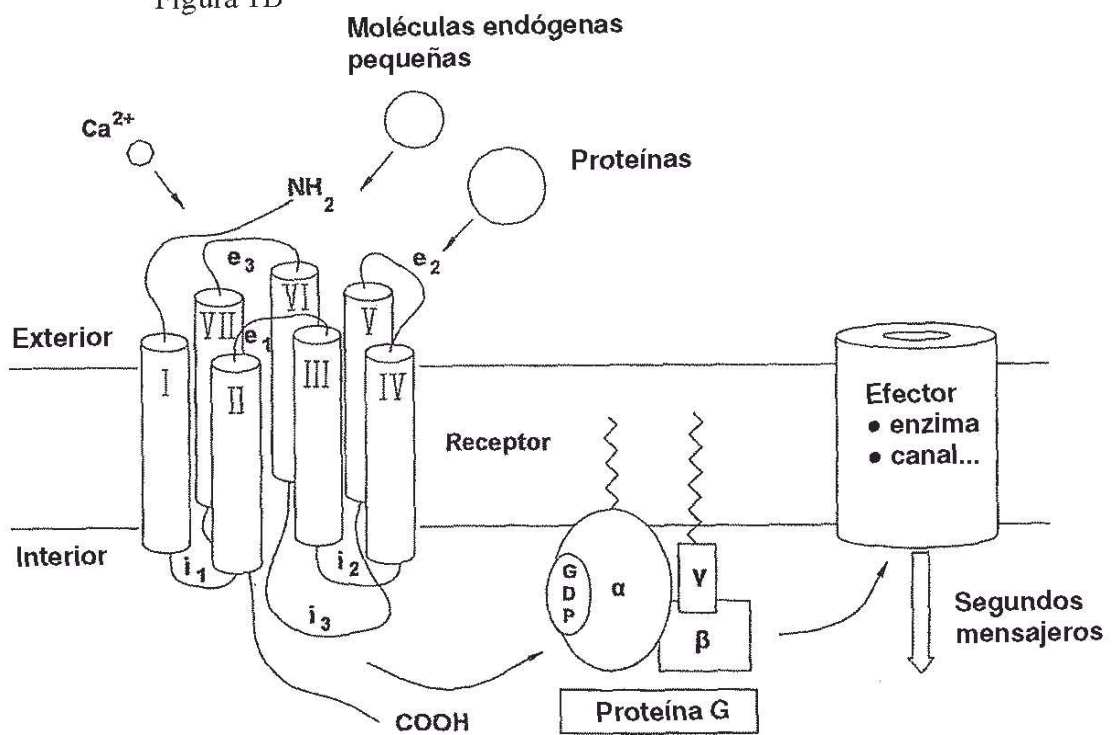


Figura 2

