



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 229**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02719843 .1**

86 Fecha de presentación : **15.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1364026**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54

Título: **Receptor acoplado a la proteína G humana.**

30

Prioridad: **20.02.2001 US 269410 P**
19.09.2001 US 323809 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73

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

72

Inventor/es: **Smolyar, Alex**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Receptor acoplado a la proteína G humana.

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de, e incorpora por referencia, (en tramitación con la presente, la solicitud provisional N° de serie 60/274.233 presentada el 9 marzo de 2001).

Campo técnico de la invención

10 La invención se refiere al área de los receptores acoplados a la proteína G humana. Más particularmente, se refiere al área del receptor acoplado a la proteína G humana y su regulación.

Antecedentes de la invención

15 *Receptores acoplados a la proteína G*

Muchos procesos biológicos médicamente significativos están mediados por rutas de transducción de señal que implican a las proteínas G (Lefkowitz, Nature 351, 353-354, 1991). La familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) incluye receptores para hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, y virus. Los ejemplos espe-
20 cíficos de los GPCR incluyen los receptores de para tales ejemplos diversos como calcitonina, hormonas adrenérgicas, endotelina, AMPc, adenosina, acetilcolina, serotonina, dopamina, histamina, trombina, quinina, hormona estimulante de folículos, opsinas, gen 1 de diferenciación endotelial, rodopsinas, odorantes, citomegalovirus, las propias proteínas G, proteínas efectoras tales como fosfolipasa C, adenil ciclasa, y fosfodiesterasa, y proteínas actuadoras tales como proteína quinasa A y proteína quinasa C.

25 La superfamilia de la proteína GPCR contiene ahora por encima de 250 tipos de paralogos, receptores que representan variantes generadas por duplicaciones de genes (u otros procesos), como opuestos a ortólogos, el mismo receptor de diferentes especies. La superfamilia se puede descomponer en cinco familias: la familia I, receptores tipificados por rodopsina y actualmente representada por encima de 200 únicos miembros (revisión por Dohlman *et al.*,
30 Ann. Rev. Biochem. 60, 653-88, 1991, y las referencias en dicho documento); la familia II, la familia recientemente caracterizada hormona paratiroides/calcitonina/receptor de secretina (Juppner *et al.*, Science 254, 1024-26, 1991; Lin *et al.*, Science 254, 1022-24, 1991); la familia III, la familia del receptor de glutamato metabotrópico en mamíferos (Nakanishi, Science 258, 597-603, 1992); la familia IV, la familia del receptor de AMPc, importante En la quimiotaxis y desarrollo de D. discoideum (Klein *et al.*, Science 241, 1467-72, 1988; y la familia V, los receptores de feromonas
35 de emparejamiento fúngico tal como STE2 (revisión por Kurjan, Ann. Rev. Biochem. 61, 1097-1129, 1992).

El documento WO 00/64942 describe el receptor AXOR-27 acoplado a la proteína g que tiene similitud estructural con el receptor de serotonina 5-HT6 y los procedimientos para el aislamiento de agonistas y/o antagonistas a ellos.

40 Los GPCR poseen siete dominios de extensión sobre la membrana conservados que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. Los GPCRs (también conocidos como receptores 7TM) se han caracterizado por incluir estos siete tramos hidrófobos conservados de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos, que conectan al menos bucles hidrófilos divergentes. La mayoría de GPCR tienen restos de cisteína conservados individuales en cada uno de los primeros bucles extracelulares, que forman enlaces disulfuro que se cree que estabilizan la estructura de la proteína
45 funcional. Las siete regiones transmembrana se designan como TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, y TM7. TM3 ha estado implicado en la transducción de señal.

La fosforilación y lipidación (palmitilación o farnesilación) de restos de cisteína pueden influenciar la señal de transducción de algunos GPCR. La mayoría de los GPCR contienen sitios de fosforilación potenciales dentro del
50 tercer bucle citoplásmico y/o el extremo carboxi. Para varios GPCR, la fosforilación por la proteína quinasa A y/o quinasas receptoras específicas media la desensibilización del receptor.

Para algunos receptores, los sitios de unión de ligandos de los GPCR se cree que comprenden huecos hidrófilos formados por varios dominios de transmembrana de GPCR. Los grupos hidrófilos están rodeados de restos hidrófilos de los GPCR. El lado hidrófilo de cada hélice de transmembrana de GPCR se postula que está orientado hacia el interior y forma un sitio de unión de ligando polar. TM3 ha estado implicado en varios GPCR por tener un sitio de unión de ligando, tal como el resto aspartato de TM3 aspartato. Las serinas de TM5, una asparagina de TM6, y fenilalaninas o tirosinas de TM6 o TM7 están también implicadas en unión de ligando.

60 Los GPCR están acoplados en el interior de la célula por proteínas G heterotriméricas a varias enzimas intracelulares, canales de ion, y transportadores (véase Johnson *et al.*, Endoc. Rev. 10, 317-331, 1989). Diferentes subunidades alfa de proteína G estimulan preferentemente efectores particulares para modular diversas funciones biológicas en una célula. La fosforilación de restos citoplásmicos de los GPCR es un mecanismo importante para la regulación de algunos GPCR. Por ejemplo, en una forma de transducción de señal, el efecto de la unión de hormonas es la activación dentro de la célula de la enzima, adenilato ciclasa. La activación de la enzima por las hormonas depende de la presencia del nucleótido GTP. GTP también influye en la unión de la hormona. Una proteína G conecta el receptor de la hormona a la adenilato ciclasa. La proteína G cambia GTP por GDP unido cuando se active por un receptor de hormona. La forma que lleva GTP después se une a la adenilato ciclasa activada. La hidrólisis de GTP a GDP, catalizar

por la propia proteína G, hace que la proteína g regrese a su forma basal, inactiva. De este modo, la proteína G hace un papel dual, como un intermedio que transmite la señal del receptor al efector, y como un reloj que controla la duración de la señal.

Durante los pasados 15 años, aproximadamente 350 agentes terapéuticos que dirigen los receptores de GPCR se han presentado con éxito en el mercado. Esto indica que estos receptores tienen una historia establecida, probada como dianas terapéuticas. Claramente, existe una necesidad progresiva para la identificación y caracterización de GPCR adicionales que pueden jugar un papel en la prevención, mejora, o disfunciones o enfermedades correspondientes que incluyen, pero no se limitan a, infecciones tales como infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias, y virales, particularmente las provocadas por virus de VIH, dolor, cánceres, anorexia, bulimia, asma, enfermedades de Parkinson, insuficiencia cardíaca aguda, hipotensión, hipertensión, retención urinaria, osteoporosis, angina de pecho, infarto de miocardio, úlceras, asma, alergias, hipertrofia prostática benigna, y trastornos psicóticos y neurológicos, incluyendo ansiedad, esquizofrenia, depresión maníaca, delirio, demencia, retraso mental severo, y discinesias, tales como enfermedad de Huntington y síndrome de Tourett.

Debido a los diversos efectos biológicos, existe la necesidad en la técnica de identificar GPCR adicionales cuya actividad se puede regular para proporcionar efectos terapéuticos.

Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar reactivos y procedimientos de regulación de un GPCR humano. Éste y otros objetos de la invención se proporcionan por uno o más de las realizaciones descritas a continuación. En el presente documento se describe un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado entre el grupo constituido por:

Las secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 50% idénticas a

La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2 y;

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;

Todavía otra realización de la invención es un procedimiento de selección de agentes que disminuyen la degradación de la matriz nuclear. Un compuesto de ensayo se pone en contacto con un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

Las secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 50% idénticas a

La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2 y;

La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2;

La unión entre el compuesto de ensayo y el polipéptido del receptor acoplado a la proteína G se detecta. Un compuesto de ensayo que se une al polipéptido del receptor acoplado a la proteína G se identifica por lo tanto como un agente potencial para la disminución de la degradación de la matriz extracelular. El agente puede actuar mediante la disminución de la actividad del receptor acoplado a la proteína G.

Otra realización de la invención es un procedimiento de selección de agentes que disminuyen la degradación de la matriz extracelular. Un compuesto de ensayo se pone en contacto con un polinucleótido que codifica un polinucleótido del receptor acoplado a la proteína G, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionado entre el grupo constituido por:

Las secuencias de nucleótidos que son al menos un 50% idénticas a

La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y;

La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

Se detecta a unión del compuesto de ensayo al polinucleótido. Un compuesto de ensayo que se une al polinucleótido se identifica como un agente potencial para la disminución de la degradación de la matriz extracelular. El agente puede actuar mediante la disminución de la cantidad del receptor acoplado a la proteína G mediante la interacción el ARNm del receptor acoplado a la proteína G.

Otra realización de la invención es un procedimiento de selección de agentes que regulan la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por.

ES 2 305 229 T3

Las secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 50% idénticas a

La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2 y;

5 La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2;

10 Se detecta una actividad del receptor acoplado a la proteína G del polipéptido. Un compuesto de ensayo que incrementa la actividad del receptor acoplado a la proteína G del polipéptido con relación a la actividad del receptor acoplado a la proteína G en la ausencia del compuesto de ensayo se identifica por lo tanto como un agente potencial para incrementar la degradación de la matriz extracelular. Un compuesto de ensayo que disminuye la actividad del receptor acoplado a la proteína G del polipéptido con relación a la actividad del receptor acoplado a la proteína G en la ausencia del compuesto de ensayo se identifica por lo tanto como un agente potencial para la disminución de la degradación de la matriz extracelular.

15 Incluso otra realización de la invención es un procedimiento de selección de agentes que disminuyen la degradación de la matriz extracelular. Un compuesto de ensayo se pone en contacto con un receptor acoplado a la proteína G de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

20 Las secuencias de nucleótidos que son al menos un 50% idénticas a

La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y;

25 La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

30 Se detecta la unión del compuesto de ensayo al receptor acoplado a la proteína G. Un compuesto de ensayo que se une al receptor acoplado a la proteína G se identifica por lo tanto como un agente potencial para la disminución de la degradación de la matriz extracelular.

35 Todavía otra realización de la invención es un procedimiento de reducción de la degradación de la matriz extracelular. Una célula se pone en contacto con un reactivo que se une de manera específica al polinucleótido que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G o al producto codificado por el polinucleótido, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

40 Las secuencias de nucleótidos que son al menos un 50% idénticas a

La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y;

45 La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

Por lo tanto disminuye en la célula la actividad del receptor acoplado a la proteína G.

50 De este modo la invención proporciona un GPCR humano que se puede usar para identificar los compuestos de ensayo que pueden actuar como agonistas o antagonistas en el sitio del receptor. El GPCR humano y los fragmentos del mismo son también útiles en la inducción de anticuerpos específicos que pueden bloquear el receptor y evitar de manera eficaz la unión del ligando.

50 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de ADN que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G (SEQ ID NO: 1).

55 La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN de la Fig. 1 (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 muestra la secuencia de ADN que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G (SEQ ID NO: 3).

60 La Fig. 4 muestra la secuencia de ADN que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G (SEQ ID NO: 4).

La Fig. 5 muestra la secuencia de ADN que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G (SEQ ID NO: 5).

65 La Fig. 6 muestra la secuencia de ADN que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G (SEQ ID NO: 6).

ES 2 305 229 T3

La Fig. 7 muestra la alineación BLASTP de 413 (SEQ ID NO: 2) contra la seq del gen de IY06411IY06411 del homólogo del receptor Humano EDG-7.

La Fig. 8 muestra la alineación HMMPFAM de 413 (SEQ ID NO: 2) contra el receptor transmembrana pfamlhmm17tm_17 (familia rodopsina).

La Fig. 9 muestra el análisis del gen wise.

La Fig. 10 La secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana de GPCR está subrayada, y el patrón de consenso de Prosite se muestra en negrita.

La Fig. 11 muestra el perfil de Expresión profile.

La Fig. 12 muestra el perfil de Expresión profile.

La Fig. 13 muestra el perfil de Expresión profile.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un polinucleótido aislado a partir del grupo constituido por:

a) un polinucleótido que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado entre el grupo constituido por:

Las secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 50% idénticas a

La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2 y;

La secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2;

b) un polinucleótido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;

c) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido especificado en (a) y (b) y codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G;

d) una secuencia de polinucleótidos de la que se desvía a partir de las secuencias de polinucleótidos especificadas en (a) a (c) debido a la degeneración del código genético y codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G; y

e) un polinucleótido que representa un fragmento, derivado o variación alélica de una secuencia de polinucleótidos especificada en (a) a (d) y codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G.

Además, se ha descubierto por el presente solicitante un nuevo GPCR, particularmente un GPCR humano, se puede usar en los procedimientos terapéuticos para tratar COPD, un trastorno cardiovascular, cáncer, un trastorno urinario, obesidad, diabetes, un trastorno del CNS, un trastorno del hígado, un trastorno del riñón, un trastorno de los órganos secretores, asma, una enfermedad metabólica o un trastorno hematológico que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2 se ha identificado. Una secuencia que codifica GPCR humano se muestra en la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia se localiza en el cromosoma 2. La secuencia codificante para la SEQ ID NO: 2 se ensambló para la secuencia genómica identificada con el N° de acceso AC055884 del GenBank, usando geneid y genewise. Las alineaciones se proporcionan en las Figs. 1 y 2.

La SEQ ID NO: 2 contiene siete dominios transmembrana y actúa sobre varios GPCR conocidos con buen valor de e. La SEQ ID NO: 2 es aproximadamente 30% idéntica a varios receptores de EDG, con aproximadamente 25% de identidad a varios receptores de histaminas humanas H2, beta-adrenérgicos y liberadores de tiotropina (TRH). Se infirió estructura de tres dimensiones mediante la homología no probable a partir de los restos 4 a 178 en 1F88-B (rodopsina). El patrón de consenso de Prosite se destaca en la Fig. 4. Los EST relacionados (SEQ ID NOS: 3-6) se expresan en neuroblastoma, células B, leucemia linfática crónica, cerebro, y próstata normal.

El GPCR humano de la invención se puede usar en procedimientos terapéuticos para tratar trastornos tales como COPD, trastornos cardiovasculares, cáncer, trastornos urinarios, obesidad, diabetes, trastornos del CNS, trastornos del hígado, trastornos del riñón, trastornos de los órganos secretores, asma y trastorno hematológicos. El GPCR humano también se puede usar para seleccionar activadores e inhibidores de GPCR humanos.

Polipéptidos

Los polipéptidos de GPCR de acuerdo con la invención comprenden al menos 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, ó 330 aminoácidos contiguos seleccionados entre la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o su variante biológicamente activo, como se describe más adelante. Un polipéptido de GPCR de la invención por lo tanto puede ser una parte de una proteína de GPCR, una proteína de GPCR de longitud completa, o una proteína de fusión que comprende toda o una parte de la proteína de GPCR.

Variantes biológicamente activas

Las variantes del polipéptido de GPCR que son biológicamente activos, es decir, mantienen la capacidad de unirse a un ligando para producir un efecto biológico, tal como la formación de AMP cíclico, movilización de calcio intracelular, o metabolismo de fosfoinosítido, también son polipéptidos de GPCR. Preferiblemente, las variantes de polipéptidos de GPCR de origen natural o no natural tienen secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 50, preferiblemente al menos aproximadamente 55, 65, 70, 75, 90, 96, ó 98% idénticas a la secuencia de aminoácidos secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 o su fragmento. El porcentaje de identidad entre una variante del polipéptido de GPCR supuesto y una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 se determina usando el programa de alineación de Blast2 (Blosum62, Expect 10, códigos genéticos patrones).

