



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C12N 15/12, C07K 13/00 C07H 21/00, C12Q 1/68 G01N 33/50, A61K 31/00</p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 94/01556</b> (43) Date de publication internationale: 20 janvier 1994 (20.01.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00651 (22) Date de dépôt international: 29 juin 1993 (29.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08082 1er juillet 1992 (01.07.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : AMLAIKY, Nour-dine [MA/FR]; 7, rue de Barr, F-67000 Strasbourg (FR). BOSCHERT, Ursula [DE/FR]; 6, cour du Moulin-Zorn, F-67000 Strasbourg (FR). HEN, René [FR/FR]; 3, rue Kageneck, F-67000 Strasbourg (FR). PLASSAT, Jean-Luc [FR/FR]; 62, rue de l'Hôpital, F-67100 Strasbourg (FR). RAMBOZ, Sylvie [FR/FR]; 61A, rue du Lazaret, F-67100 Strasbourg (FR).</p>	<p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: POLYPEPTIDES HAVING SEROTONINERGIC RECEPTOR ACTIVITY (5HT6), NUCLEIC ACIDS CODING FOR SAID POLYPEPTIDES, AND USES THEREOF (54) Titre: POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR SEROTONINERGIQUE (5HT6), ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS (57) Abstract Novel polypeptides designated 5HT6 having serotonergic receptor activity, genetic material for their expression, any recombinant cell expressing said polypeptides, and uses thereof are disclosed. (57) Abrégé La présente invention concerne de nouveaux polypeptides désignés 5HT6 ayant une activité de récepteur sérotoninergique, le matériel génétique permettant leur expression, toute cellule recombinante exprimant ces polypeptides, et leur utilisation.</p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR SEROTONINERGIQUE (5HT6)  
ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS

---

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

La sérotonine est un neuromodulateur capable d'induire et de moduler une  
grande variété de comportements tels que le sommeil, l'appétit, la locomotion,  
l'activité sexuelle ou encore la contraction vasculaire. Il est admis que l'activité de la  
10 sérotonine est médiée par son interaction avec des récepteurs, désignés récepteurs  
sérotoninergiques ou récepteurs 5-HT (pour 5-hydroxytryptamine). Des études de  
biologie moléculaire ainsi que des études pharmacologiques ont révélé qu'il existait  
un grand nombre de sous-types de récepteurs 5-HT. Les récepteurs 5-HT qui ont été  
décrits jusqu'à aujourd'hui appartiennent soit à la famille des récepteurs liés à des  
15 canaux ioniques (récepteurs 5-HT<sub>3</sub>), soit à la famille des récepteurs qui interagissent  
avec des protéines G et qui possèdent sept domaines transmembranaires. Par ailleurs,  
l'analyse des séquences d'acides aminés a montré que les récepteurs 5-HT  
interagissant avec des protéines G peuvent être sous-divisés en deux groupes  
distincts : Les récepteurs 5HT<sub>1</sub>, comprenant les sous-types mammifères 5HT<sub>1A</sub>,  
20 5HT<sub>1B</sub> et 5HT<sub>1D</sub> ainsi que trois récepteurs 5HT de drosophile ; et les récepteurs  
5HT<sub>2</sub> comprenant les sous-types 5HT<sub>2</sub> et 5HT<sub>1C</sub>.

Ces récepteurs ne sont sans doute pas les seuls récepteurs 5HT existant, dans  
la mesure où des études pharmacologiques ont révélé d'autres sous-types tels que les  
récepteurs 5HT<sub>4</sub> ainsi que certains récepteurs apparentés au sous-type 5HT<sub>1</sub>  
25 (récepteurs "5HT<sub>1</sub> like"). De plus, des études supplémentaires de biologie  
moléculaire ont également révélé des hétérogénéités au sein des sous-types  
5HT<sub>1B/1D</sub>.

La présente invention résulte de la mise en évidence de nouveaux  
polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Bien qu'appartenant à  
30 la famille des récepteurs qui interagissent avec des protéines G, ces nouveaux  
polypeptides diffèrent des récepteurs sérotoninergiques déjà décrits (5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub>,  
5HT<sub>3</sub> et 5HT<sub>4</sub>) du point de vue structural comme du point de vue pharmacologique.  
Plus particulièrement, l'invention résulte de l'isolement et de la caractérisation de ces

nouveaux polypeptides, désignés 5HT6, ainsi que du matériel génétique permettant leur expression ou leur identification.