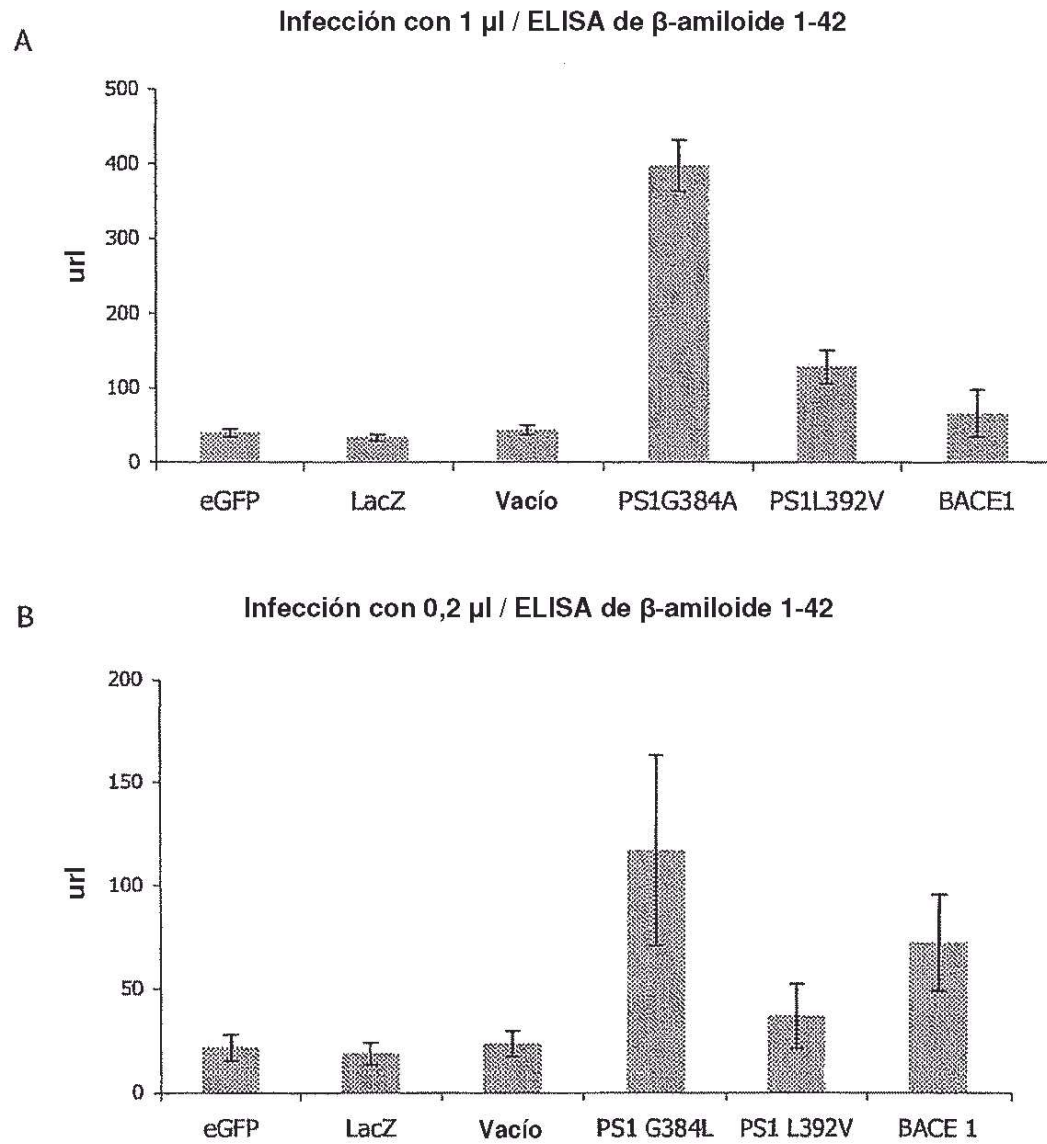
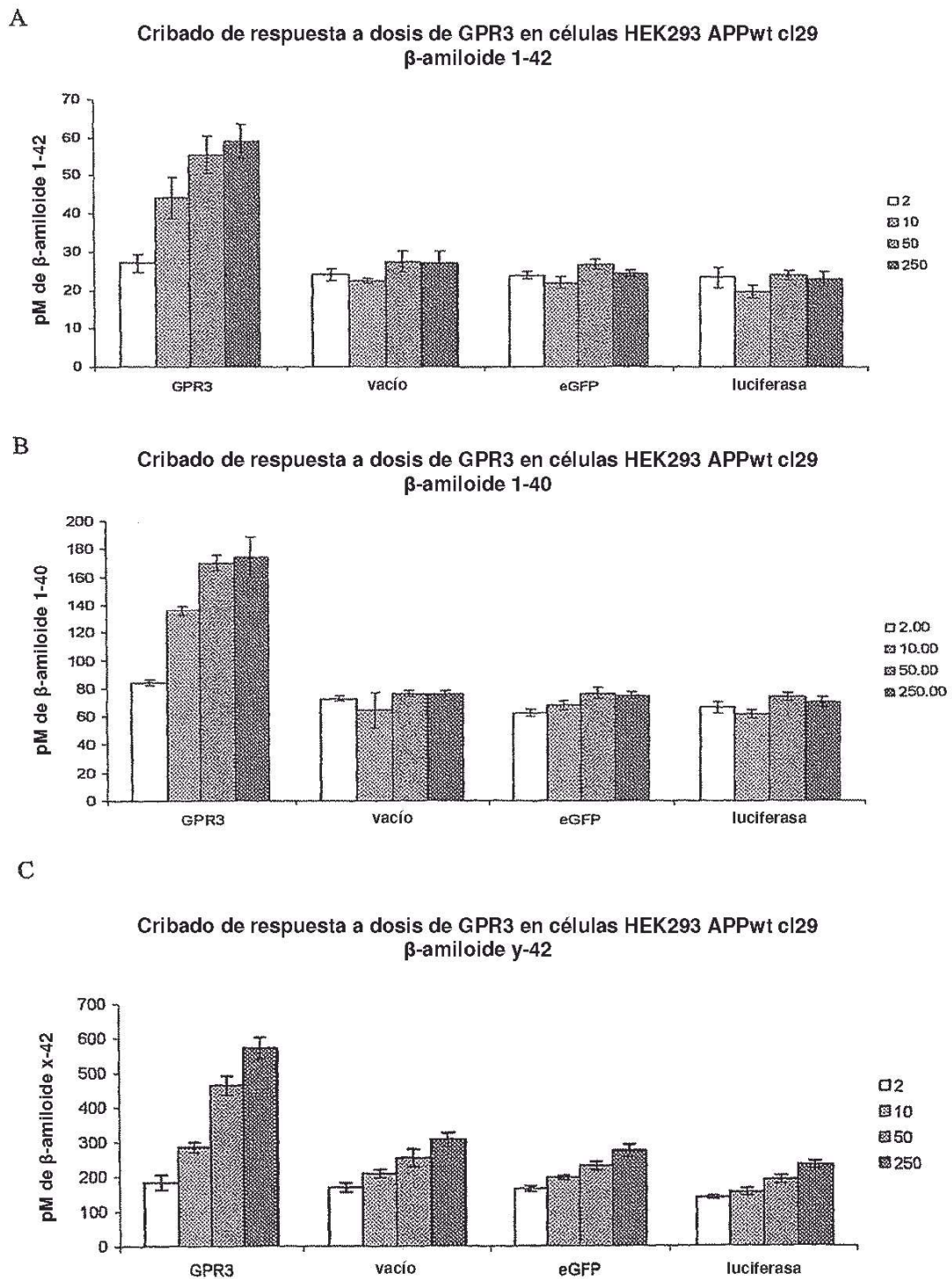