Las variaciones en el porcentaje de identidad se pueden deber, por ejemplo, a sustituciones, inserciones, o supresiones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácido se definen como reemplazos de aminoácidos uno por uno. Son de naturaleza conservadora cuando el aminoácido sustituido tiene estructura y/o propiedades químicas similares. Los ejemplos de los reemplazos conservadores son sustitución de una leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o una treonina con una serina.

Las inserciones o supresiones de aminoácidos son cambios a o dentro de una secuencia de aminoácidos. Típicamente caen en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La guía en la determinación de qué restos de aminoácidos pueden estar sustituidos, insertados, o suprimidos sin eliminar la actividad biológica o inmunológica de un polipéptido de GPCR se puede encontrar usando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, tales como el software DNASTAR. Si un cambio de aminoácido da como resultado un polipéptido de GPCR biológicamente activo se puede determinar fácilmente para la unión a un ligando p llevando a cabo un ensayo funcional, como se describe por ejemplo, en los ejemplos específicos, más adelante.

Proteínas de fusión

Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra las secuencias de aminoácidos del polipéptido de GPCR y para uso en diversos sistemas de ensayo. Por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden usar para identificar proteínas que interactúan con partes de un polipéptido de GPCR. Se pueden usar para este propósito ensayos de cromatografía de afinidad de proteína o basados en genotecas para las interacciones proteína-proteína, tales como, los sistemas de dos híbridos de lavadura o despliegue del fago.

Tales procedimientos se conocen bien en la técnica y también se pueden usar como tamices de fármacos.

Una proteína de fusión del polipéptido de GPCR comprende dos segmentos de polipéptidos condensados conjuntamente por medio de un enlace de péptido. El primer segmento de polipéptido comprende al menos 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, ó 330 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2 o un variante biológicamente activo, tales como los descritos anteriormente. El primer segmento del polipéptido también puede comprender la proteína de GPCR de longitud completa.

El segundo segmento del polipéptido puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de proteína. Las proteínas usadas de manera común. En la construcción de proteína de fusión incluyen β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteínas autofluorescentes, incluyendo la proteína fluorescente azul (BFP), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), y cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). De manera adicional, se usan etiquetas de epítipo en las construcciones de las proteínas de fusión, incluyendo etiquetas de histidina (His), etiquetas de FLAG, etiquetas de hemaglutinina (HA) de la gripe, etiquetas de Myc, etiquetas de VSV-G, y etiquetas de tioredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir fusiones de proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta S, Lex un dominio de unión a ADN (DBD), fusiones de unión de unión a ADN de GAL4, y fusiones de proteína BP16 del virus de herpes simples (HSV). Una proteína de fusión también se puede modificar por ingeniería genética para que contenga un sitio de escisión localizado entre la secuencia que codifica el polipéptido de GPCR y la secuencia de proteína heteróloga, de manera que el polipéptido de GPCR también se puede escindir y purificar a partir del resto heterólogo.

Se puede sintetizar una proteína de fusión de manera química, como se muestra en la técnica. Preferiblemente, se produce una proteína de fusión mediante la unión de manera covalente a dos segmentos de polipéptidos o mediante procedimientos convencionales en la técnica de biología molecular. Los procedimientos de ADN recombinante se pueden usar para preparar proteínas de fusión, por ejemplo, preparando una construcción de ADN que comprende

secuencias de codificación seleccionadas entre la SEQ ID NO: 1 en un marco de lectura apropiado con nucleótidos que codifican el segundo segmento de polipéptido y que expresa la construcción de ADN en una célula huésped, como se conoce en la técnica. Están disponibles muchos kits para la construcción de las proteínas de fusión a partir de compañías tales como Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), y Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

Identificación de homólogos de especies

Homólogos de especies de polipéptido de GPCR humano se puede obtener usando polinucleótidos de polipéptido de GPCR (descritos más adelante) para preparar sondas o cebadores adecuados para seleccionar genotecas de expresión de ADNc a partir de otras especies, tales como ratones, monos, o levaduras, que identifican los ADNc que codifican los homólogos de polipéptido de GPCR, y que expresan los ADNc como se conoce en la técnica.

Polinucleótidos

Un polinucleótido de GPCR puede ser de cadena individual o doble y comprende una secuencia de codificación o el complemento de una secuencia de codificación de un polipéptido de GPCR. Una secuencia de codificación de GPCR humano se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Las secuencias de nucleótidos degenerados que codifican los polipéptidos de GPCR humanos, así como las secuencias de nucleótidos homólogos que son al menos 50, preferiblemente aproximadamente 75, 90, 96, o 98% idénticos a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 también son polinucleótidos de GPCR. El porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de dos polinucleótidos se determina usando programas de ordenador tal como ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, usando una investigación de hueco afín con una penalización amplia de hueco de -12 y una penalización de extensión de hueco de -2. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), homólogos de especies, y variantes de polinucleótidos de GPCR que codifican los polipéptidos de GPCR biológicamente activos también son polinucleótidos de GPCR. Los fragmentos de polinucleótidos que comprenden al menos 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, ó 25 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 o su complemento son también polinucleótidos de GPCR. Estos fragmentos se pueden usar, por ejemplo, como sondas de hibridación o como oligonucleótidos no codificantes.

Identificación de variantes y homólogos de polinucleótidos

Las variantes y homólogos de los polinucleótidos de GPCR descritos anteriormente son también polinucleótidos de GPCR. Típicamente, las secuencias de polinucleótidos de GPCR homólogos se pueden identificar mediante la hibridación de polinucleótidos candidatos para conocer los polinucleótidos de GPCR en condiciones rigurosas, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, usando las siguientes condiciones de lavado 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sodio, pH 7,0), 0,1% SDS, temperatura ambiente dos veces, 30 minutos cada una; después 2X SSC, 0,1% SDS, 50°C una vez, 30 minutos; después 2X SSC, temperatura ambiente dos veces, 10 minutos cada secuencia de homólogos se puede identificar que contiene al menos aproximadamente 25-30% de discordancias de pares de bases. Más preferiblemente, las hebras de ácidos nucleicos contienen 15-25% de discordancias de pares de bases, incluso más preferiblemente 5-15% de discordancias de pares de bases.

Los homólogos de especies de los polinucleótidos de GPCR descritos en el presente documento también se pueden identificar preparando sondas o cebadores adecuados y selección de la expresión del ADNc a partir de otras especies, tales como ratones, monos, o levaduras. Las variantes humanas de los polinucleótidos de GPCR se pueden identificar, por ejemplo, mediante la selección de las genotecas de expresión de ADNc humano. Se conoce bien en la técnica que la T_m de un ADN de cadena doble disminuye en 1-1,5°C con una disminución de un 1% cada una de homología (Bonner *et al.*, J. Mol. Biol. 81, 123 (1973)). Las variantes de los polinucleótidos de GPCR humano o polinucleótidos de GPCR de otras especies se pueden identificar por lo tanto mediante hibridación de un polinucleótido de GPCR con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o su complemento para formar un híbrido de ensayo. La temperatura de fusión de del híbrido de ensayo se compara con la temperatura de fusión de un híbrido que comprende polinucleótidos que tienen secuencias perfectamente complementarias, y se calcula el número o porcentaje de las discordancias de pares de bases con el híbrido de ensayo.

Las secuencias de nucleótidos que se hibridan a los polinucleótidos de GPCR o sus complementos después de hibridación rigurosa y/o condiciones de lavado también son polinucleótidos de GPCR. Las condiciones de lavado rigurosas se conocen y se entienden bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., 1989, en las páginas 9.50-9.51.

Típicamente, para las condiciones de hibridación rigurosas una combinación de temperatura y concentraciones de sal se debe elegir que sea aproximadamente 12-20°C por debajo de la T_m calculada de bajo estudio. Se puede calcular la T_m de un híbrido entre un polinucleótido de GPCR que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o su complemento y una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente 50, preferiblemente

ES 2 305 229 T3

aproximadamente 75, 90, 96, o 98% idéntica a las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, usando la ecuación de Bolton y McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} - 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\%G + C) - 0,63(\%\text{formamida}) - 600/l,$$

en la que l = la longitud del híbrido en pares de bases.

Las condiciones de lavado rigurosas incluyen, por ejemplo, 4 X SSC a 65°C, o 50% de formamida, 4X SSC a 42°C, o 0,5X SSC, 0,1% de SDS a 65°C. Las condiciones de lavado altamente rigurosas incluyen, por ejemplo, 0,2 X SSC a 65°C.

Preparación de polinucleótidos

Un polinucleótido de GPCR de origen natural sin otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas, y lípidos. Los polinucleótidos se pueden preparar mediante una célula y aislar usando técnicas de purificación de ácidos nucleicos convencionales, o sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o mediante el uso de un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutinarios y se conocen en la técnica. Cualquiera de tales técnicas para obtener para obtener un polinucleótido se puede usar para obtener polinucleótidos de GPCR aislados. Por ejemplo, enzimas de restricción y sondas se pueden usar para aislar fragmentos de polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos de GPCR. Los polinucleótidos aislados están en las preparaciones que están sin o al menos 70, 80, o 90% sin otras moléculas.

Las moléculas de ADNc de GPCR se pueden preparar con técnicas de biología molecular convencionales, usando ARNm de GPCR como molde. Las moléculas de ADNc de GPCR se pueden por lo tanto replicar usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y descritas en los manuales tales como Sambrook *et al.* (1989). Una técnica de amplificación, tal como PCR, se puede usar para obtener copias adicionales de polinucleótidos de la invención, usando o bien ADN genómico humano o ADNc como molde.

Como alternativa, se puede usar técnicas de química sintética para sintetizar polinucleótidos de GPCR. La degeneración del código genético permite que las secuencias de nucleótidos alternativas a sintetizar que codifican un polipéptido de GPCR que tiene, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o su variante biológicamente activa.

Extensión de polinucleótidos

Se pueden usar diversos procedimientos basados en la PCR para extender las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento para detectar cadena abajo las secuencias tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, la PCR de sitio de restricción usa cebadores universales para recuperar el adyacente a la secuencia desconocida a un locus conocido (Sarkar, PCR Methods Applic. 2, 318-322, 1993). El ADN genómico se amplifica primero en presencia de un cebador para una secuencia de engarce y un cebador específico para la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten después a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador de engarce y otro cebador específico interno al primero. Los productos de cada ronda de la de la PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada usando la transcriptasa inversa.

La PCR inversa también se puede usar para amplificar o extender secuencias usando cebadores divergentes basándose en una región (Triglia *et al.*, Nucleic Acids Res. 16, 8186, 1988). Se pueden diseñar cebadores usando un software comercialmente disponible, tal como el software de análisis de cebador OUGO 4.06 (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), que sean de 22-30 nucleótidos de longitud, que tengan un contenido de GC de 50% o más, y para hibridarse a la secuencia diana a temperaturas aproximadamente 68-72°C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. Después el fragmento se hace circular mediante ligamiento intramolecular y se usa como un molde de PCR.

Otro procedimiento que se puede usar es la PCR de captura, que implica la amplificación de PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en el ADN de cromosoma humano y artificial de levadura (Lagerstrom *et al.*, PCR Methods Applic. 1, 111-119, 1991). En este procedimiento, también se pueden usar digestiones y ligamientos de enzima de restricción múltiples para colocar una secuencia de doble hebra modificada por ingeniería genética en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de la realización de la PCR.

Otro procedimiento que se puede usar para recuperar secuencias desconocidas es el de Parker *et al.*, Nucleic Acids Res. 19, 3055-3060, 1991). De manera adicional, se pueden usar PCR, cebadores jerarquizados, y genotecas de PRO-MOTERFINDER (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) para silenciar el ADN genómico. Este procedimiento evita la necesidad de seleccionar genotecas y es útil en el hallazgo de unión de intrón/exón.

Cuando se seleccionan los ADNc de longitud completas, es preferible usar genotecas que se hayan seleccionado por tamaño para que incluyan ADNc mayores. Son preferibles las genotecas cebadas al azar, ya que contendrá más secuencias que contienen las regiones 5' de los genes. Puede ser especialmente preferible el uso de una genoteca cebada al azar para situaciones en las que un oligo d(T) no produzca un ADNc de longitud completa. Las genotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de las secuencias de en las regiones reguladoras no transcritas de 5'.

Los sistemas de electroforesis capilar comercialmente disponibles se pueden usar para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de la PCR o productos de secuenciación. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros de flujo libre para la separación electroforética, cuatro diferentes tintes fluorescentes (uno para cada nucleótido) que están activados por láser, y detección de las longitudes de onda emitidas por una cámara con dispositivo acoplado de carga. La intensidad de salida/luz se puede convertir en una señal eléctrica usando un software apropiado (por ejemplo GENOTYPER y Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y el procedimiento completo para la carga de muestras a un análisis de ordenador y exposición de datos electrónicos se puede controlar por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para la secuenciación de partes pequeñas de ADN que pudieran estar presentes en cantidades limitadas en una muestra particular.

Obtención de Polipéptidos

Los polipéptidos de GPCR se pueden obtener, por ejemplo, mediante purificación a partir de células humanas, mediante la expresión de polinucleótidos de GPCR, o mediante síntesis química directa.

Purificación de proteínas

Los polipéptidos de GPCR se pueden purificar a partir de cualquier célula humana que expresa el receptor, incluyendo células huésped que se han transfectado con los polinucleótidos de GPCR. Un polipéptido de GPCR purificado se separa a partir de otros compuestos que normalmente están asociados con el polipéptido de GPCR en la célula, tales como ciertas proteínas, carbohidratos, o lípidos, usando los procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión de tamaño, fraccionamiento de sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y electroforesis en gel preparativa.

El polipéptido de GPCR se puede aislar convenientemente en forma de un complejo con una proteína G asociada, como se describe en los ejemplos específicos, más adelante. Una preparación de los polipéptidos de GPCR purificados tiene al menos de un 80% de pureza; preferiblemente, las preparaciones tienen al menos un 90%, 95%, ó 99% de pureza. La pureza de las preparaciones se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS.

Expresión de Polinucleótidos

Para expresar un polinucleótido de GPCR, el polinucleótido se puede insertar en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican polipéptidos de GPCR y elementos de control de la transcripción y traducción apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) y en Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Una diversidad de los sistemas de expresión de vector/huésped se pueden utilizar para que contengan y expresen las secuencias que codifican un polipéptido de GPCR.

Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con bacteriófagos, plásmido, o vectores de expresión de ADN de cósmido; las levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus), sistemas de células de plantas transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión de bacterias (por ejemplo, Ti o pBR322 plásmidos), o sistemas de células animales.

Los elementos de control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas de los potenciadores, promotores de vector, regiones no traducidas en 5' y 3' - que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su intensidad y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, se pueden usar cualesquiera elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares se pueden usar. Se puede usar el promotor de polihedrina de baculovirus en células de insecto. Los promotores o potenciadores derivados de los genomas de células de plantas (por ejemplo,

choque térmico, RUBISCO, y genes de proteínas de almacenamiento) o de virus de plantas (por ejemplo, promotores virales o secuencias guías) se pueden clonar en el vector. En sistemas de células de mamíferos, los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos son preferibles. Si es necesario generar una línea celular que contiene copias múltiples de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de GPCR, los vectores basados en SV40 o EBV se pueden usar con un marcador seleccionable adecuado.