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

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique SEQ ID n° 1. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un  
10 ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) ligand(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques. Parmi les dérivés  
15 résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues au polypeptide SEQ ID n° 1, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De tels polypeptides  
20 homologues peuvent être obtenus par des expériences d'hybridation comme décrit dans les exemples (Cf SEQ ID n° 4).

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

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

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessous, par synthèse

chimique, sur la base des séquences SEQ ID n° 1 ou 4 en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

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

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

(a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire,

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

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

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

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

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

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

L'inhibition de l'expression de certains gènes par des oligonucléotides  
20 antisens s'est avérée être une stratégie prometteuse dans le contrôle de l'activité d'un gène. Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaire du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les oligonucléotides antisens capables d'inhiber au moins  
25 partiellement la production de polypeptides 5HT6 tels que définis précédemment. De tels oligonucléotides peuvent être constitués par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides de l'invention. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus à partir de la séquence SEQ ID n° 1 ou  
30 4, par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour des polypeptides 5HT6 de

l'invention, ou avec les ARNm correspondant. De telles sondes peuvent être utilisées *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT6, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Compte tenu des

5 activités multiples de la sérotonine, les sondes de l'invention peuvent ainsi permettre d'identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT6. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT6 tels que définis précédemment, à partir d'autres sources

10 cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 bases, et elles peuvent comporter jusqu'à l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou 4 ou de leur brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont, préalablement à leur utilisation, marquées. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier

15 peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc). Les conditions d'hybridation dans lesquelles ces sondes peuvent être utilisées sont indiquées dans les techniques générales de clonage ci-après ainsi que dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées capables d'exprimer à leur surface un polypeptide 5HT6 tel que défini ci-avant. Ces cellules

20 peuvent être obtenues par introduction d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus codant pour un polypeptide de l'invention, puis culture desdites cellules dans des conditions d'expression de ladite séquence.

Les cellules recombinées selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on

25 peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma*

30 ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées pour mesurer la capacité de différentes molécules à se comporter comme ligand ou comme modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention. Plus particulièrement, elles peuvent ainsi être utilisées dans un procédé de mise en évidence et d'isolement de

ligands ou de modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention, et, plus préférentiellement, d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine.

Un autre objet de l'invention concerne donc un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides 5HT<sub>6</sub> de l'invention, selon lequel on

5 réalise les étapes suivantes :

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

10 molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

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

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine pour les polypeptides 5HT<sub>6</sub>.

15 Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides 5HT<sub>6</sub> de l'invention, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que

20 décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de l'invention et le 5HT, et,

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

25 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs peuvent en effet permettre de traiter certaines affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT<sub>6</sub>.

30 L'invention concerne également tout médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide 5HT<sub>6</sub> de l'invention. Préférentiellement la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé décrit précédemment.

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

#### Légende des figures

SEQ ID n° 1 : Séquences nucléotidique et peptidique du récepteur 5HT6 murin.

5 L'ADNc de 1558 pb a été séquencé sur les 2 brins depuis le site EcoRI jusqu'au site XhoI. Les 92 premiers nucléotides ne sont pas représentés.

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

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

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

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

25 Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre d'expériences indépendantes réalisées, chaque point étant réalisé en triple.

### Techniques générales de clonage

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1. Isolement du récepteur 5HT6

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

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

## 2. Etude d'homologies de séquence

La séquence du récepteur 5HT<sub>6</sub> isolé ci-dessus a été comparée avec les séquences des récepteurs couplés à des protéines G suivants : S31, 5HT<sub>1B</sub> $\beta$ , 5HT<sub>1D</sub> $\alpha$ , 5HT<sub>1A</sub>, 5HT-dro2A, 5HT-dro1, 5HT<sub>1C</sub> et 5HT<sub>2</sub>. Ces expériences ont  
5 révélé une certaine homologie dans le domaine transmembranaire potentiel et dans les boucles de connection, mais pas dans les régions terminales ni dans la troisième  
boucle cytoplasmique. La figure 2 donne les % d'homologie au niveau des régions conservées.