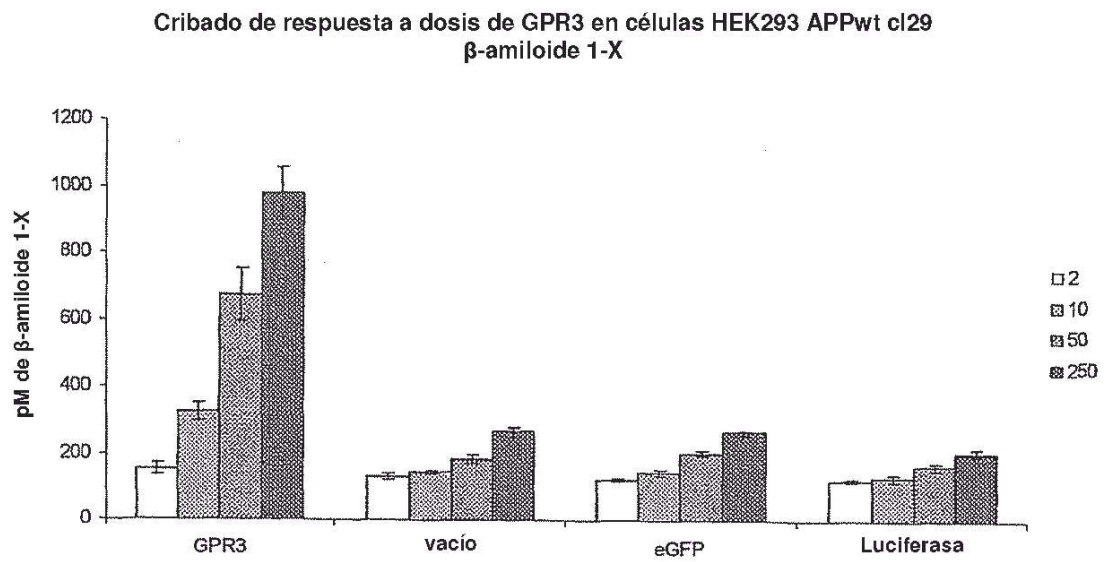