Sistemas de expresión de bacterias y de levaduras

En sistemas bacterianos, se puede seleccionar un número de vectores de expresión dependiendo del uso propuesto para el polipéptido de GPCR. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de polipéptido de GPCR para la inducción de anticuerpos, se pueden usar los vectores que dirigen la expresión a alto nivel de las proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, clonación de *E. coli* multifuncional y vectores de expresión tal BLUESCRIPT (Stratagene). En un vector BLUESCRIPT, una secuencia que codifica el polipéptido de GPCR se puede ligar en el vector en fase con las secuencias para los restos Met N terminal y los siete siguientes de β -galactosidasa de manera que se produce una proteína híbrida. También se pueden usar los vectores pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264, 5503-5509, 1989) o vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante la adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en la presencia de glutatión libre. Las proteínas hechas en tales sistemas se pueden diseñar para que incluyan heparina, trombina, o sitios de escisión de proteasa del factor Xa de manera que el polipéptido clonado de interés se pueda liberar del resto GST si se quiere.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden usar un número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa, y PGH. Para revisiones, véase Ausubel *et al.* (1989) y Grant *et al.*, Methods Enzymol. 153, 516-544, 1987.

Sistemas de expresión de plantas e insectos

Si se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican los polipéptidos de GPCR se pueden dirigir mediante cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, se pueden usar promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia guía omega de TMV (Takamatsu, EMBO J. 6, 307-311, 1987). Como alternativa, se pueden usar promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi *et al.*, EMBO J. 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, Science 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 17, 85-105, 1991). Estas construcciones se pueden introducir en células de plantas mediante transformación directa de ADN o mediante transfección mediada por patógenos. Tales técnicas se describen en un número de revisiones disponibles en general (por ejemplo, Hobbs o Murray, en MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE y TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., p. 191-196, 1992).

También se puede usar un sistema de insectos para expresar un polipéptido de GPCR. Por ejemplo, en uno de tales sistemas se usa virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en *Trichoplusia larvae*. Las secuencias que codifican polipéptidos de GPCR se pueden clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y se colocan bajo control del promotor de la polihedrina. La inserción útil de los polipéptidos de GPCR harán que el gen de la polihedrina inactivo y producirá virus recombinante que carece de proteína de revestimiento. Los virus recombinantes después se pueden usar para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que los polipéptidos de GPCR se pueden expresar (Engelhard *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 91, 3224-3227, 1994).

Sistemas de expresión de mamíferos

Se puede usar un número de sistemas de expresión basados en virus para expresar polipéptidos de GPCR en células huésped de mamíferos. Por ejemplo, si se usa un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican los polipéptidos de GPCR se pueden ligar en un complejo de adenovirus de transcripción/traducción que comprende el último promotor y la secuencia guía tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma viral se puede usar para obtener un virus viable que es capaz de expresar un polipéptido de GPCR en células huésped infectadas (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655-3659, 1984). Si se desea, los potenciadores de transcripción, tales como el virus de sarcoma de Rous (RSV), se puede usar para incrementar la expresión en células huésped de mamíferos.

También se pueden usar cromosomas artificiales humanos (HAC) para distribuir fragmentos mayores de ADN que se pueden contener y expresar en un plásmido. Los HAC de 6M a 10M se construyen y se distribuyen a las células mediante procedimientos de distribución convencionales (por ejemplo, liposomas, polímeros de amino policationicos, o vesículas).

También se pueden usar señales de inicio específicas para lograr la traducción más eficaz de secuencias que codifican los polipéptidos de GPCR. Tales señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican un polipéptido de GPCR, su codón de inicio, y las secuencias cadena arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden ser o no ser necesarias señales de control de transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en los que la secuencia de codificación, o su fragmento, se inserta se deben proporcionar señales de control de traducción exógenas (incluyendo el codón de inicio ATG). El codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la inserción completa. Los elementos de traducción exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema de células particulares que se usa (véase Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20, 125-162, 1994).

Células huésped

Se puede elegir una célula huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido de GPCR expresado de la forma deseada. Tales codificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. El procesamiento después de la traducción que escinde una forma "prepro" del polipéptido también se pueden usar para facilitar la inserción correcta, plegamiento y función. Están disponibles células huésped diferentes que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades después de la traducción (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38), a partir de La Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) y se pueden elegir para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea.

Se prefiere la expresión estable para la producción a largo plazo con alto rendimiento de proteínas recombinantes. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de manera estable los polipéptidos de GPCR se pueden transformar usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de elementos de replicación y/o de expresión y un gen marcador seleccionable sobre el mismo o sobre un vector separado. Después de la introducción del vector del vector, se puede dejar que las células se desarrollen durante 1-2 días en un medio enriquecido antes que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el desarrollo y recuperación de las células que se expresan de manera exitosa las secuencias de GPCR introducidas. Se pueden hacer proliferar clones resistentes de células transformadas usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula. Véase, por ejemplo, ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986.

Se puede usar cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas.

Éstos incluyen, pero no se limitan a, los genes de timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler *et al.*, Cell 11, 223-32, 1977) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22, 817-23, 1980) que se pueden emplear en las células *tk* o *aprt*, respectivamente. También, se puede usar resistencia contra los metabolitos, antibióticos, o herbicidas como la base para la selección. Por ejemplo, dhfr confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567-70, 1980), npt confiere resistencia a aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150, 1-14, 1981), y las *pat* confieren resistencia a clorosulfuron y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murray, 1992, anteriormente). Se han descrito genes seleccionables adicionales. Por ejemplo, *trpB* permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o *hisD*, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047-51, 1988). Se pueden usar marcadores visibles tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes y para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable que se puede atribuir a un sistema de vector específico (Rhodes *et al.*, Methods Mol. Biol. 55, 121-131, 1995).

Detección de la expresión

Aunque la presencia de la expresión del gen marcador sugiere que el polinucleótido de GPCR también está presente, su presencia y expresión puede ser necesario que se confirme. Por ejemplo, si una secuencia que codifica un polipéptido de GPCR se inserta dentro de una secuencia de gen marcador, las células transformadas que contienen secuencias que codifican un polipéptido de GPCR se puede identificar mediante la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, se puede colocar un gen marcador en tándem con una secuencia que codifica un polipéptido de GPCR bajo el control de un solo promotor. La expresión del gen marcador en la respuesta de inducción o selección usualmente indica la expresión del polinucleótido de GPCR.

Como alternativa, las células huésped que contienen un polinucleótido de GPCR y que expresan un polipéptido de GPCR se puede identificar mediante una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y bioensayo de proteínas o técnicas de inmunoensayo que incluyen tecnologías de membrana, solución, o basadas en procesador para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de GPCR se puede detectar mediante hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación que usa sondas o fragmentos de polinucleótidos que codifican un polipéptido de GPCR. Los ensayos basados en la

amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados entre las secuencias que codifican un polinucleótido de GPCR.

Se conocen en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de un polipéptido de GPCR, usando o bien anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y aislamiento de células en citofluorímetro (FACS). Se puede usar un inmunoensayo en base monoclonal de dos sitios que usa anticuerpos monoclonales reactivo a dos epítopes que no interfieren en un polipéptido de GPCR, o se puede emplear un ensayo de unión competitiva. Éstos y otros ensayos se describen en Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) y Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158, 1211-1216, 1983).

Los expertos en la técnica conocen una amplia diversidad de etiquetas y y técnicas de conjugación y se pueden usar en diversos ensayos de ácido nucleico y aminoácido. Los medios para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar las secuencias relacionadas con los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de GPCR incluyen el oligo etiquetado, traducción nick, etiquetado del extremo o amplificación por la PCR usando un nucleótido etiquetado. Como alternativa, las secuencias que codifican un polipéptido de GPCR se puede clonar en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Se conocen en la técnica tales vectores, están comercialmente disponibles, y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de nucleótidos etiquetados y una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3, o SP6. Estos procedimientos se pueden llevar a cabo usando una diversidad de kits comercialmente disponibles (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, y US Biochemical). Las moléculas o etiquetas indicadoras adecuadas que se pueden usar para la fácil detección de incluyen radionúclidos, enzimas, y agentes fluorescentes, quimiluminiscenets, o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

Expresión y purificación de polipéptidos

Se pueden cultivar células huésped transformadas con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de GPCR en las condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. El polipéptido producido mediante por una célula transformada se puede secretar o contener intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como entenderán los expertos en la técnica, se pueden diseñar vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican los polipéptidos de GPCR para que contengan secuencias de señal que dirigen la secreción de los polipéptidos de GPCR a través de una membrana celular procariótica o eucariótica o que dirigen la inserción de membrana del polipéptido de GPCR unido a membrana.

Como se ha descrito anteriormente, se pueden usar otras construcciones para acoplar una secuencia que codifica un polipéptido de GPCR a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles. Tal purificación que facilita los dominios incluye, pero no se limita a, péptidos de quelación de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de la proteína A que permiten la purificación de sobre inmunoglobulina modificada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de las secuencias de engarce que se pueden escindir tales como las específicas para el Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido de GPCR también se pueden usar para facilitar la purificación. Uno de tales vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de GPCR y 6 restos de histidina que preceden a tioredoxina o un sitio de escisión de enteroquinasa. Los restos de histidina facilitan la purificación mediante IMAC (cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado, como se describe en Porath *et al.*, Prot. Exp. Purif. 3, 263-281, 1992), mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido de GPCR a partir de la proteína de fusión. Los vectores que contienen proteína de fusión se describen en Kroll *et al.*, ADN Cell Biol. 12, 441-453, 1993.

Síntesis química

Las secuencias que codifican un polipéptido de GPCR se puede sintetizar en su totalidad o en parte, usando procedimientos químicos bien conocidos o en la química (véase, Caruthers *et al.*, Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Horn *et al.* Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980). Como alternativa, se puede producir un mismo polipéptido de GPCR usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como mediante la síntesis directa de péptido usando técnicas de fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, Science 269, 202-204, 1995). Se puede realizar la síntesis de proteína usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática se puede lograr, por ejemplo, usando Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de polipéptidos de GPCR se pueden sintetizar de manera separada y combinar usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

El péptido sintetizado recientemente se puede purificar sustancialmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton, PROTEINS: STRUCTURES y MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman y Co., New York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido de GPCR sintético se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman; véase Creighton, anteriormente). De manera adicional, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido

de GPCR se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinada usando procedimientos químicos directos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o una proteína de fusión.

5 Producción de polipéptidos alterados

Como se entenderá por los expertos en la técnica, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de GPCR que poseen codones de origen no natural. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procariótico o eucariótico particular se puede seleccionar para incrementar la velocidad de la expresión de proteína o para producir una transcripción de ARN que tiene las propiedades deseables, tales como una semivida que es más larga que la de una transcripción generada a partir de la secuencia de origen natural.

Las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento se pueden modificar por ingeniería genética usando procedimientos conocidos en general en la técnica para alterar las secuencias que codifican el polipéptido de GPCR por una diversidad de razones, que incluyen pero no se limitan a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, y/o expresión del polipéptido o producto de ARNm. La mezcla de ADN por fragmentación al azar y ensamblaje de nuevo por PCR de los fragmentos del gen y oligonucleótidos sintéticos se puede usar para modificar por ingeniería genética las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, se puede usar la mutagénesis dirigida al sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glicosilación, cambiar la preferencia del codón, producir variantes de ajuste, introducir mutaciones, y así sucesivamente.

Anticuerpos

Cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica se puede generar para que se una específicamente a un epítipo de un polipéptido de GPCR. "Anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye moléculas de inmunoglobulinas intactas, así como sus fragmentos, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de un polipéptido de GPCR. Típicamente, al menos 6, 8, 10, ó 12 aminoácidos contiguos se requieren para formar un epítipo. Sin embargo, los epítopes que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25, ó 50 aminoácidos.

Un anticuerpo que específicamente se une a un epítipo de un polipéptido de GPCR se puede usar terapéuticamente, así como en ensayos de inmunológicos, tales como transferencia de Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunológicos conocidos en la técnica. Se pueden usar diversos inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos se conocen bien en la técnica. Tales inmunoensayos típicamente implican la medición de la formación de complejo entre un inmunógeno y un anticuerpo que específicamente se une al inmunógeno.

Típicamente, un anticuerpo que específicamente se une a un polipéptido de GPCR proporciona una señal de detección al menos 5-, 10-, ó 20- veces mayor que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usan en un ensayo inmunológico. Preferiblemente, los anticuerpos que específicamente se unen a polipéptidos de GPCR no detectan otras proteínas en ensayos inmunológicos y puede inmunoprecipitar un polipéptido de GPCR en solución.

Los polipéptidos de GPCR se pueden usar para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, mono, o ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, un polipéptido de GPCR se puede conjugar a una proteína vehículo, tal como albúmina sérica bovina, tiroglobulina, y hemocianina de lapa de ojo de cerradura. Dependiendo de la especie huésped, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, BCG (bacilli Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Los anticuerpos monoclonales que se unen de manera específica a un polipéptido de GPCR se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la proporción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células b humanas, y la técnica de hibridoma de EBV (Kohler *et al.*, Nature 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, J. Immunol. Methods 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, Mol. Cell Biol. 62, 109-120, 1984).

Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", se puede usar el ajuste de los genes de anticuerpo de ratones a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno apropiada y actividad biológica, (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, Nature 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, Nature 314, 452-454, 1985). Los anticuerpos monoclonales y otros también pueden estar "humanizados" para prevenir a un paciente acumule una respuesta inmune contra el anticuerpo cuando se usa de manera terapéutica. Tales anticuerpos pueden ser suficientemente similares en secuencia a anticuerpos humanos a usar directamente en terapia o pueden requerir alteración de unos pocos restos clave. Las diferencias de secuencia entre anticuerpos de roedores y secuencias de seres humanos se pueden minimizar reemplazando restos que

difieren de aquellos en las secuencias de seres humanos mediante mutagénesis dirigida al sitio de restos individuales o mediante enjedo de las regiones determinantes complementarias completas. Como alternativa, se pueden producir anticuerpos humanizados usando procedimientos de recombinación, como se describe en el documento GB2188638B. Los anticuerpos que específicamente se unen a un polipéptido de GPCR pueden contener sitios de unión a antígeno
 5 que están totalmente o parcialmente humanizados como se describe en el documento U.S. 5.565.332.

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena se pueden adaptar usando procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de una sola cadena que se unen específicamente a polipéptidos de GPCR. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica,
 10 se pueden generar mediante mezcla de cadenas de a partir de las genotecas de combinación al azar (Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991).

Los anticuerpos de una sola cadena también se pueden construir usando un procedimiento de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc como molde (Thirion *et al.*, 1996, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11). Los anticuerpos
 15 de una sola cadena pueden ser mono- o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de una sola cadena tetravalentes, biespecíficos se enseña, por ejemplo, en Coloma y Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63. La construcción de anticuerpos de una sola cadena biespecíficas, bivalentes se enseñan en Mallender & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de una sola cadena se puede construir usando la síntesis de nucleótidos manual o automática, clonarse en una construcción de expresión que usa procedimientos de ADN recombinante convencionales, y se introducen en una célula para expresar la secuencia de codificación, como se describe más adelante. Como alternativa, los anticuerpos de una sola cadena se pueden producir directamente usando,
 20 por ejemplo, tecnología de fago filamentoso (Verhaar *et al.*, 1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91).

Los anticuerpos que específicamente se unen a polipéptidos de GPCR también se pueden producir mediante la inducción *in vivo* de la producción en la población de linfocitos o mediante la selección de genotecas de inmunoglobulina o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describe en la bibliografía (Orlandi *et al.*, Proc.
 30 Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, Nature 349, 293-299, 1991).

Otros tipos de anticuerpos se pueden construir y usar de manera terapéutica en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos se pueden construir como se describe en el documento WO 93/03151. También se pueden preparar las proteínas de unión que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y
 35 multiespecíficas, tales como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden purificar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, anticuerpos se pueden purificar por afinidad mediante subcultivo sobre una columna a la que se une un polipéptido de GPCR. Después se pueden eluir los anticuerpos unidos de la columna usando un tampón con
 40 una alta concentración de sal.