Comme il ressort de cette figure, l'homologie, au niveau des régions  
10 conservées, avec les récepteurs connus est faible, le meilleur résultat étant obtenu avec les récepteurs sérotoninergiques 5HT<sub>1B</sub> $\beta$  et 5HT<sub>1D</sub> $\alpha$  (54 % d'homologie), et avec le récepteur S31 qui n'est pas encore caractérisé.

## 3. Expression transitoire du récepteur 5HT<sub>6</sub> dans les cellules Cos-7 et caractérisation pharmacologique

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 5. Recherche de séquences homologues dans d'autres tissus

La séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 a ensuite été utilisée pour la mise en évidence de séquences homologues à partir d'autres tissus. Pour cela, deux techniques ont été utilisées :

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

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

##### 5.1. Recherche par PCR

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

Sonde (i) : SEQ ID n° 2

Sonde (ii) : SEQ ID n° 3

La sonde (i) correspond à la position 1174 sur la SEQ ID n° 1 et la sonde (ii) à la position 1394.

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

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

#### 5.2. Recherche par hybridation *in situ*

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

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

#### 6. Isolement du récepteur humain

15 Selon la méthodologie décrite en 5. ci-dessus, le récepteur 5HT6  
humain a été cloné.

Pour cela, une banque d'ADN génomique humain a été préparée à partir de  
placenta, par digestion partielle par l'enzyme Mbo1, séparation sur gradients de sels, et  
sous clonage dans le vecteur Lamda GEM 12 linéarisé par BamHI (bactérie hôte:TAP  
20 90).

La banque ainsi obtenue a ensuite été criblée en utilisant comme sonde le  
fragment EcoRI-XhoI de 1,6 kb décrit dans l'exemple 3., marqué selon la technique de  
random priming. Les fragments de DNA qui hybrident avec cette sonde ont été isolés,  
sous clonés dans un plasmide Bluescript, amplifiés, puis séquencés dans les deux sens  
25 selon la technique dideoxynucleotide. L'amplification a été réalisée par la technique  
PCR : 20 cycles en présence de *Thermus aquaticus* polymerase(2,5 unités; Cetus) et  
d'oligonucléotides 1 (SEQ ID n° 5) et 2 (SEQ ID n° 6). Le fragment obtenu a été  
digeré par les enzymes BamHI et XhoI, puis sous clonés dans un vecteur d'expression  
P513.

30 La séquence obtenue est présentée sur la séquence SEQ ID n° 4.

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

5 biologie moléculaire.

## LISTE DE SEQUENCES

- (1) INFORMATION GENERALE:
- 5 (i) DEPOSANT:
- (A) NOM: INSERM  
 (B) RUE: 101, rue de Tolbiac  
 (C) VILLE: PARIS  
 10 (E) PAYS: France  
 (F) CODE POSTAL: 75654
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveaux polypeptides ayant une activite de recepteur serotoninergique, acides nucleiques codant pour ces polypeptides et utilisations.  
 15
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6
- (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:  
 20 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)
- 25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 30 (A) LONGUEUR: 1557 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucleique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
 (D) CONFIGURATION: lineaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
 35
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:  
 40 (A) ORGANISME: Souris
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:  
 45 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 310..1410  
 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Gene recepteur 5HT6 souris"
- 50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- GTCGGCCTCG AGTGGACTGG CGTCTGGAAC CCGCCCTAGA GCTGCGCCCC AAGCTGCAGC 60
- GCGCATTTCAG CTCGCCACCC AAGAGGCAGC CGGGACGCGC TGTGTGCGCC AGAGAACGAC 120
- 55 CGCGGCGGGC TAGGGACCAG AGCCCCTTAG CTTGCTCTG GGAAGCTGA GTTGAGATGG 180
- CATTGAACTG TGAATGGCTG ACTAATTTCT CACCAGATCA GGAGGTGAAG TGAGAATGAA 240
- 60 GACCAACAGT TGAGCCTGCC ACACCACGGT ATTCATTTCT TCAACTATAT TAACATTTTA 300
- ACAAAAAAA ATG GAT TTT TTA AAC GCA TCA GAC CAA AAC TTG ACC TCT 348  
 Met Asp Phe Leu Asn Ala Ser Asp Gln Asn Leu Thr Ser