Figura 3:



D



E

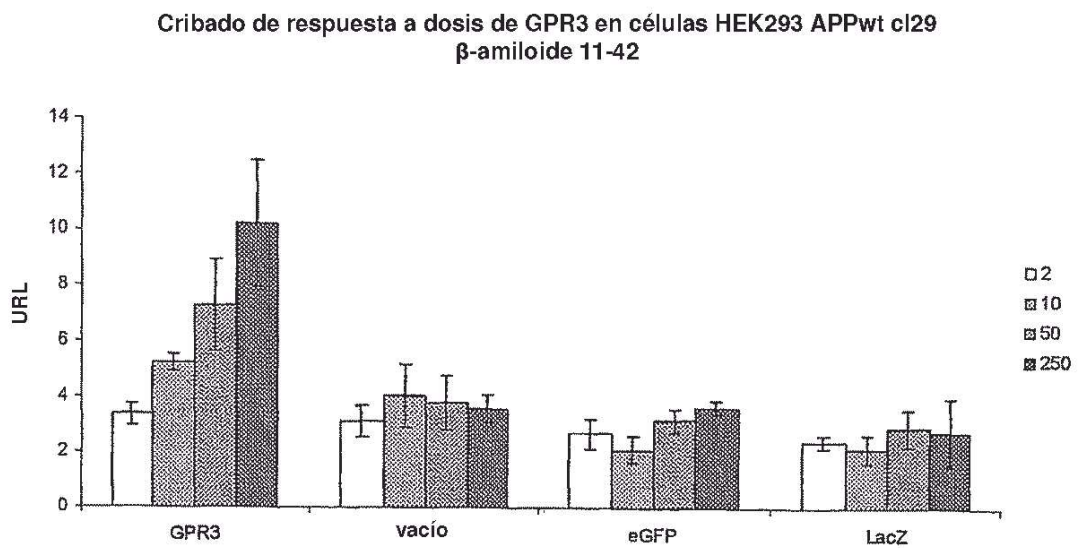
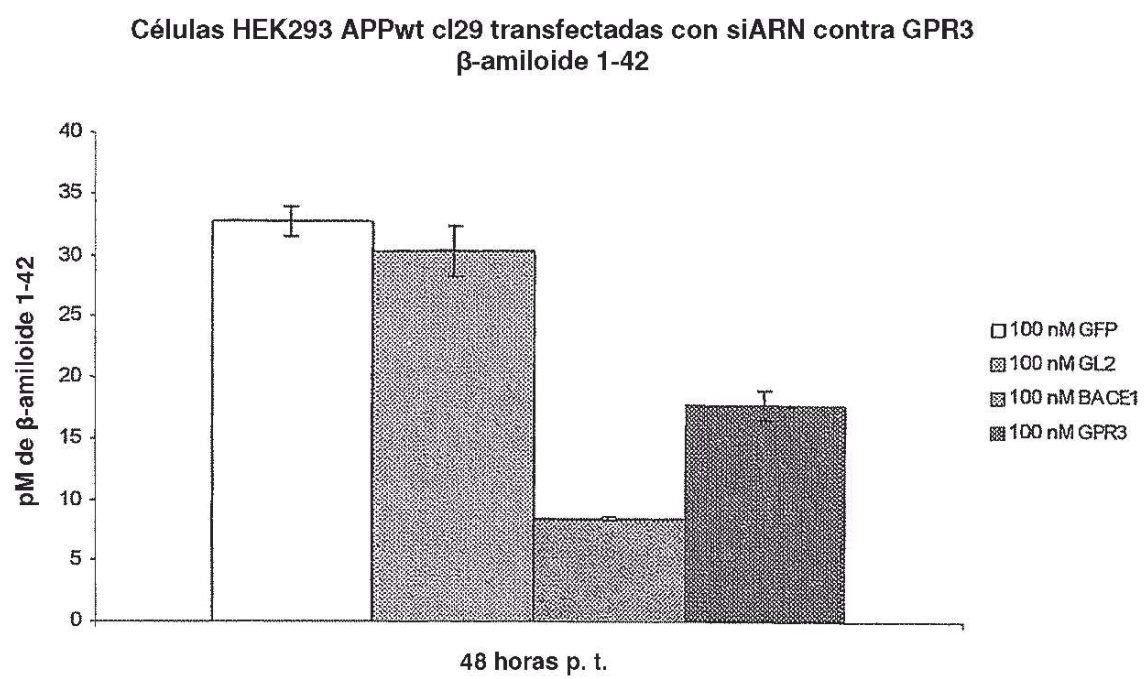