Oligonucleótidos no codificantes

Los oligonucleótidos no codificantes son secuencias de nucleótidos que son complementarios a una secuencia de ADN o ARN específica. Una vez introducidos en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con secuencias naturales producidas por la célula para formar complejos y bloquear o bien la transcripción o traducción. Preferiblemente, un oligonucleótidos no codificante tiene al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede tener al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50 o más nucleótidos de longitud. También se pueden usar secuencias más
 50 largas. Las moléculas de oligonucleótidos no codificantes se pueden proporcionar en una construcción de ADN e introducirse en una célula como se ha descrito anteriormente para disminuir el nivel de los productos génicos en la célula.

Los oligonucleótidos no codificantes pueden ser deoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Se pueden sintetizar los oligonucleótidos manualmente o mediante un sintetizador automático, mediante unión de manera covalente al extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces entre nucleótidos no fosfodiéster tales como alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosfonotioatos, alquilfosfonatos, fosforoamidatos, fosfato ésteres, carbamatos, acetamidato, carboximetil ésteres, carbonatos, y fosfato triésteres. Véase,
 55 Brown, Meth. Mol. Biol. 20, 1-8, 1994; Sonveaux, Meth. Mol. Biol. 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, Chem. Rev. 90, 543-583, 1990.

Las modificaciones de la expresión del gen de GPCR se puede obtener mediante el diseño de los oligonucleótidos no codificantes que formarán complejos dúplex para el control, 5', o regiones reguladoras del gen GPCR. Se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de inicio de la transcripción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de comienzo. De manera similar, se puede lograr la inhibición usando la metodología de apareamiento de
 65 "triple hélice". El apareamiento de triple hélice es útil debido a que provoca la inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrir de manera suficiente la unión de polimerasas, factores de transcripción, o chaperones.

Se han descrito en la bibliografía avances terapéuticos que usan ADN triplex (por ejemplo, Gee *et al.*, in Huber y Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). También se puede diseñar un oligonucleótido no codificante para bloquear la traducción de ARNm mediante la prevención de la transcripción de unión a los ribosomas.

No se requiere complementariedad precisa para la formación de complejos exitosa entre un oligonucleótido no codificante y la secuencia complementaria de un polinucleótido de GPCR. Los oligonucleótidos no codificantes que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, ó 5 o más tramos de nucleótidos contiguos que son de manera precisa complementarios al polinucleótido de GPCR, cada uno separado por un tramo de nucleótidos contiguos que no son complementarios a los nucleótidos de GPCR, pueden proporcionar suficiente especificidad de dirección para el ARNm de GPCR. Preferiblemente, cada tramo de nucleótidos contiguos complementarios es al menos 4, 5, 6, 7, ó 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias que no intervienen no complementarias son preferiblemente de 1, 2, 3, ó 4 nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica pueden usar fácilmente el punto de fusión calculado de un par no codificante-codificante para determinar el grado de discordancia que se tolerará entre un oligonucleótido no codificante y una secuencia del polinucleótido de GPCR particular.

Los oligonucleótidos no codificante se pueden modificar sin afectar a su capacidad de hibridarse a un polinucleótido de GPCR. Estas modificaciones pueden ser internas o en cualquiera de o ambos extremos de la molécula no codificante. Por ejemplo, los enlaces de fosfatos de internucleósidos se pueden modificar mediante la adición de restos de colesteroil o diamina con variación en los números de los restos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. También se pueden emplear bases modificadas y/o azúcares, tales como arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' - en el que el grupo 3' hidroxilo o el grupo 5' fosfato están sustituidos en un oligonucleótido no codificante modificante. Estos oligonucleótidos modificados se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Agrawal *et al.*, Trends Biotechnol. 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, Tetrahedron. Lett. 215, 3539-3542, 1987.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica. Véase, por ejemplo, Cech, Science 236, 1532-1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543-568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510-515, 1996. Las ribozimas se pueden usar para inhibir la función génica mediante la escisión de una secuencia de ARN, como se conoce en la técnica (por ejemplo, Haseloff *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5,641.673). El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Los ejemplos incluyen las moléculas de ribozima del motivo de pez martillo modificado por ingeniería genética que pueden catalizar de manera específica y de manera eficaz catalizar la escisión endonucleica de secuencias de nucleótidos específicas.

La secuencia de codificación de un polinucleótido de GPCR se puede usar para generar ribozimas que se unirán de manera específica al ARNm que se ha transcrito a partir del polinucleótido de GPCR. Los procedimientos de diseño y construcción de ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans de una manera altamente específica de la secuencia se han desarrollado y descrito en la técnica (véase Haseloff *et al.* Nature 334, 585-591, 1988). Por ejemplo, la actividad de la escisión de las ribozimas se puede dirigir a ARN específicos mediante ingeniería genética de una región de "hibridación" discreta en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria al ARN Diana y de esta manera se hibrida de manera específica a la diana (véase, por ejemplo, Gerlach *et al.*, documento EP 321,201).

Los sitios de escisión de ribozima específicos dentro de una diana de ARN de GPCR se pueden identificar mediante barrido de la molécula diana para los sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del ARN diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar las características estructurales secundarias que pueden hacer inoperable la diana. La idoneidad de las dianas de ARN de GPCR candidatas también se pueden evaluar ensayando la accesibilidad a la hibridación con los oligonucleótidos complementarios usando ensayos de protección de ribonucleasa. Las secuencias complementarias más largas se pueden usar para incrementar la afinidad de la secuencia de hibridación para la diana. Las regiones de hibridación y escisión de la ribozima pueden estar relacionadas integralmente de manera que tras la hibridación al ARN diana mediante las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir la Diana.

Las ribozimas se pueden introducir en las células como parte de una construcción de ADN. Se pueden usar procedimientos mecánicos, tales como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación, o precipitación con fosfato de calcio, para introducir una construcción de ADN que contiene ribozima en las células en las que se desea que disminuya la expresión de GPCR. Como alternativa, si se desea que las células retengan de manera estable la construcción de ADN, la construcción se puede suministrar sobre un plásmido y mantener como un elemento separado o integrarse en el genoma de las células, como se conoce en la técnica. Una construcción de ADN que codifica ribozima puede incluir elementos reguladores de transcripción, tales como un elemento promotor, un potenciador o un elemento UAS, y una señal del terminador de la transcripción, para controlar la transcripción de las ribozimas en las células.

Como se enseña por Haseloff *et al.* en la patente de estados Unidos N° 5.641.673, las ribozimas se pueden modificar por ingeniería genética de manera que la expresión de la ribozima se producirá en respuesta a los factores que inducen la expresión de un gen diana. Las ribozimas también se pueden modificar por ingeniería genética para proporcionar un nivel adicional de regulación, de manera que la destrucción del ARNm se produce solamente cuando tanto una
 5 ribozima como un gen diana se inducen en las células.

Genes expresados de manera diferencial

En el presente documento se describen procedimientos para la identificación de genes cuyos productos interactúan con GPCR humano. Tales genes pueden representar genes que se expresan de manera diferencial en trastornos, incluyendo, pero sin limitación a COPD, trastornos cardiovasculares, cáncer, trastornos urinarios, obesidad, diabetes, trastornos del CNS, trastornos del hígado, trastornos del riñón, trastornos de los órganos secretores, asma y trastorno hematológicos. Además, tales genes pueden representar genes que se diferencian de manera regular en respuesta a
 15 las manipulaciones relevantes a la progresión o tratamiento de tales enfermedades. De manera adicional, tales genes pueden tener una expresión modulada temporalmente, incrementada o disminuida a diferentes fases de tejido o desarrollo del organismo. Un gen expresado de manera diferencial también puede tener su expresión modulada bajo control frente a las condiciones ambientales. Además, el gen de GPCR humano o producto génico se puede ensayar él mismo para evaluar la expresión diferencial.

El grado en el que la expresión se diferencia un estado normal de un estado patológico necesita solamente ser lo suficientemente grande para que se visualice mediante técnicas de caracterización convencionales tales como técnicas de despliegue diferencial. Otras de tales técnicas de caracterización convencionales mediante las que se pueden visualizar la expresión incluyen, pero no se limitan a, RT (transcriptasa inversa) cuantitativa, PCR, y análisis de Northern.

25

Identificación de genes expresados de manera diferencial

Para identificar los genes expresados de manera diferencial ARN total o preferiblemente, ARNm se aísla a partir de tejidos de interés. Por ejemplo, muestras de ARN se obtienen a partir de tejidos de sujetos experimentales y a partir de tejidos correspondientes de sujetos control. Cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se selecciona contra el aislamiento de ARNm se puede utilizar para la purificación de tales muestras de ARN. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Se pueden procesar fácilmente grandes números de muestras de tejidos usando las técnicas bien conocidas
 30 por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el procedimiento de aislamiento de ARN de una sola etapa de Chomczynski, Patente de Estados Unidos n° 4.843.155.

Las transcripciones dentro de las muestras de ARN recogidas que representan el ARN producido mediante los genes expresados de manera diferencial se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Incluyen, por ejemplo, selección diferencial (Tedder *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988), hibridación sustractiva (Hedrick *et al.*, Nature 308, 149-53; Lee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2825, 1984), despliegue diferencial (Liang y Pardee, Science 257, 967-71, 1992; Patente de Estados Unidos N° 5.262.311), y análisis de microensayos.

La información de expresión diferencial puede ella misma sugerir procedimientos relevantes para el tratamiento de trastornos que implican el GPCR humano. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir una modulación de la expresión de los genes expresados de manera diferencial y/o el gen que codifica el GPCR humano. La información de expresión diferencial puede indicar si la expresión o actividad del gen de expresión de manera diferencial o producto génico o el gen de GPCR humano o producto génico están regulados hacia arriba o regulados hacia abajo.

50

Procedimientos de selección

La invención proporciona ensayos para seleccionar compuestos de ensayo que se unen a o modulan la actividad de un polipéptido de GPCR o un polinucleótido de GPCR polinucleótido. Un compuesto de ensayo preferiblemente se une a un polipéptido de GPCR o polinucleótido. Más preferiblemente, un compuesto de ensayo disminuye o aumenta el efecto biológico de un ligando sobre el receptor mediante al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, ó 100% con relación a la ausencia del compuesto de ensayo.

60

Compuestos de ensayo

Los compuestos de ensayo pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o pueden ser compuestos n conocidos previamente que tienen cualquier actividad farmacológica. Los compuestos pueden ser de origen natural o diseñarse en el laboratorio. Se pueden aislar a partir de microorganismos, animales, o plantas, y se pueden producir de manera recombinante, o sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Si se desea, los compuestos de ensayo se pueden obtener usando cualesquiera de los numerosos procedimientos de genotecas de combinación

65

conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, genotecas biológicas genotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas que se pueden dirigir espacialmente, procedimientos de genoteca sintética que requieren desconvolución, el procedimiento de genoteca de “una perla-un compuesto”, y procedimientos de genoteca sintética que usan selección por cromatografía de afinidad. El planteamiento de genoteca biológica se limita a genotecas de polipéptidos, mientras que los otros cuatro planteamientos son aplicables a polipéptido, oligómero no peptídico, librerías de moléculas pequeñas de compuestos. Véase Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Los procedimientos para la síntesis de genotecas moleculares se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Las genotecas de los compuestos se pueden presentar en solución (véase, por ejemplo, Houghten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), o en perlas (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), escamas (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacterias o esporas (Ladner, Patente de Estados Unidos N° 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), o fago (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; y Ladner, Patente de Estados Unidos N° 5.223.409).

Selección de alto rendimiento

Los compuestos de ensayo se pueden seleccionar por su capacidad de unirse a polipéptidos o polinucleótidos de GPCR o para afectar a la actividad de GPCR o expresión del gen de GPCR usando la selección de alto rendimiento. El uso de la selección de alto rendimiento, muchos compuestos discretos se pueden ensayar en paralelo de manera que se pueden seleccionar rápidamente grandes cantidades de compuestos de ensayo. Las técnicas más ampliamente establecidas utilizan placas de microvaloración de 96 pocillos. Los pocillos de las placas de microvaloración típicamente requieren volúmenes de ensayo que varían entre 50 y 500 μ l. Además de las placas, muchos instrumentos, materiales, pipetas, robótica, lavadores de placas, y lectores de placas están comercialmente disponibles para adaptarse al formato de 96 pocillos.

Como alternativa, se pueden usar “ensayos sin formato,” o ensayos que no tienen ninguna barrera física entre las muestras. Por ejemplo, un ensayo que usa células de pigmento (melanocitos) en un ensayo simple homogéneo para las genotecas de péptidos de combinación se describe por Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). Las células se colocan en placas Petri de agarosa, después se colocan las perlas que llevan los compuestos de combinación sobre la superficie de la agarosa. Los compuestos de combinación se liberan parcialmente de las perlas. Los compuestos activos se pueden visualizar como áreas de pigmento oscuras, ya que los compuestos se difunden localmente en la matriz del gel, los compuestos activos provocan que las células cambien de color.

Otro ejemplo de ensayo sin formato libre se describe por Chelsky, “Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel y Traditional Approaches”, reseñado en la primera Conferencia Annual de la Sociedad para la selección Biomolecular en Filadelfia, Pa. (7-10 de nov de 1995). Chelsky colocó un ensayo de enzima homogéneo simple para la carbónico anhidrasa dentro de un gel de agarosa de manera que la enzima en el gel provocaría un cambio de color a lo largo de todo el gel. Después de esto, las perlas que llevan los compuestos de combinación mediante un fotoengarce se colocaron dentro del gel y los compuestos se liberaron parcialmente mediante luz UV. Los compuestos que inhibían la enzima se observaron en forma de zonas locales de inhibición que tienen menos cambio de color.

Todavía otro ejemplo se describe por Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). En este ejemplo, las genotecas de combinación se seleccionan para los compuestos que tenían efectos citotóxicos sobre las células cancerosas que se desarrollan en agar.

Otro procedimiento de selección de alto rendimiento se escribe en Beutel *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.976.813. En este procedimiento, las muestras de ensayo se colocan en matriz porosa. Uno o más componentes de ensayo se colocan después dentro, sobre la parte superior, o en el fondo de una matriz tal como un gel, una hoja de plástico, un filtro, u otra forma de soporte sólido fácilmente manipulada. Cuando las muestras se introducen en la matriz porosa se difunden suficientemente lentos, de manera que los ensayos se pueden realizar sin que las muestras de ensayo se desarrollen conjuntamente.

Ensayos de unión

Para los ensayos de unión, el compuesto de ensayo es preferiblemente una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio activo del polipéptido de GPCR, haciendo por lo tanto que el sitio de unión del ligando sea inaccesible al sustrato de manera que la actividad biológica normal se evite. Los ejemplos de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas de tipo péptido. Los ligandos potenciales que se unen a un polipéptido de la invención incluyen, pero no se limitan a, los ligandos naturales de los GPCR conocidos y los análogos o derivados de los mismos.

En los ensayos de unión, o bien el compuesto de ensayo o el polipéptido de GPCR pueden comprender una etiqueta detectable, tal como una etiqueta fluorescente, de radioisótopo, quimioluminiscente, o enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa. La detección de un compuesto de ensayo que está unido al polipéptido de GPCR se puede después llevar a cabo, por ejemplo, mediante conteo directo de la radioemisión, mediante conteo de centelleo, o mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en un producto detectable.