	Pro	Ser	Thr	Asp	Phe	Asp	Arg	Ile	His	Ser	Thr	Val	Lys	Ser	Pro	Arg	
		255					260					265					
5	TCG	GAA	CTG	AAG	CAT	GAG	AAA	TCT	TGG	AGA	AGA	CAG	AAA	ATC	TCA	GGC	1164
	Ser	Glu	Leu	Lys	His	Glu	Lys	Ser	Trp	Arg	Arg	Gln	Lys	Ile	Ser	Gly	
	270					275				280					285		
10	ACC	AGA	GAA	CGC	AAA	GCA	GCC	ACT	ACC	CTG	GGA	TTG	ATC	TTG	GGT	GCA	1212
	Thr	Arg	Glu	Arg	Lys	Ala	Ala	Thr	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Leu	Gly	Ala	
					290					295					300		
15	TTT	GTA	ATA	TGT	TGG	CTG	CCC	TTT	TTT	GTA	AAA	GAA	TTG	GTT	GTT	AAT	1260
	Phe	Val	Ile	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Val	Asn	
				305				310						315			
	GTC	TGT	GAA	AAA	TGT	AAA	ATT	TCT	GAA	GAA	ATG	TCA	AAC	TTT	TTG	GCA	1308
	Val	Cys	Glu	Lys	Cys	Lys	Ile	Ser	Glu	Glu	Met	Ser	Asn	Phe	Leu	Ala	
			320				325					330					
20	TGG	CTT	GGT	TAC	CTG	AAT	TCC	CTT	ATA	AAT	CCA	CTG	ATT	TAT	ACC	ATC	1356
	Trp	Leu	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Leu	Ile	Asn	Pro	Leu	Ile	Tyr	Thr	Ile	
		335				340					345						
25	TTT	AAT	GAA	GAC	TTC	AAG	AAA	GCT	TTC	CAA	AAA	CTT	GTA	CGA	TGC	CGA	1404
	Phe	Asn	Glu	Asp	Phe	Lys	Lys	Ala	Phe	Gln	Lys	Leu	Val	Arg	Cys	Arg	
	350					355				360					365		
30	TAT	TAGGATAAAA	GAAACCTAAT	TTTAAAGTGC	GGAGGCTTTA	TTTGTGGGG	1457										
	Tyr																
35	GGAGGGGCAG	GGATAATTAA	ATGAATGTAA	AGTAAGAAAA	CATTTAAATT	TTTAGAGAAA	1517										
	ATATATTAAA	ACTGCTAAAA	TTAAAAAAA	AAAAAAA	1557												

2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Sonde (i)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AAGAATTGGT TGTTAATGTC

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:  
 5 (A) ORGANISME: Sonde (ii)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TACATTCATT TAATTATCC

19

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 15 (A) LONGUEUR: 1101 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

25 (vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:  
 30 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMLACEMENT: 1..1101  
 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Gene recepteur 5HT6  
 humain"

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

40	ATG GAT TTC TTA AAT TCA TCT GAT CAA AAC TTG ACC TCA GAG GAA CTG Met Asp Phe Leu Asn Ser Ser Asp Gln Asn Leu Thr Ser Glu Glu Leu 1 5 10 15	48
45	TTA AAC AGA ATG CCA TCC AAA ATT CTG GTG TCC CTC ACT CTG TCT GGG Leu Asn Arg Met Pro Ser Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Leu Ser Gly 20 25 30	96
50	CTG GCA CTG ATG ACA ACA ACT ATC AAC TCC CTT GTG ATC GCT GCA ATT Leu Ala Leu Met Thr Thr Thr Ile Asn Ser Leu Val Ile Ala Ala Ile 35 40 45	144
55	ATT GTG ACC CGG AAG CTG CAC CAT CCA GCC AAT TAT TTA ATT TGT TCC Ile Val Thr Arg Lys Leu His His Pro Ala Asn Tyr Leu Ile Cys Ser 50 55 60	192
60	CTT GCA GTC ACA GAT TTT CTT GTG GCT GTC CTG GTG ATG CCC TTC AGC Leu Ala Val Thr Asp Phe Leu Val Ala Val Leu Val Met Pro Phe Ser 65 70 75 80	240
60	ATT GTG TAT ATT GTG AGA GAG AGC TGG ATT ATG GGG CAA GTG GTC TGT Ile Val Tyr Ile Val Arg Glu Ser Trp Ile Met Gly Gln Val Val Cys 85 90 95	288