Figura 4



Parámetros de las secuencias múltiples esenciales:

Matriz de sustitución: Blossum62

0,05

penalization for exemption as follows:

	*	20	*	40	*	60	*	80
GPR3	:	MMGAGSILSAIS	NNVSSVPAPPT	PAAPSPKAWDVLIC	: 48			
GPR6	:	MNAAAASLNDVVAEECAAAATAA	GPDTGEWPPAAALAGG	SLELSQSAGPGLLIAWDVLIC	: 80			
GPR12	:	MNDKANSLCLRDAAA	AENISVSSRVPVE	PEPELVMDIVLIC	: 52			
		6 Gpa l Ag	g aa6g ga g	P Lp vnpWD66LIC				

	100	*	120	*	140	*	160									
GPR3	SGHLV	ENALAV	LIIVG	FR	PMFLVGSIA	ADLIAC	GLV	FAAVFCIGSAE	LVLVG	LAMAF	ASIGSLI	: 128				
GPR6	SESVIAC	ENALV	LIAS	P	RIPMFVLVGSIA	TADLLAC	GLI	F	QY	VPS	T	LL	VGFL	PAASV	SLLI	: 160
GPR12	TSGLI	ENALV	LIHNS	R	RIPMFVLVGSIA	ADLIAC	GLINE	AV	LQS	ATKL	IG	I	F	ASV	CELL	: 132
	SGTG6SC	ENAGV	va61	tpal	RapMF6L6GSIA	ADLIAC	GL6lhFv	516	Se	SL6t6G	6vasF	AS6	SLL			

[illegible][illegible]

GPR3	:	NSM INP IYAFRNQDVQKVI	AV	CCSSS	I	R	RSPSV	: 330
GPR6	:	NSWINPIYAFRNQ	IQR	L	LLC	CFQS	V	R RSPSEV : 362
GPR12	:	NSLINEIYAFRNQ	IQK	LC	I	C	CIPSSLAQARSPSV	: 334
		NS6INP6IYAFRNQE6Q4alwL6CCgc				sk6pfRRSRPSqV		

Figura 6