Como alternativa, la unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de GPCR se puede determinar sin el etiquetado de cualquiera de los que interactúan. Por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de ensayo con un polipéptido de GPCR. Un microfisiómetro (por ejemplo, Cytosensor™) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su ambiente usando un sensor potenciométrica dirigible por la luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden usar como un indicador de la interacción entre un compuesto de ensayo y un polipéptido de GPCR (McConnell *et al.*, Science 257, 1906-1912, 1992).

La determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo de unirse a un polipéptido de GPCR también se puede llevar a cabo usando una tecnología tal como en Análisis de Interacción Biomolecular a tiempo real (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-2345, 1991, y Szabo *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995). BIA es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin etiquetar cualquiera de los que interactúan (por ejemplo, BIAcore™). Los cambios en la resonancia de plasmón de superficie del fenómeno óptico (SPR) se puede usar como una indicación de las reacciones de tiempo real entre las moléculas biológicas.

En todavía otro aspecto de la invención, un polipéptido de GPCR se puede usar como una “proteína de cebo” en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.283.317; Zervos *et al.*, Cell 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, J. Biol. Chem. 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, BioTechniques 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, Oncogene 8, 1693-1696, 1993; y Brent documento W094/10300), para identificar otras proteínas que se unen a o interactúan con el polipéptido de GPCR y modular su actividad.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que constan de unión de dominios de unión de ADN y de activación separables. En resumen, el ensayo utiliza dos construcciones diferentes de ADN. Por ejemplo, en una construcción, el polinucleótido que codifica un polipéptido de GPCR se puede condensar a un polinucleótido que codifica el dominio de unión de ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción de una secuencia de ADN que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) se puede condensar a un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocida. Si las proteínas de “cebo” y la “presa” son capaces de interactuar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de unión de ADN de activación del factor de transcripción se encuentran en estrecha proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, LacZ), que se une de manera operativa a un sitio regulador de la transcripción para el factor de transcripción. La expresión del gen indicador se puede detectar, y las colonias de las células que contienen el factor de transcripción funcional se puede aislar y usar para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interactúa con el polipéptido de GPCR.

Puede ser deseable inmovilizar o bien el polipéptido de GPCR (o polinucleótido) o el compuesto de ensayo para facilitar la separación de formas unidas de las no unidas de uno o ambos de los que interactúan, así como acomodar la automatización del ensayo. De este modo, el polipéptido de GPCR (o polinucleótido) o el compuesto de ensayo pueden estar unidos a un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio o plástico, placas de cultivo de tejidos, pocillos de microtitulación, virutas de sílica, o partículas tales como perlas (que incluye, pero no se limita a, látex, perlas de poliestireno o de vidrio). Cualquier procedimiento conocido en la técnica se puede usar para unir el polipéptido de GPCR (o polinucleótido) o compuesto de ensayo a un soporte sólido, que incluye el uso de enlaces de covalente y no covalente, absorción pasiva, o pares de restos de unión unidos respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o compuesto de ensayo y el soporte sólido. Los compuestos de ensayo están preferiblemente unidos al soporte sólido en una disposición, de manera que la localización de los compuestos de ensayo individuales se puedan rastrear. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de GPCR (o polinucleótido) se puede llevar a cabo en un recipiente adecuado para que contenga los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga.

En una realización, el polipéptido de GPCR es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite que el polipéptido de GPCR se una a un soporte sólido. Por ejemplo, se pueden adsorber las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas de glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y el polipéptido de GPCR no absorbido; la mezcla después se incuba en conducciones conductivas para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o pocillos de placa de microtitulación se lavan para retirar cualesquiera componentes no unidos. La unión de los que interactúan se pueden determinar o bien directa o indirectamente, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar a partir del soporte sólido antes de que se determine la unión.

Otras técnicas para la inmovilización de las proteínas o polinucleótidos sobre un soporte sólido también se pueden usar en los ensayos de selección de la invención. Por ejemplo, o bien un polipéptido de GPCR (o polinucleótido) o un compuesto de ensayo se puede inmovilizar utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Los polipéptidos

de GPCR biotinilados (o polinucleótidos) o compuestos de ensayo se pueden preparar a partir de biotina-NHS(N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) e inmovilizados en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidos con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido de GPCR, polinucleótido, o un compuesto de ensayo, pero que no interfiere con un sitio de unión deseado, tal como el sitio activo del polipéptido de GPCR, se puede derivatizar a los pocillos de la placa. La diana o proteína no unida se puede atrapar en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos.

Los procedimientos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados de GST, incluyen la inmunodetección de los complejos que usan anticuerpos que se unen de manera específica al polipéptido de GPCR o compuesto de ensayo, ensayos ligados a enzimas que dependen de la detección de una actividad del polipéptido de GPCR, y electroforesis de gel de SDS en condiciones no reductoras.

La selección de los compuestos de ensayo que se unen a un polipéptido o polinucleótido de GPCR también se pueden llevar a cabo en células intactas. Cualquier célula que comprende un polipéptido o polinucleótido de GPCR se puede usar en un sistema de ensayo basado en células. Un polinucleótido de GPCR puede ser de origen natural en la célula o se puede introducir usando las técnicas tales como las descritas anteriormente. La unión del compuesto de ensayo a un polipéptido o polinucleótido de GPCR se determina como se ha descrito anteriormente.

Ensayos funcionales

Los compuestos de ensayo se pueden ensayar por la capacidad de incrementar o disminuir un efecto biológico de un polipéptido de GPCR. Tales efectos biológicos se pueden determinar usando los ensayos funcionales descritos en los ejemplos específicos, más adelante. Los ensayos funcionales se pueden llevar a cabo después de poner en contacto o bien un polipéptido de GPCR purificado, una preparación de membrana celular, o una célula intacta con un compuesto de ensayo. Un compuesto de ensayo que disminuye una actividad funcional de un GPCR mediante al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% se identifica como un agente potencial para disminuir la actividad de GPCR. Un compuesto de ensayo que incrementa la actividad de GPCR mediante al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% se identifica como un agente para incrementar la actividad de GPCR.

Uno de tales procedimientos de selección implica el uso de melanóforos que se transfectan para expresar un polipéptido de GPCR.. Tal técnica de selección se describe en el documento WO 92/01810 publicado el 6 de febrero de 1992. De este modo, por ejemplo, tal ensayo se puede emplear para seleccionar un compuesto que inhibe la activación del polipéptido receptor poniendo en contacto las células de melanóforo que comprenden el receptor con tanto el ligando del receptor como un compuesto de ensayo a seleccionar. La inhibición de la señal generada por el ligandos indica que un compuesto de ensayo a seleccionar. La inhibición de la señal generada por el ligando indica que un compuesto de ensayo es un antagonista potencial para el receptor, es decir, inhibe la activación del receptor. La selección se puede emplear para identificar un compuesto de ensayo que activa el receptor poniendo en contacto tales células con los compuestos a seleccionar y determinar si cada compuesto de ensayo genera una señal, es decir, activa el receptor.

Otras técnicas de selección incluyen el uso de células que expresan un polipéptido de GPCR humano (por ejemplo, células transfectadas CHO) en un sistema que mide los cambios de pH extracelular provocadas por la activación del receptor (véase, por ejemplo, Science 246, 181-296, 1989). Por ejemplo, los compuestos de ensayo se pueden poner en contacto con una célula que expresa un polipéptido de GPCR humano y una segunda respuesta de mensajero, por ejemplo, transducción de señal o cambios de pH, se pueden medir para determinar si el compuesto de ensayo activa o inhibe el receptor.

Otra tal técnica de selección implica la introducción de ARN que codifica un polipéptido de GPCR humano en oocitos de *Xenopus* para expresar de manera transitoria el receptor. Los oocitos transfectados se pueden después poner en contacto con el ligandos del receptor y un compuesto de ensayo a seleccionar, seguido de la detección de la inhibición o activación de una señal de calcio en el caso de la selección de los compuestos de ensayo que se cree que inhiben la activación del receptor.

Otra técnica de selección implica la expresión de un polipéptido de GPCR humano en las células en las que el receptor está ligado a una fosfolipasa C o D. Tales células incluyen células endoteliales, células del músculo liso, células del riñón embrionarias, etc. La selección se puede llevar a cabo como se ha descrito anteriormente mediante la cuantificación del grado de activación del receptor a partir de los cambios en la actividad fosfolipasa.

Los detalles de los ensayos funcionales tales como los descritos anteriormente se proporcionan en los ejemplos específicos, más adelante.

Expresión génica

En otra realización, se identifican los compuestos de ensayo que incrementan o disminuyen la expresión del gen GPCR. Un polinucleótido de GPCR se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se determina la expresión de un ARN o producto de polipéptido del polinucleótido de GPCR. El nivel de expresión de un ARNm apropiado o polipéptido en la presencia del compuesto de ensayo se compara con el nivel de expresión de ARNm o polipéptido en la ausencia del compuesto de ensayo. Después el compuesto de ensayo se puede identificar como un modulador de la expresión basándose en esta composición. Por ejemplo, cuando la expresión de ARNm o polipéptido es mayor en la presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, el compuesto de ensayo se identifica como un estimulador o potenciador de la expresión de ARNm o polipéptido. Como alternativa, cuando la expresión del ARNm o polipéptido es menos en la presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, el compuesto de ensayo se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm o polipéptido.

El nivel de la expresión de ARNm de GPCR o polipéptido en las células se puede determinar mediante los procedimientos bien conocidos en la técnica para detectar ARNm o polipéptido. Se pueden usar procedimientos o bien cualitativos o cuantitativos. La presencia de los productos de polipéptidos de un polinucleótido de GPCR se puede determinar, por ejemplo, usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, que incluye procedimientos inmunológicos tales como radioinmunoensayo, transferencia de Western, e inmunohistoquímica. Como alternativa, la síntesis de polipéptidos se puede determinar *in vivo*, en un cultivo de células, o en un sistema de traducción *in vitro* mediante la detección de la incorporación de los aminoácidos etiquetados en un polipéptido de GPCR.

Tal selección se puede llevar a cabo o bien en un sistema de ensayo sin células o en una célula intacta. Cualquier célula que expresa un polinucleótido de GPCR se puede usar en un sistema de ensayo basado en células. El polinucleótido de GPCR puede ser de origen natural en la célula o se puede introducir usando las técnicas tales como las descritas anteriormente. Se puede usar o bien un cultivo primario o una línea celular establecida, tal como CHO o las células 293 de riñón embrionario.

Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que se pueden administrar a un paciente para lograr un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, por ejemplo, un polipéptido de GPCR, polinucleótido de GPCR, anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido de GPCR, o miméticos, agonistas, antagonistas, o inhibidores de la actividad de un polipéptido de GPCR. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto de estabilización, que se puede administrar en cualquier vehículo estéril, biocompatible farmacéutico, que incluye, pero no se limita a, solución salina tamponada, dextrosa, y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solo, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar mediante cualquier número de vías, incluyendo, pero sin limitación a, oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral, tópica, sublingual, o rectal. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden formular usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en las dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, ges, jarabes, lechadas, suspensiones, y similares, para ingestión por el paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para el uso oral se pueden obtener mediante la combinación de los compuestos activos con excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de los gránulos, después de la adición de auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son cargas de carbohidratos o de proteína., tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa, tales como metil celulosa, hidroxiopropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa de sodio; gomas incluyendo goma arábiga y de tragacanto; y proteínas tales gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Se pueden usar núcleos de grageas junto con revestimientos adecuados, tales como soluciones concentradas de azúcar, que también contienen goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados p mezclas de disolventes. Materias colorantes o pigmentos se pueden añadir a los comprimidos o revestimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad del compuesto activo, es decir, dosificación.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por empuje hechas de gelatina, así como blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por empuje pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga o aglutinantes, tales

como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquido, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

5 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral se pueden formular en soluciones acuosas preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Rin-
ger, o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias
que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. De
manera adicional, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar en forma de suspensiones oleosas de
10 inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sé-
samo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como etil oleato o triglicéridos, o liposomas. Los polímeros de amino
policationicos no lípidicos también se pueden usar para administración. Opcionalmente, la suspensión también puede
contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la prepara-
ción de soluciones altamente concentradas. Para la administración tópica o nasal, se usan en la formulación penetrantes
15 apropiados para que sean perneados por la barrera particular. Tales penetrantes se conocen en general en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar de una manera que se conoce en la
técnica, por ejemplo, mediante mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsificación, en-
capsulación, atrapamiento, o procedimientos de liofilización convencionales. La composición farmacéutica se puede
20 porcionar en forma de una sal y se pueden formar con muchos ácidos, que incluyen, pero no se limitan a, ácido
clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disol-
ventes acuosos u otros protónicos que son las formas de base libre correspondientes. En otros casos, la preparación
preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o todos de los siguientes: 1-50 mM de histidina,
0,1%-2% de sacarosa, y 2-7% de manitol, a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, que se combina con tampón antes de uso.

25 Se pueden encontrar detalles adicionales para la formulación y administración en la última edición de REMING-
TON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). Después de que las composiciones
farmacéuticas se hayan preparado, se pueden colocar en un recipiente adecuado y etiquetarse para tratamiento de una
afección indicada. Tal etiquetado incluiría cantidad, frecuencia, y procedimiento de administración.

30

Indicaciones y procedimientos terapéuticos

Los GPCR son ubicuos en el huésped de mamífero y son responsables de muchas funciones biológicas, que inclu-
35 yen muchas patologías. De acuerdo con lo anterior, es deseable encontrar los compuestos y fármacos que estimulan un
GPCR por una parte. Por ejemplo, los compuestos que activan un GPCR se pueden emplear para propósitos terapéuti-
cos, tales como el tratamiento de COPD, trastornos cardiovasculares, cáncer, trastornos urinarios, obesidad, diabetes,
trastornos del CNS, trastornos del hígado, trastornos del riñón, trastornos de los órganos secretores, asma y trastorno
40 hematológicos. En particular, los compuestos que activan los GPCR son útiles en el tratamiento de diversas dolencias
cardiovasculares tales como las provocadas por la carencia de flujo de sangre pulmonar o hipertensión. Además estos
compuestos también se pueden usar en el tratamiento de diversos tratamientos fisiológicos con relación al control
anormal de fluido homeostasis de electrolitos y en las enfermedades asociadas a la secreción de aldosterona inducida
por angiotensina anormal.

45 En general, los compuestos que inhiben la activación de un GPCR se puede usar para una diversidad de propósitos
terapéuticos, por ejemplo, para el tratamiento de hipotensión y/o hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio,
úlceras, asma, alergias, hipertrofia prostática benigna, y trastornos psicóticos y neurológicos incluyendo esquizofre-
nia, excitación maníaca, depresión, delirio, demencia o retraso mental severo, discinesias, tal como una enfermedad
de Huntington o síndrome de Tourett entre otros. Los compuestos que inhiben los GPCR también son útiles en la
50 reversión de la anorexia endógena, en el control de la bulimia, y en el tratamiento de diversas dolencias cardiovas-
culares tales como las provocadas por excesivo flujo de sangre pulmonar o hipotensión. En particular, la regulación
de GPCR se puede usar para tratar ansiedad, depresión, hipertensión, migraña, trastornos compulsivos, esquizofrenia,
autismo, trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, Parkinsonismo, y corea de Huntington,
y vómitos inducidos por la quimioterapia de cáncer, así como trastornos del sueño y de la alimentación, control del
55 dolor, trastornos que implican la regulación de la temperatura corporal y presión sanguínea.