	GAC	ATT	TGG	CTG	AGT	GTT	GAC	ATT	ACC	TGC	TGC	ACG	TGC	TCC	ATC	TTG	336
	Asp	Ile	Trp	Leu	Ser	Val	Asp	Ile	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Ser	Ile	Leu	
				100					105					110			
5	CAT	CTC	TCA	GCT	ATA	GCT	TTG	GAT	CGG	TAT	CGA	GCA	ATC	ACA	GAT	GCT	384
	His	Leu	Ser	Ala	Ile	Ala	Leu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Ile	Thr	Asp	Ala	
			115					120					125				
10	GTT	GAG	TAT	GCC	AGG	AAA	AGG	ACT	CCA	AAG	CAT	GCT	GGC	ATT	ATG	ATT	432
	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Lys	Arg	Thr	Pro	Lys	His	Ala	Gly	Ile	Met	Ile	
		130					135					140					
15	ACA	ATA	GTT	TGG	ATT	ATA	TCT	GTT	TTT	ATC	TCT	ATG	CCT	CCT	CTA	TTC	480
	Thr	Ile	Val	Trp	Ile	Ile	Ser	Val	Phe	Ile	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Phe	
	145					150					155					160	
20	TGG	AGG	CAC	CAA	GGA	ACT	AGC	AGA	GAT	GAT	GAA	TGC	ATC	ATC	AAG	CAC	528
	Trp	Arg	His	Gln	Gly	Thr	Ser	Arg	Asp	Asp	Glu	Cys	Ile	Ile	Lys	His	
				165					170						175		
25	GAC	CAC	ATT	GTT	TCC	ACC	ATT	TAC	TCA	ACA	TTT	GGA	GCT	TTC	TAC	ATC	576
	Asp	His	Ile	Val	Ser	Thr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Phe	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ile	
				180					185					190			
30	CCA	CTG	GCA	TTG	ATT	TTG	ATC	CTT	TAC	TAC	AAA	ATA	TAT	AGA	GCA	GCA	624
	Pro	Leu	Ala	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ala	
			195					200					205				
35	AAG	ACA	TTA	TAC	CAC	AAG	AGA	CAA	GCA	AGT	AGG	ATT	GCA	AAG	GAG	GAG	672
	Lys	Thr	Leu	Tyr	His	Lys	Arg	Gln	Ala	Ser	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Glu	
		210					215					220					
40	GTG	AAT	GGC	CAA	GTC	CTT	TTG	GAG	AGT	GGT	GAG	AAA	AGC	ACT	AAA	TCA	720
	Val	Asn	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu	Lys	Ser	Thr	Lys	Ser	
	225					230					235				240		
45	GTT	TCC	ACA	TCC	TAT	GTA	CTA	GAA	AAG	TCT	TTA	TCT	GAC	CCA	TCA	ACA	768
	Val	Ser	Thr	Ser	Tyr	Val	Leu	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	Asp	Pro	Ser	Thr	
				245						250					255		
50	GAC	TTT	GAT	AAA	ATT	CAT	AGC	ACA	GTG	AGA	AGT	CTC	AGG	TCT	GAA	TTC	816
	Asp	Phe	Asp	Lys	Ile	His	Ser	Thr	Val	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Phe	
				260					265					270			
55	AAG	CAT	GAG	AAA	TCT	TGG	AGA	AGG	CAA	AAG	ATC	TCA	GGT	ACA	AGA	GAA	864
	Lys	His	Glu	Lys	Ser	Trp	Arg	Arg	Gln	Lys	Ile	Ser	Gly	Thr	Arg	Glu	
			275					280					285				
60	CGG	AAA	GCA	GCC	ACT	ACC	CTG	GGA	TTA	ATC	TTG	GGT	GCA	TTT	GTA	ATA	912
	Arg	Lys	Ala	Ala	Thr	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Ile	
		290					295					300					
65	TGT	TGG	CTT	CCT	TTT	TTT	GTA	AAA	GAA	TTA	GTT	GTT	AAT	GTC	TGT	GAC	960
	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Val	Asn	Val	Cys	Asp	
	305					310					315				320		
70	AAA	TGT	AAA	ATT	TCT	GAA	GAA	ATG	TCC	AAT	TTT	TTG	GCA	TGG	CTT	GGG	1008
	Lys	Cys	Lys	Ile	Ser	Glu	Glu	Met	Ser	Asn	Phe	Leu	Ala	Trp	Leu	Gly	
				325					330						335		
75	TAT	CTC	AAT	TCC	CTT	ATA	AAT	CCA	CTG	ATT	TAC	ACA	ATC	TTT	AAT	GAA	1056
	Tyr	Leu	Asn	Ser	Leu	Ile	Asn	Pro	Leu	Ile	Tyr	Thr	Ile	Phe	Asn	Glu	
				340					345					350			