Obesidad

60 Este gen, proteínas traducidas y agentes que modulan este gen o porciones del gen o sus productos son útiles para
tratar obesidad, sobrepeso, anorexia, caquexia, trastornos de desnutrición, supresión del apetito, aumento de apetito,
incremento o disminución de la saciedad, modulación del peso corporal, y/u otros trastornos de alimentación tal como
bulimia. Obesidad y sobrepeso se definen como un exceso de grasa corporal con relación a la masa corporal magra. Un
incremento en la ingesta calórica o disminución del gasto de energía o ambos pueden hacer que este desequilibrio que
65 conduce a un exceso de energía que produce un almacenamiento de grasa. La obesidad está asociada a importantes
morbosidades médicas y un incremento en la mortalidad. Las causas de obesidad se entienden escasamente y se puede
deber a factores genéticos, factores ambientales o una combinación de los dos que provocan un equilibrio de energía
positiva. Por el contrario, la anorexia y caquexia se caracterizan por un desequilibrio en la toma de energía frente al

gasto de energía que conduce a un equilibrio de energía negativo y pérdida de peso. Los agentes que o bien incrementan el gasto de energía y/o disminución de la toma de energía, absorción o almacenamiento sería útil para tratar obesidad, sobrepeso, y comorbidades asociadas. Los agentes que o bien incrementan la toma de energía y/o disminuyen el gasto de energía o incremento de la cantidad de tejido magro sería útil para el tratamiento de caquexia, anorexia y trastornos de desnutrición.

Este gen, proteínas traducidas y agentes que modulan este gen o partes del gen o su producto también son útiles para tratar obesidad/comorbidades asociadas a sobrepeso incluyendo hipertensión, diabetes de tipo 2, enfermedad arterial coronaria, hiperlipidemia, accidente cerebrovascular, enfermedad de la vesícula biliar, gota, osteoartritis, apnea del sueño y problemas respiratorios, algunos tipos de cáncer incluyendo cáncer de endometrio, de mama, de próstata y de colon, enfermedad trombótica, síndrome de ovario poliquístico; fertilidad reducida, complicaciones de embarazo, irregularidades menstruales, hirsutismo, ésteres, incontinencia, y depresión.

15 *Cáncer*

Los GPCR humanos proporcionan una Diana potencial para el tratamiento de cáncer. El cáncer es una enfermedad provocada fundamentalmente por la transformación celular oncogénica. Existen varios sellos de células transformadas que las distinguen de sus homólogos normales y son el fundamento de la patopsicología de cáncer. Éstos incluyen proliferación celular no controlada, falta de respuesta a las señales que inducen la muerte (inmortalización), incremento de la mortalidad celular e invasividad, aumento de la capacidad de reclutar suministro de sangre mediante la introducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos y (angiogénesis), inestabilidad genética y desregulación de la expresión génica. Diversas combinaciones de estas fisiologías aberrantes junto con la adquisición de la resistencia a fármacos conducen frecuentemente a un estado patológico intratable en el que se produce el fallo orgánico y muerte del paciente.

La mayoría de las terapias de cáncer convencionales dirigen la proliferación celular y dependen de las capacidades proliferativas diferenciales entre las células transformadas y normales para su eficacia. Este planteamiento está dificultado por el hecho de que varios tipos de células normales son también altamente proliferativos y que las células cancerosas frecuentemente se hacen resistentes a estos agentes. De este modo, los índices terapéuticos de las terapias anticáncer raramente exceden de 2.0.

El advenimiento de la identificación de la diana molecular dirigida por el genoma ha abierto la posibilidad de identificación de nuevas dianas específicas de cáncer para la intervención terapéutica que proporcionará tratamientos más seguros, más eficaces para los pacientes de cáncer. De este modo, los genes asociados a tumores recientemente descubiertos y sus productos se pueden ensayar para determinar su(s) papel(es) en la enfermedad y usarse como herramientas para descubrir y desarrollar terapias innovadoras. Los genes que juegan papeles importantes en cualesquiera de los procesos fisiológicos indicados anteriormente se pueden caracterizar como dianas de cáncer.

Los genes o fragmentos de genes identificados mediante el genoma se pueden fácilmente expresar en uno o más sistemas de expresión heterólogos para producir proteínas recombinantes funcionales. Estas proteínas se caracterizan *in vitro* por sus propiedades biológicas y después usarse como herramientas en los programas de selección de alto rendimiento para identificar los moduladores químicos de sus actividades bioquímicas. Los agonistas y/o antagonistas de la actividad de la proteína diana se pueden identificar de esta manera y posteriormente ensayarse en modelos celulares y de enfermedad *in vivo* para la actividad anticáncer. La optimización de los compuestos líder con ensayo iterativo en los modelos biológicos y farmacocinética detallada y análisis toxicológicos forman la base para el desarrollo de fármacos y posterior ensayo en seres humanos.

50 *Diabetes*

La diabetes también se puede tratar potencialmente mediante la regulación de la actividad de GPCR humano. La Diabetes mellitus es un trastorno metabólico común caracterizado por una elevación anormal de la glucosa en sangre, alteraciones en lípidos y anormalidades (complicaciones) en el sistema cardiovascular, ojo, riñón y sistema nervioso. La diabetes se divide en dos enfermedades separadas: diabetes de tipo 1 (aparición juvenil) que se produce por una pérdida de células que fabrican y secretan insulina, y diabetes de tipo 2 (aparición en adultos) que se provoca por un defecto en la secreción de insulina y un defecto en la acción de insulina.

La diabetes de tipo I se inicia por una reacción autoinmune que ataca a las células que secretan insulina (células beta) en los islotes pancreáticos. Los agentes que previenen que esta reacción aparezca o que detiene la reacción antes de la destrucción de las células beta se han llevado a cabo son terapias potenciales para esta enfermedad. Otros agentes que inducen la proliferación de las células beta y regeneración son también terapias potenciales.

La diabetes de tipo II es la más común de las dos afecciones diabéticas (6% de la producción). El defecto en la secreción de insulina es una causa importante de la afección diabética y se propuso por su incapacidad de la célula beta en detectar y responder de manera apropiada a los incrementos de los niveles en sangre con liberación de insulina. Las terapias que incrementan la respuesta por la célula beta a la glucosa ofrecerían un importante tratamiento nuevo para esta enfermedad.

El defecto de la acción de insulina en sujetos con diabetes de tipo II es otra diana para la intervención terapéutica. Los agentes que incrementan la actividad del receptor de insulina en músculo, hígado y grasa provocará una disminución de la glucosa en sangre y una normalización de lípidos en plasma. La actividad del receptor se puede aumentar por los agentes que estimulan directamente el receptor o que incrementa las señales intracelulares del receptor. Otras terapias pueden activar directamente el proceso del fin celular, es decir el transporte de glucosa o diversos sistemas de enzimas, para generar un efecto de tipo insulina y por lo tanto produce un resultado beneficioso. Debido al que los sujetos con sobrepeso tienen una mayor susceptibilidad a la diabetes de tipo II, cualquier agente que reduce el peso corporal es una posible terapia.

Tanto la diabetes de tipo I como de tipo se pueden tratar con agentes que imitan la acción de la insulina o que tratan las complicaciones diabéticas mediante la reducción de los niveles de glucosa en sangre. De manera similar que reduce el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos se pueden usar para tratar las complicaciones oculares que se desarrollan en ambos casos.

COPD

La enfermedad pulmonar (o de las vías respiratorias) obstructiva crónica (COPD) es una afección definida fisiológicamente como obstrucción del flujo de aire que en general se produce a partir de una mezcla de enfisema y obstrucción de las vías respiratorias periféricas debido a la bronquitis crónica (Senior y Shapiro, *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3ª ed., New York, McGraw-Hill, 1998, p. 659-681, 1998; Barnes, *Chest* 117, 10S-14S, 2000). El enfisema se caracteriza por la destrucción de las paredes alveolares que conduce al ensanche de los espacios aéreos del pulmón. La bronquitis crónica se define clínicamente como la presencia de tos productiva crónica durante tres meses en cada uno de los dos años sucesivos. En COPD, la obstrucción de las vías respiratorias es usualmente progresiva y es solamente en parte reversible. Con mucho el factor de riesgo más importante para el desarrollo de COPD es el fumar cigarrillos, aunque la enfermedad no se produce en los no fumadores.

La inflamación crónica de las vías respiratorias es una característica patológica clave de COPD (Senior & Shapiro, 1998). La población de células inflamatorias comprende números crecientes de macrófagos, neutrófilos, y linfocitos CD8+. Los irritantes inhalados, tal como el fumar cigarrillos, macrófagos activados que son residentes en el tracto respiratorio, así como las células epiteliales que conducen a la liberación de quimioquinas (por ejemplo, interleuquina-8) y otros factores quimiotácticos. Estos factores quimiotácticos actúan para incrementar el tráfico de neutrófilos/monocitos desde la sangre en el tejido pulmonar y vías respiratorias. Los neutrófilos y monocitos reclutados en las vías respiratorias pueden liberar una diversidad de mediadores potencialmente perjudiciales tales como enzimas proteolíticas y especies de oxígeno reactivas. La degradación de matriz y enfisema, junto con el engrosamiento de la pared de las vías respiratorias, disfunción de tensioactivos, e hipersecreción de moco, son todas secuelas potenciales de esta respuesta inflamatoria que conducen a la alteración de las vías respiratorias e intercambio de gas.

Han estado implicados varios GPCR en la patología de COPD. Por ejemplo, la quimioquina IL-8 actúa mediante CXCR1 y CXCR2, y antagonistas para estos receptores están bajo investigación como agentes terapéuticos para COPD. Los miembros de la familia de P2Y de receptores metabotrópicos pueden jugar papeles claves en la función pulmonar normal. En particular, el receptor P2Y₂ se cree que está implicado en la regulación de los mecanismos de eliminación de eliminación en el pulmón, y los agonistas de este receptor pueden estimular la eliminación del moco de las vías respiratorias en pacientes con bronquitis crónica (Yerxa Johnson, *Drugs of the Future* 24, 759-769, 1999). Por lo tanto los GPCR, son dianas terapéuticas para COPD, y la identificación de miembros adicionales de las familias existentes de GPCR o de GPCR novedosos conduciría a dianas atractivas adicionales.

Trastornos Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares incluyen los siguientes trastornos del corazón e insuficiencia cardíaca congestiva sistémica vascular, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas, del corazón, todos los tipos de arritmias atriales y ventriculares, enfermedades vasculares hipertensivas, y enfermedades vasculares periféricas.

La insuficiencia cardíaca se define como un estado patogénico en el que una anomalía de la función cardíaca es responsable de la insuficiencia cardíaca para bombear sangre a una velocidad conmensurable con el requerimiento del tejido metabolizante. Incluye todas las formas de insuficiencia en el bombeo, tal como alto rendimiento y bajo rendimiento, aguda y crónica, del lado derecho y del lado izquierdo, sistólico o diastólico, independiente de la causa subyacente.

El infarto de miocardio (MI) está en general provocado por una disminución abrupta en el flujo de sangre coronario (que sigue a una oclusión trombótica de una arteria coronaria que se ha estrechado previamente por la arteriosclerosis. Se incluye la profilaxis de MI (prevención primaria y secundaria), así como el tratamiento agudo de MI y la prevención de las complicaciones.

Las enfermedades isquémicas son condiciones en las que el flujo coronario está restringido que da como resultado una perfusión que es inadecuada para reunir el requerimiento miocardio de oxígeno. Este grupo de enfermedades incluye angina estable, angina inestable, e isquemia asintomática.

Las arritmias incluyen todas las formas de una taquiarritmias atriales y ventriculares (taquicardia atrial, palpitación atrial, fibrilación atrial, taquicardia reentrante atrio ventricular, síndrome de excitación previa, taquicardia ventricular, palpitación ventricular, y fibrilación ventricular), así como formas braquicárdicas de arritmias.

- 5 Las enfermedades vasculares incluyen hipertensión arterial primaria así como todos los tipos secundarios (renal, endocrino, neurogénico, otros). El gen descrito y su producto se puede usar como dianas de fármaco para el tratamiento de hipertensión así como para la prevención de todas las complicaciones. Las enfermedades periféricas vasculares se definen como enfermedades vasculares en las que el flujo arterial y/o venoso se reduce dando como resultado un desequilibrio entre el suministro de sangre y demanda de oxígeno de tejidos. Incluye la enfermedad arterial oclusiva periférica crónica (PAOD), trombosis arterial aguda y embolia, trastornos vasculares inflamatorios, fenómeno de Raynaud, y trastornos venosos.

Trastornos del CNS

- 15 Los trastornos del sistema nervioso central y periférico también se pueden tratar, como trastornos primarios y secundarios después de la lesión de cerebro, los trastornos de humor, trastornos de ansiedad, trastornos de pensamiento y voluntad, trastornos de sueño y del completo despertar, enfermedades de la unidad motora, tales como trastornos neurogénicos y miopáticos trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, y procesos de dolor periférico y crónico.

- 25 El dolor que está asociado a los trastornos de SNC también se puede tratar mediante la regulación de la actividad de GPCR humano. El dolor que se puede tratar incluye el asociado a trastornos del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, ciática, síndrome de l fallo de la cirugía de la espalda, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Parkinson, post-apoplejía, y lesiones vasculares en el cerebro y médula espinal (por ejemplo, infarto, hemorragia, malformación vascular). El dolor neuropático no central incluye el asociado con el dolor después de la mastectomía, distrofia simpática refleja (RSD), neuralgiadioculopatía trigeminal, dolor después de la cirugía, dolor relacionado con VIH/SIDA, dolor de cáncer, neuropatía (por ejemplo, neuropatía diabética, neuropatía vasculítica secundaria al la enfermedad de tejido conectivo), polineuropatía para neoplásica asociada, por ejemplo, a carcinoma de pulmón, o leucemia, o linfoma, o carcinoma de próstata, colon o estómago, neuralgia trigeminal, neuralgia craneal, y neuralgia post-herpética. El dolor asociado a cáncer y tratamiento de cáncer también se pueden tratar, como puede ser dolor de cefalea (por ejemplo, migraña con aura, migraña sin aura, y otros trastornos de migraña), cefalea de tipo tensión episódica y crónica, cefalea de tipo tensión, cefalea de racimos, y hemicrania paroxismal crónica.

- 35

Asma

- 40 La alergia es un proceso complejo en el que los antígenos ambientales inducen reacciones clínicamente adversas. La inducción de antígenos, llamados alérgenos, típicamente inducen una respuesta específica de IgE y, aunque en la mayoría de los casos los propios alérgenos tienen poca o ninguna toxicidad intrínseca, inducen patología cuando la respuesta de IgE a su vez induce una reacción de hipersensibilidad dependiente de IgE o dependientes de las células T. Las reacciones de hipersensibilidad pueden ser locales o sistémicas y se producen típicamente en unos minutos de exposición alérgeno en individuos que se han sensibilizado previamente a un alérgeno. La reacción de hipersensibilidad de alergia se desarrolla cuando el alérgeno se reconoce por los anticuerpos de IgE unidos a los receptores específicos sobre la superficie de las células efectoras, tales como mastocitos, basófilos, o eosinófilo, que provoca la activación de las células efectoras y la liberación de mediadores que producen los signos y síntomas agudos de las reacciones. Las enfermedades alérgicas incluyen asma, rinitis alérgica (fiebre del heno), dermatitis atópica, y anafilaxis.

- 50 El asma se piensa que surge como resultado de interacciones entre factores genéticos y ambientales múltiples y se caracteriza por tres características principales: 1) obstrucción de las vías intermitente y reversible provocada por la broncoconstricción, aumento de la producción de moco, y engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias que conduce a un estrechamiento de las vías respiratorias, 2) hipersensibilidad de las vías respiratorias provocada por una disminución del control del calibre de las vías respiratorias, y 3) inflamación de las vías respiratorias. Ciertas células son críticas para la reacción inflamatorias de asma e incluyen las células T y células que presentan antígeno, células B que producen IgE, y mastocitos, basófilos, eosinófilos, y otras células que se unen a IgE. Estas células efectoras se acumulan en el sitio de la reacción alérgica en las vías respiratorias y liberan productos tóxicos que contribuyen a la patología aguda y eventualmente a la destrucción de tejidos relacionada con el trastorno. Otras células residentes, tales como células del músculo liso, células epiteliales de pulmón, células que producen moco, y células nerviosas también pueden ser anormales en individuos con asma y pueden contribuir a la patología. Mientras que la obstrucción de las vías respiratorias de asma, que se presentan clínicamente como una respiración intermitente y brevedad en la respiración, es en general el síntoma de mayor presión de la enfermedad que requiere tratamiento inmediato, la inflamación y destrucción de tejidos asociado a la enfermedad puede conducir a cambios irreversibles que eventualmente producen asma un trastorno incapacitante crónico que requiere la dirección a largo plazo.

- 65 A pesar de los avances recientes importantes en nuestra comprensión de la patofisiología de de asma, la enfermedad parece que se incrementa en la frecuencia y gravedad (Gergen y Weiss, Am. Rev. Respir. Dis. 146, 823-24, 1992). Se estima que entre 30-40% de la población padece alergia atópica, y un 15% de niños y un 5% de adultos de

la población padece asma (Gergen y Weiss, 1992). De este modo, se coloca una enorme carga en nuestros recursos de atención sanitaria. Sin embargo, tanto la diagnosis como tratamiento de asma son difíciles. La gravedad de la inflamación de los tejidos de pulmón no es fácil de medir y los síntomas de la enfermedad a menudo son indistinguibles de las infecciones respiratorias, trastornos inflamatorios respiratorios crónicos, rinitis alérgica, u otros trastornos respiratorios. A menudo, el alérgeno incitante no se puede determinar, realizando la eliminación del difícil agente ambiental. Los tratamientos farmacológicos actuales padecen su propio establecimiento de desventajas. Los agentes terapéuticos comúnmente usados, tales como agonistas beta, pueden actuar como supresores del síntoma para mejorar la función pulmonar, pero no afectan a la inflamación subyacente. Los agentes que pueden reducir la inflamación subyacente, tales como esteroides antiinflamatorios, pueden tener inconvenientes principales que se extienden desde la inmunosupresión de la pérdida ósea (Goodman y Gilman's THE PHARMACOLOGIC BASIS OF THERAPEUTICS, séptima edición, MacMillan Publishing Company, NY, USA, 1985). Además, muchas de las terapias actuales, tales como corticosteroides inhalados, son de corta duración, inconvenientes de uso, y se deben usar a menudo en base regular, en algunos casos para la vida, que hace que fracase que los pacientes cumplan con el tratamiento de un problema principal y por lo tanto reduciendo su eficacia como un tratamiento.

Debido a los problemas asociados a las terapias convencionales, se han evaluado estrategias de tratamiento alternativos. La glicoforina A (Chu y Sharom, Cell. Immunol. 145, 223-39, 1992), ciclosporina (Alexander *et al.*, Lancet 339, 324-28, 1992), y un fragmento nonapeptídico de IL-2 (Zav'yalov *et al.*, Immunol. Lett. 31, 285-88, 1992) inhiben todos la proliferación de linfocitos T dependientes de interleuquina-2; sin embargo se conoce que tienen otros muchos efectos. Por ejemplo, la ciclosporina se usa como un inmunosupresor después del trasplante de órganos. Mientras estos agentes pueden representar alternativas a los esteroides en el tratamiento de asmáticos. Inhiben los linfocitos T dependientes de la interleuquina-2 y potencialmente las funciones inmunes críticas asociadas a homeostasis. Otros tratamientos que bloquean la liberación o actividad de los mediadores de la broncoconstricción, tales como cromosomas o antileucotrienos, se han introducido recientemente para el tratamiento de se asma suave, pero son caros y no son eficaces en todos los pacientes y no está claro si tienen algún efecto sobre los cambios crónicos asociados la inflamación asmática. Los que se necesita en la técnica es la identificación de un tratamiento que puede actuar en las rutas críticas para el desarrollo de asma que tanto bloquee los ataques episódicos del trastorno como preferentemente diluye la respuesta inmunológica alérgica hiperactiva sin un compromiso inmune del paciente.

Trastornos hematológicos

Los receptores acoplados a la proteína de unión de guanina-nucleótido - (G-) (GPCRs) están implicados en diversos procesos hematopoyéticos, por ejemplo proliferación, diferenciación, supervivencia, migración y direccionamiento de las células precursoras a los tejidos hematopoyéticos y linfoides. La disfunción de los GPCR puede conducir a una producción inapropiada de las células sanguíneas que dan como resultado enfermedades de tipo anemia, leucopenia, trombocitopenia o formas diferentes de leucemia.

Los GPCR también juegan un papel en las diversas funciones de los glóbulos blancos circulantes por ejemplo, activación de la respuesta inmune en linfocitos, producción de citoquinas por los monocitos y quimiotaxis de granulocitos. La función de los GPCR puede contribuir a la función inmune comprometida, alergia y otras afecciones patológicas del sistema de defensa del huésped.

En las plaquetas circulantes los GPCRs median la activación que da como resultado la agregación y secreción de plaquetas de los mediadores que eventualmente conducen a hemostasis. La modulación de la función de los GPCR en las plaquetas mediante procedimientos farmacológicos o de genética molecular han demostrado papeles clave de los GPCR en enfermedades trombóticas y en los trastornos hemorrágicos que proporcionan de esta manera que los GPCR representen dianas de fármacos terapéuticos apropiados.

Los GPCR se activan mediante la unión de diversas clases de ligandos que varían entre moléculas pequeñas de tipo serotonina y péptidos moleculares de alto peso molecular de tipo quimioquinas. Algunos de los GPCR están activados mediante escisión proteolítica, por ejemplo trombina. Tras la unión del ligando, las señales de los GPCR están mediadas mediante proteínas G heterotriméricas con la clase de la subunidad α que determina la la transducción de la señal de la ruta adicional.

Se puede concebir que los genes que codifican los GPCR "no convencionales" con los ligandos no identificados o rutas de transducción de señal intracelular desconocidas (por ejemplo, proteínas G novedosas) o los de los GPCR de las clases ya que todavía no están asociados a los sistemas hemetopoyéticos y homeostáticos se identificarán. Por lo tanto es razonable asumir que los GPCR expresados específicamente en el precursor hematopoyético o células sanguíneas circulantes representan buenas dianas para las intervenciones terapéuticas de las disfunciones de hematopoyesis y hemostasis. Yang M., Srikaiathachom A, Antony M., Chong B.H.; Blood Coagul. Fibrinolysis 1996, 127-33; Arai H., Tsou C.L., Charo I.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14495-14499, 1997; Aragay A.M., Quick M.W.; J. Biol. Chem. 274, 4807-4815, 1999; Davignon I., Catalina M.D., Smith D., Montgomery J., Croy J., Siegelman M., Wilkie T.M.; Mol. Cell. Biol. 20, 797-804, 2000; Wiesmann A., Spangrude G.J.; Exp. Hematol. 27, 946-955, 1999; Van Brooklyn J.R., Graler M.H., Bernhardt G., Hobson J.P., Lipp M., Spiegel S.; Blood 95, 2624-2629, 2000; Brass L.F.; J. Clin. Invest. 104, 1663-1665, 1999; Coughlin S.R.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11023-11027, 1999.

Trastornos urinarios

Incontinencia urinaria. La incontinencia urinaria (UI) es la pérdida involuntaria de orina. La incontinencia urinaria de urgencia (UUI) es uno de los tipos más comunes de UI conjuntamente con la incontinencia urinaria de estrés (SUI), que está normalmente provocada por un defecto en el mecanismo de cierre uretral, UUI está a menudo asociada a trastornos o enfermedades neurológicas que provocan daños neuronal, tal como demencia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, apoplejía, y diabetes, aunque también se produce en individuos con tales trastornos. Una de las causas usuales de UUI es la vejiga hiperactiva (OAB), que es una afección médica que se refiere a los síntomas de frecuencia y urgencia derivadas de las contracciones anormales e inestabilidad del músculo detrusor.

Existen varias medicaciones para la incontinencia urinaria en el mercado hoy, principalmente para ayudar al tratamiento de UUI. La terapia para OAB se centra en los fármacos que afectan a los mecanismos de control neural periféricos de los que actúan directamente sobre la contracción del músculo liso del detrusor de la vejiga, con un mayor énfasis en el desarrollo de agentes anticolinérgicos. Estos agentes pueden inhibir los nervios parasimpáticos, que controlan el vaciado de la vejiga, o pueden ejercer un efecto espasmódico directo sobre el músculo detrusor de la vejiga. Esto da como resultado una disminución de la presión intravesicular, un incremento en la capacidad, y una reducción en la frecuencia de la contracción de la vejiga. Los fármacos anticolinérgicos activos por vía oral, tal como propantelina (ProBanthine), tolterodina tartrato (Detrol), y oxibutirina (Ditropan), son los fármacos más comúnmente prescritos. Sin embargo, sus inconvenientes más serios son los efectos secundarios inadecuados, tales como boca seca, visiones anormales, estreñimiento, y alteraciones del sistema nervioso central. Estos efectos secundarios conducen a un escaso cumplimiento. Los síntomas de boca seca solos son responsables de un 70% de tasa de no cumplimiento con oxibutirina. Las fastas de adecuación de las presentes terapias destacan la necesidad de fármacos novedosos, eficaces, seguros, disponibles por vía oral que tienen menos efectos secundarios.

Hiperplasia prostática benigna

La hiperplasia prostática benigna (BPH) es la hiperplasia benigna nodular de la glándula de la próstata periuretral que se observa de manera común en los hombres por encima de la edad de 50 años. El exceso de crecimiento se produce en el área central de la llamada la zona de transición, que envuelve la uretra. La BHP provoca grados variables de obstrucción de la salida de la vejiga, dando resultado síndromes del tracto urinario inferior progresivos (LUTS) caracterizados por frecuencia urinaria, urgencia, y nocturna debida al vaciado incompleto y relleno rápido de la vejiga. La causa actual de BHP es desconocida pero puede implicar alteraciones relacionadas con la edad en el equilibrio de hormonas sexuales esteroides.

Los antagonistas selectivos del $\alpha 1$ -adrenoceptor, tales como prazosina, indoramina, y tamsulosina, se usan como un auxiliar en el tratamiento sintomático de la obstrucción urinaria provocada por BHP, aunque no afectan a la causa subyacente BPH. En BPH, el incremento del tono simpático exacerba el grado de obstrucción de la uretra mediante la contracción del músculo liso prostático y uretral. Estos compuestos inhiben la actividad simpático, relajando por lo tanto el músculo liso del tracto urinario. Se deben desarrollar para el tratamiento antagonistas $\alpha 1$ y antagonistas $\alpha 1$ con alta selectividad de tejido para el músculo liso del tracto urinario inferior que no provoquen efectos secundarios hipotensivos.

Se han usado fármacos que bloquean dihidrato esterona para reducir el tamaño de la próstata. Los inhibidores de la 5α -reductasa tales como finasterida se prescriben para BPH. Estos agentes inhiben selectivamente la 5α -reductasa que media la conversión de la testosterona a dihidrotestosterona, reduciendo por lo tanto los niveles de dihidrotestosterona en plasma y, de este modo, el desarrollo de la próstata. Los inhibidores de la 5α -reductasa no se unen a los receptores de andrógeno y no afectan a los niveles de testosterona, ni poseen efectos secundarios feminizantes.

Los antagonistas de los receptores de andrógenos se usan para el tratamiento de hiperplasia prostática debida a la excesiva acción o producción de la testosterona. Están bajo investigación diversos antagonistas para BPH incluyendo derivados de clomadiona sin actividad estrogénica, inhibidores de la aromatasa activos por vía oral, y los análogos de la hormona que libera la hormona luteinizante (LHRH).

Trastornos hepáticos

Todas las enfermedades hepáticas crónicas provocan el desarrollo de fibrosis en el hígado. La fibrosis es una respuesta a la curación de herida uniforme programada. Las enfermedades hepáticas crónicas más importantes son hepatitis B y C viral y enfermedad hepática inducida por el alcohol. Entre 10 y 30% de los pacientes afectados desarrollan cirrosis como una complicación posterior. La cirrosis hepática tiene una tasa de supervivencia del 50% en cinco años. Las muestras por cirrosis hepática se produce a una edad promedio de solamente 60 años. Es la 9ª causa mayor de muerte en los Estados Unidos.

El daño o lesión tóxico provocado por las proteínas foráneas provocan la deposición de la matriz extracelular tal como colágeno fibronectina y laminina. El mecanismo común es la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas que almacenan la vitamina A (células Ito) en los miofibroblastos que producen la matriz. Éstas proliferan y llenan el espacio extracelular de Disse con la matriz extracelular. Este proceso contiene las etapas de

activación para- y autocrinas, que provocan que se lleguen a perpetuar, si el proceso de lesión se sostiene durante un largo período de tiempo. Provoca una desviación progresivamente lenta, que reduce la barrera de difusión mediante una pérdida de la fenestración en el endotelio sinusoidal. Esto colabora a la pérdida de la función. La hipertensión portal con la frecuente complicación de la hemorragia esofágica.

Causas de muerte.

30% de coma hepático

30% de hemorragia esofágica

30% de carcinoma hepático primario

Se pueden tratar la fibrosis y cirrosis hepática provocadas por enfermedades degenerativas crónicas del hígado tales como hepatitis viral, hepatitis alcohólica, hepatitis autoinmunes, cirrosis biliar primaria, fibrosis quística, hematócromatosis, enfermedad de Wilson, hepatitis no alcohólica y otras. Otras posibles indicaciones son esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis miocárdica, y fibrosis prostática.

La patogénesis de la fibrosis hepática implica la proliferación alterada y expresión génica de múltiples tipos de células tales como células estrelladas hepáticas y colangiocito. Estos cambios provocan alteración del contenido en colágeno y alteración de la deposición del tejido conectivo, retención de agua, colestasis, etc. Muchos procesos de interacción ligando - receptor están implicados en estos cambios. Entre los ligandos están vasopresina, secretina, péptido intestinal vasoactivo, etc., usando todas rutas de transducción de señal mediada por el receptor acoplado a la proteína G. Endotelina, bradiquinina, angiotensinas y purinas, todas señalización mediante los receptores acoplados a la proteína G, se ha demostrado que tienen el potencial de modular la fibrosis quística y sobrevenir complicaciones tales como hipertensión portal, desregulación cardiovascular y electrolítica. Se puede asumir que se pueden detectar receptores novedosos de esta clase. El receptor acoplado a la proteína G es una clase diana probada para muchos indicadores. Por lo tanto receptores acoplados a la proteína G novedosa serán buenas dianas para la intervención terapéutica de fibrosis hepática. Kojima *et al.*, J Hepatol enero de 2000; 32 (1): 43-50; Pinzani *et al.*, Semin Liver Dis 1999; 19 (4): 397-410; Cai *et al.*, Anticancer Res mayo junio de 1999; 19 (3B): 2243-7; Wirth *et al.*, Eur J Pharmacol 1997 Oct 15; 337 (1): 45-53; Gatta *et al.*, Ital J Gastroenterol Hepatol mayo de 1999 May; 31 (4): 326-45; Albrecht *et al.*; Drug Targeting 6 (2) (1998): 105-117; Ramos *et al.*, Pathol Int septiembre de 1994 Sep; 44 (9): 655-61; Hidalgo *et al.*, J. Autonom. Pharmacol. 18 (1) (1998): 31-37.