TABLE 1

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

REVENDICATIONS

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

10. Oligonucléotide antisens capable d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.
11. Oligonucléotide selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il est constitué par tout ou partie d'une séquence nucléotidique selon la revendication 7.
- 5 12. Sonde nucléotidique capable de s'hydrider avec une séquence selon la revendication 6 ou avec l'ARNm correspondant.
- 13 Sonde selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 bases.
14. Sonde selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comporte  
10 l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.
15. Sonde selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences SEQ ID n° 2 et 3.
16. Utilisation d'une sonde selon l'une des revendications 12 à 15 pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT6; ou pour la mise en  
15 évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc); ou pour identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT6; ou encore pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT6.
- 20 17. Cellule recombinée capable d'exprimer à sa surface un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.
18. Cellule selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules eucaryotes ou procaryotes.
19. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des  
25 polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :
- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 17 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les

revendications 1 à 5 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5HT6 souris    S31    5HT1B $\beta$  souris    5HT1D $\alpha$  humain    5HT1A rat    5HT-dro2A    5HT-dro1    5HT1C rat    5HT2 rat

FIGURE 2

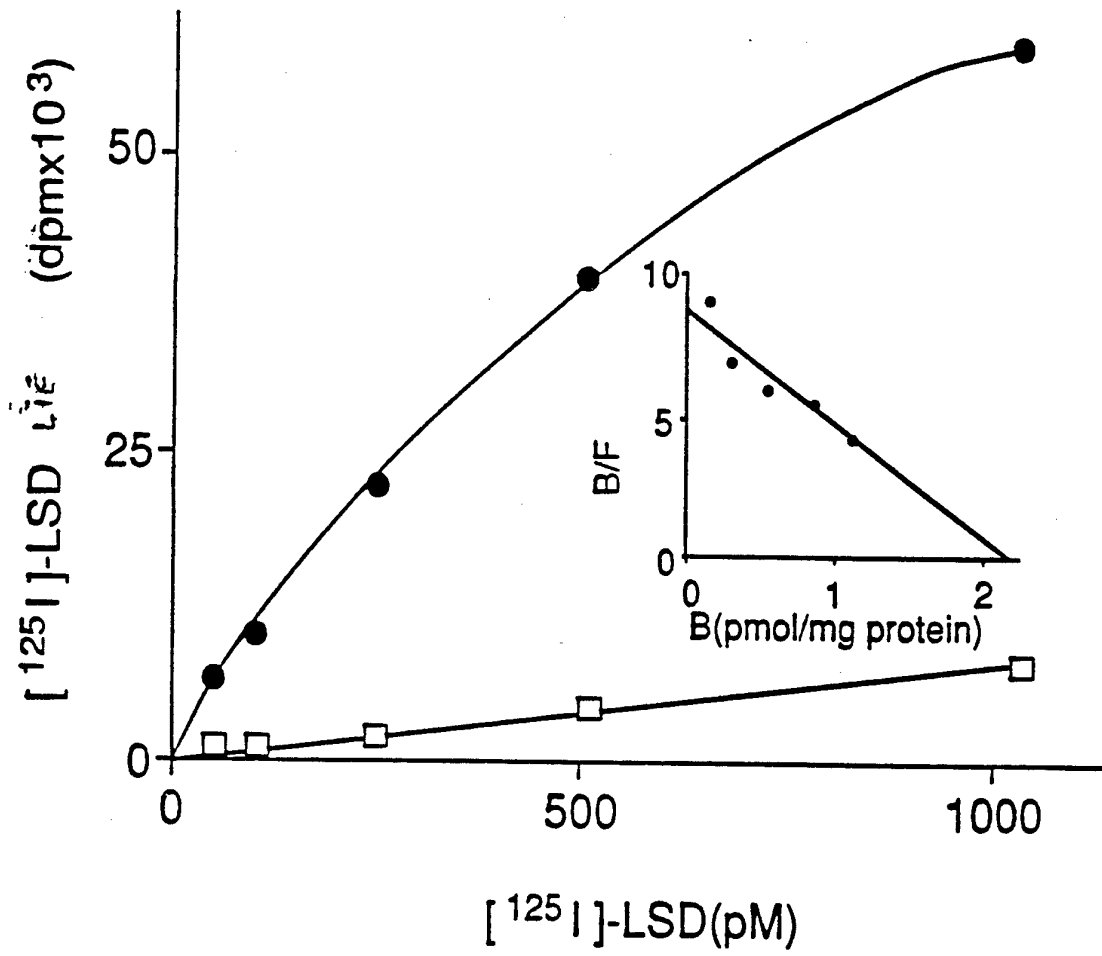


FIGURE 3

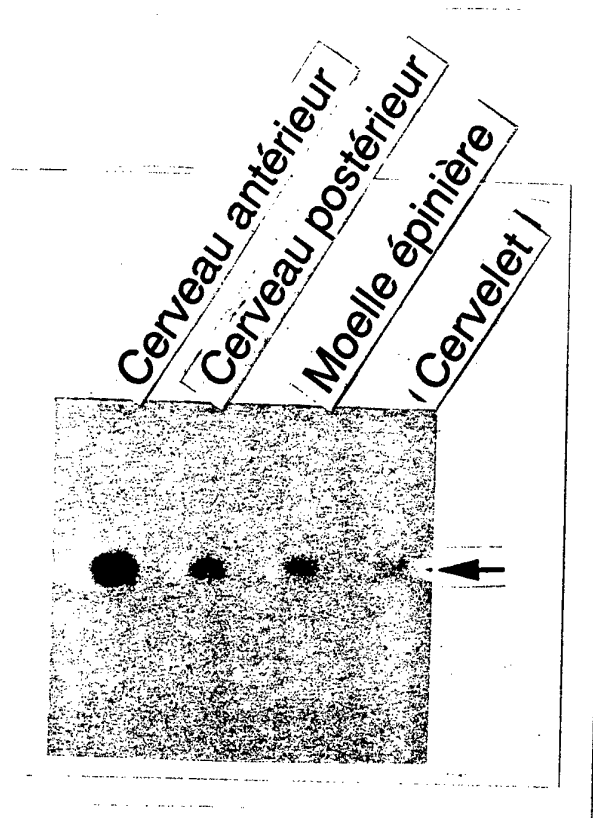


FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/FR 93/00651

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl.<sup>5</sup> C12N15/12; C07K13/00; C07H21/00; C12Q1/68; G01N33/50; A61K31/00  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>5</sup> C12N; C07K; G01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,9117174 (NEUROGENETIC CORP) 14 November 1991  *claims; figure 3 *	1-3,6,7, 9-13, 17-25
X	PROCEEDINGS FO THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA Vol.89, No.12, 15 June 1992, WASHINGTON US pages 5517-5521 McAllister G; Charlesworth A; Snodin c; Beer MS; Noble AJ; Middlemiss DN; Iversen LL;Whiting P; "Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype." see the whole document	1-3,6,7, 9-13, 17-25         ./...

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 September 1993 (17.09.93)	Date of mailing of the international search report 23 September 1993 (23.09.93)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00651

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,4041464 (BASF AG) 25 June 1992  see the whole document	1-3,6,7, 9-13, 7-25
X	EMBO JOURNAL. Vol.10, No.13, 1991, EYNSHAM, OXFORD GB pages 4017 - 4023, VOIGT, M.M. ET AL.; "Molecular cloning and characteriza- tion of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine 1B receptor" see the whole document	1,3,6,7, 9-13, 17-25
X	FEBS LETTERS. Vol.296, No. 2, 20 January 1992, AMSTERDAM NL pages 201 - 206 LEVY FO; GUDERMANN T; BIRNBAUMER M ; KAUMANN AJ; BIRNBAUMER L "Molecular cloning of a human gene (S31) encoding a novel serotonin receptor mediating inhibition of adenylyl cyclase." see the whole document	1-3,6,7, 9-13, 17-25
P,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol.267, No. 28, 5 October 1992, BALTIMORE US pages 19761 - 19764 Amlaiky N., Ramboz S., Boschert U., Plassat J.L., Hen R.; "Isolation of a mouse "5HT1E-like" serotonin receptor expressed predominantly in hippo- campus." see the whole document	1-25
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Vol. 90, March 1993, WASHINGTON US pages 2184 - 2188 Lovenberg T.W., Erlander M.G., Baron B.M., Racke M., Slone A.L., Siegel B.W., Craft C.M., Burns J.E., Danielson P.E., Sutcliffe G. "Molecular cloning and functional expression of 5-HT1E-like rat and human 5-hydroxytryptamine receptor genes" see the whole document	1-25

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300651  
SA 75839

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 17/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9117174	14-11-91	US-A- 5155218	13-10-92
		AU-A- 7879891	27-11-91
		EP-A- 0530265	10-03-93
-----	-----	-----	-----
DE-A-4041464	25-06-92	WO-A- 9211362	09-07-92
-----	-----	-----	-----

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00651

Demande internationale No

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/12; G01N33/50;	C07K13/00; A61K31/00	
C07H21/00; C12Q1/68		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K ; G01N ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	WO,A,9 117 174 (NEUROGENETIC CORP) 14 Novembre 1991  * Revendications, figure 3 * ---	1-3,6,7, 9-13, 17-25
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89, no. 12, 15 Juin 1992, WASHINGTON US pages 5517 - 5521 McAllister G;Charlesworth A;Snodin C;Beer MS;Noble AJ;Middlemiss DN;Iversen LL;Whiting P; 'Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype.' voir le document en entier ---  -/--	1-3,6,7, 9-13, 17-25
<sup>o</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup> "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 SEPTEMBRE 1993		23. 09. 93
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		S.A. NAUCHE

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	DE,A,4 041 464 (BASF AG) 25 Juin 1992  voir le document en entier ---	1-3,6,7, 9-13, 7-25
X	EMBO JOURNAL. vol. 10, no. 13, 1991, EYNHAM, OXFORD GB pages 4017 - 4023 VOIGT, M.M. ET AL.; 'Molecular cloning and characterization of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine1B receptor' voir le document en entier ---	1,3,6,7, 9-13, 17-25
X	FEBS LETTERS. vol. 296, no. 2, 20 Janvier 1992, AMSTERDAM NL pages 201 - 206 LEVY FO;GUDERMANN T;BIRNBAUMER M;KAUMANN AJ;BIRNBAUMER L 'Molecular cloning of a human gene (S31) encoding a novel serotonin receptor mediating inhibition of adenylyl cyclase.' voir le document en entier ---	1-3,6,7, 9-13, 17-25
P,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 267, no. 28, 5 Octobre 1992, BALTIMORE US pages 19761 - 19764 Amlaiky N., Ramboz S., Boschert U., Plassat J.L., Hen R.; 'Isolation of a mouse '5HT1E-like' serotonin receptor expressed predominantly in hippocampus.' voir le document en entier ---	1-25
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 90, Mars 1993, WASHINGTON US pages 2184 - 2188 Lovenberg T.W., Erlander M.G., Baron B.M., Racke M., Slone A.L., Siegel B.W., Craft C.M., Burns J.E., Danielson P.E., Sutcliffe G. 'Molecular cloning and functional expression of 5-HT1E-like rat and human 5-hydroxytryptamine receptor genes' voir le document en entier -----	1-25

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300651  
SA 75839

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

17/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9117174	14-11-91	US-A- 5155218	13-10-92
		AU-A- 7879891	27-11-91
		EP-A- 0530265	10-03-93
-----	-----	-----	-----
DE-A-4041464	25-06-92	WO-A- 9211362	09-07-92
-----	-----	-----	-----

EPO FORM P0472