Esta invención además pertenece al uso de agentes novedosos identificados por los ensayos de selección descritos anteriormente. De acuerdo con lo anterior, está dentro del alcance de esta invención usar un compuesto de ensayo identificado como se ha descrito en el presente documento en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente identificado como se describe en el presente documento (por ejemplo, un agente modulador, una molécula de ácido nucleico no codificante, un anticuerpo específico, ribozima, o una molécula de unión del polipéptido de GPCR) se puede usar en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad, o efectos secundarios de tratamiento con tal agente. Como alternativa, una gente identificado como se ha descrito en el presente documento se puede usar en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de tal agente. Además, esta invención pertenece a los usos de agentes novedosos identificados por los ensayos de selección descritos anteriormente para los tratamientos como se ha descrito en el presente documento.

Un reactivo que afecta a la actividad de GPCR se puede administrar a una célula humana, o bien *in vitro* o *in vivo*, para reducir la actividad de GPCR. El reactivo preferiblemente se une a un producto de expresión de un gen de GPCR humano. Si el producto de expresión es una proteína, es reactivo es preferiblemente un anticuerpo. Para el tratamiento de las células humanas *ex vivo*, se puede añadir un anticuerpo a una preparación de células troncales distintas de las células embrionarias humanas que se han eliminado del cuerpo. Después las células se pueden reemplazar en el mismo u otro cuerpo humano, con o sin propagación clonal, como se conoce en la técnica. En una realización, el reactivo se administra usando un liposoma. Preferiblemente, el liposoma es estable en el animal en el que se ha administrado durante al menos aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 1 hora, e incluso más preferiblemente durante al menos aproximadamente 24 horas. Un liposoma comprende una composición lipídica que es capaz de dirigir yb reactivo, particularmente un polinucleótido, a un sitio particular en un animal, tal como un ser humano. Preferiblemente, la composición lipídica del liposoma es capaz de dirigir un órgano específico de un animal, tal como el pulmón, hígado, bazo, corazón, cerebro, ganglios linfáticos, y piel.

Un liposoma útil en la presente invención comprende una composición lipídica que es caapz de condensarse con la membrana plasmática de la célula dirigida para administrar su contenido a la célula. Preferiblemente, la eficiencia de la transfección de un liposoma es aproximadamente 0,5 μg de ADN por 16 nmole de liposoma administrado a aproximadamente 10^6 células, más preferiblemente aproximadamente 1,0 μg de ADN por 16 nmoles de liposoma administrado a 10^6 células, e incluso más preferiblemente aproximadamente 2,0 μg de ADN por 16 nmol de liposoma administrado a aproximadamente 10^6 células. Preferiblemente, un liposoma está entre aproximadamente 100 y 500 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 150 y 450 nm, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 400 nm de diámetro.

Los liposomas adecuados para uso en la presente invención incluyen los liposomas usados de manera convencional, por ejemplo, procedimientos de administración génica conocidos por los expertos en la técnica. Los liposomas más preferidos incluyen liposomas que tienen una composición lipídica polianiónica y/o liposomas que tienen una estructura central de colesterol conjugada a polietilén glicol. Opcionalmente, un liposoma comprende un compuesto capaz de dirigir el liposoma a una célula tumoral, tal como un ligando de célula tumoral expuesto sobre la superficie externa del liposoma.

La formación de complejos de un liposoma con un reactivo tal como un oligonucleótido no codificante o ribozima se puede lograr usando los procedimientos que son convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.705.151). Preferiblemente, entre aproximadamente 0,1 μg y aproximadamente 10 μg de polinucleótido se combina con aproximadamente 8 nmol de liposomas, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 μg y aproximadamente 5 μg de polinucleótidos se combinan con aproximadamente 8 nmol de liposomas, e incluso más preferiblemente aproximadamente 1,0 μg de polinucleótidos se combina con aproximadamente 8 nmol de liposomas.

En otra realización, los anticuerpos se pueden administrar a tejidos específicos *in vivo* usando la administración dirigida mediada por receptor. Las técnicas de administración de ADN mediada por receptor se enseñan, por ejemplo, en Findeis *et al.* Trends in Biotechnol. 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS y APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 266, 338-42 (1991).

Determinación de una dosis terapéuticamente eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está también dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz a la de la cantidad de ingrediente eficaz que incrementa o disminuye la actividad de GPCR con relación a la actividad de GPCR que se produce en la ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o bien en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiada y vía de administración. Después tal información se puede usar para determinar las dosis útiles y vías para la administración a seres humanos.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o bien en los ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y vía de administración. Tal información después se puede usar para determinar las dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

La eficacia y toxicidad terapéutica, por ejemplo, DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50% de la población) y la DL_{50} (la dosis letal al 50% de la población), se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en los cultivos celulares o animales experimentales. La relación de dosis de toxicidad para los efectos terapéuticos es en índice terapéutico, y se puede expresar como la relación $\text{DL}_{50}/\text{DE}_{50}$.

Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de los cultivos de células y estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de la dosificación para uso humano. La dosificación contenida en tales composiciones es preferible dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la D_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, sensibilidad del paciente, y la vía de administración.

La dosificación exacta se determinará por el facultativo, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar los niveles suficientes del ingrediente activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, salud general del sujeto, edad, peso, y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción, y tolerancia/respuesta a la terapia. Composiciones farmacéuticas de larga duración se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la tasa de semivida y eliminación de la formulación particular.

Las cantidades de dosificación normales pueden variar entre 0,1 y 100,000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. La guía para dosificaciones particulares y procedimientos de administración se proporcionan en la bibliografía y en general están disponibles para los facultativos en la técnica. Los expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para los nucleótidos que para las proteínas o sus inhibidores. De manera similar, la administración de polinucleótidos o polipéptidos serán específicos para las células, condiciones, localizaciones, particulares etc.

Si el reactivo es un anticuerpo de una sola cadena, los polinucleótidos que codifican el anticuerpo se pueden construir e introducir en una célula o bien *ex vivo* o *in vivo* usando las técnicas bien establecidas que incluyen, pero no se limitan a, transferencia de ADN mediada por policondones de transferencia, transfección con ácidos nucleicos desnudos

o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de perlas de látex revestidos con ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación "pistola de genes" y transfección mediada por DEAE o fosfato de calcio.

- 5 Las dosificaciones eficaces *in vivo* de un anticuerpo están en el intervalo de aproximadamente 5 μg y aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aproximadamente 50 μg y aproximadamente 5 mg/kg , aproximadamente 100 μg y aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente, y aproximadamente 200 y aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente. Para la administración de los polinucleótidos que codifican anticuerpos de una sola cadena, las dosificaciones eficaces *in vivo* están en el intervalo de aproximadamente 100 ng y aproximadamente 200 ng, 500 ng y aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 μg y aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 μg y aproximadamente 500 μg , y aproximadamente 20 μg y aproximadamente 100 μg de ADN.

- 15 Si el producto de expresión es ARNm, el reactivo es preferiblemente un oligonucleótido no codificante o una ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos no codificantes o ribozimas se pueden introducir en las células mediante una diversidad de procedimientos, como se ha descrito.

- 20 Preferiblemente, un reactivo reduce la expresión de un gen de GPCR o la actividad de un polipéptido de GPCR mediante al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 50, más preferiblemente aproximadamente 75, 90, o 100% con relación a la ausencia del reactivo. La eficacia del mecanismo elegido para disminuir el nivel de expresión de un gen de GPCR o la actividad de un polipéptido de GPCR se puede determinar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como hibridación de las sondas nucleótidos para el ARNm específico de GPCR, RT-PCR cuantitativa, detección inmunológica de un polipéptido de GPCR, o medición de la actividad de GPCR.

- 25 En cualquiera de las reivindicaciones descritas anteriormente, cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos adecuados. La selección de los agentes apropiados para uso en la terapia de la combinación se puede preparar por los expertos en la técnica, de acuerdo con los principios farmacéuticos convencionales. La combinación de los agentes terapéuticos puede actuar de manera sinérgica para efectuar el tratamiento o prevención de las diversas enfermedades descritas anteriormente. Usando este planteamiento, se puede ser capaz de lograr eficacia terapéutica con dosificaciones inferiores de cada agente, reduciendo de esta manera el potencial para los efectos secundarios adversos.

- 30 Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos anteriormente se pueden aplicar a cualquier sujeto en necesidad de tal terapia, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como as perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y lo más preferiblemente, seres humanos.

35

Procedimientos de diagnóstico

- 40 Los GPCR también se pueden usar en ensayos diagnósticos para detectar enfermedades y anomalías o susceptibilidad a enfermedades y anomalías relacionadas con la presencia de mutaciones en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un GPCR. Tales enfermedades, a modo de ejemplo, están relacionadas con la transformación de células, tales como tumores y cánceres, y diversos trastornos cardiovasculares, incluyendo hipertensión e hipotensión, así como enfermedades que surgen del flujo de sangre anormal, secreción de aldosterona inducida por angiotensina, y otro control anormal de fluido y homeostasis de electrolitos.

45

Se pueden determinar diferencias entre la secuencia de ADNc o genómica que codifica un GPCR en los individuos aquejados pero no en los individuos normales, después la mutación es probablemente el agente causante de la enfermedad.

- 50 La diferencia de secuencias entre un gen de referencia que tiene mutaciones se pueden revelar mediante el procedimiento de secuenciación de ADN directa. Además, los segmentos de ADN clonados se pueden emplear como sondas para detectar los segmentos específicos de ADN. La sensibilidad de este procedimiento se potencia en gran medida cuando se combina con PCR. Por ejemplo, se puede usar un cebador de con un producto de PCR de doble cadena o una molécula de molde de una sola cadena generada por una PCR modificada. La determinación de la secuencia se realiza mediante procedimientos convencionales usando nucleótidos marcados radiactivamente o mediante procedimientos de secuenciación automática que usan etiquetas fluorescentes.

- 60 Los ensayos genéticos basados en las diferencias de secuencia de ADN se pueden llevar a cabo mediante la detección de la alteración en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN en geles con o sin agentes desnaturizantes. Las pequeñas supresiones e inserciones de las secuencias se pueden visualizar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de diferentes secuencias se pueden distinguir sobre geles de gradientes de desnaturizante en los que las movilidades de los diferentes fragmentos de ADN se retrasan en el gel en diferentes posiciones de acuerdo con sus temperaturas de fusión específica o de fusión parcial (véase, por ejemplo, Myers *et al.*, Science 230, 1242, 1985). Los cambios de secuencias en las localizaciones específicas también se pueden revelar mediante ensayos de protección de nucleasa, tales como ARNasa y protección S1 o el procedimiento de escisión química (por ejemplo, Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401, 1985). De este modo, la detección de una secuencia de ADN específica se puede realizar mediante procedimientos tales como hibridación, protección de ARNasa, escisión química, escisión química, secuenciación de ADN directa o el uso de

65

enzimas de restricción y transferencia de Western de ADN genómico. Además de los procedimientos directos tales como electroforesis en gel y secuenciación de ADN, las mutaciones también se pueden detectar mediante análisis *in situ*.

La alteración de los niveles de un GPCR también se pueden detectar en diversos tejidos. Los ensayos usados para detectar los niveles de los polipéptidos receptores en una muestra de tejido, tal como sangre o biopsia de tejidos, derivados de un huésped son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia de W, y ensayos de ELISA.

Todas las patentes y solicitudes de patente citadas en esta descripción se incorporan expresamente en el presente documento por referencia. La descripción anterior en general describe la presente invención. Un entendimiento más completo se puede obtener mediante referencia de los ejemplos específicos que se proporcionan para los propósitos de ilustración solamente y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Detección de la actividad de GPCR de tipo receptor de la raíz dorsal

El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 se inserta en el vector de expresión pCEV4 y el polipéptido de tipo receptor de raíz dorsal del vector de expresión pCEV4 de GPCR obtenido se transfecta en las células 233 de riñón embrionario humano. Las células se retiran del matraz de cultivo en 5 ml de Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 7,5, y se lisan mediante sonicación. Los lisados de células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos 4°C. El sobrenadante se centrifuga a 30,000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se suspende en tampón de unión que contiene 50 mM Tris HCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,5, suplementado con 0,1% BSA, 2 mg/ml de aprotinina, 0,5 mg/ml de leupeptina, y 10 mg/ml de fosforamidón. Las diluciones de suspensión de membrana óptimas, definidas como la concentración de proteína requerida para unirse menos del 10% y un radioligando se añaden a placas de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos que contienen ligando, péptidos no marcados, y tampón de unión hasta un volumen final de 250 µl.

En los ensayos de saturación de equilibrio, las preparaciones de membrana se incuban en presencia de concentraciones crecientes (0,1 nM a 4 nM) de ligando 125I.

Las mezclas de reacción de unión se incuban durante 1 hora a 30°C. La reacción se detiene mediante filtración a través de filtros de GF/B tratados con 0,5% de polietilenimina, usando un recolector de células. La radiactividad se mide mediante conteo de centelleo y los datos se analizan mediante un programa de regresión no lineal computarizado. La unión no específica se define como la cantidad de radiactividad remanente después de incubación de la proteína de la membrana en presencia de 100 nM de péptido no marcado. La concentración de proteína se mide mediante el procedimiento de Bradford usando reactivo Bio-Rad, con albúmina sérica bovina como estándar. Se demuestra la actividad de GPCR de tipo receptor de la raíz dorsal del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 2

Ensayos de unión de radioligandos

Células 293 de riñón embrionario humano transfectadas con un polinucleótido que expresa GOCR humano se retiran de un matraz de cultivo en 5 ml de Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 7,5, y se lisan mediante sonicación. Los lisados de células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifuga a 30.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se suspende en tampón de unión que contiene 50 mM Tris HCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,5, suplementado con 0,1% de BSA, 2 µg/ml aprotinina, 0,5 mg/ml de leupeptina, y 10 µg/ml fosforamidón. Las diluciones de suspensiones de membranas óptimas, definidas como la concentración de proteína requerida para unirse menos del 10% del radioligando añadido, se añaden a placas de microtitulación de polietileno de 96 pocillos que contienen ligando marcado con ¹²⁵I o compuesto de ensayo, péptidos no marcados, y tampón de unión hasta un volumen final de 250 µl.

En los ensayos de unión de saturación de equilibrio, las preparaciones de membrana se incuban en presencia de concentraciones crecientes (0,1 nM a 4 nM) de ligando marcado con ¹²⁵I o compuesto de ensayo (actividad específica 2200 Ci/mmol). Las afinidades de unión de los diferentes compuestos de ensayo se determinan en ensayos de unión de competición de equilibrio, usando 0,1 nM de péptido ¹²⁵I en presencia de doce concentraciones diferentes de cada compuesto de ensayo.

Las mezclas de reacción de unión se incuban durante una hora a 30°C. la reacción se detiene mediante filtración a través de filtros de GF/B tratados con 0,5% de polietilenimina, usando un recolector de células. La radiactividad se mide mediante recuento de centelleo y los datos se analizan mediante un programa de regresión no lineal computarizado.

ES 2 305 229 T3

La unión no específica se define como la cantidad de radiactividad remanente de la proteína de membrana en presencia de 100 nM de péptido no marcado. La concentración de proteína se mide mediante el procedimiento de Bradford usando reactivo Bio-Rad, con albúmina sérica bovina como estándar. Un compuesto de ensayo que incrementa la radiactividad de la proteína de membrana en al menos 15% con relación a la radiactividad de la proteína de membrana que no se incubó con un compuesto de ensayo se identifica como un compuesto que se une a un polipéptido de GPCR humano.

Ejemplo 3

Efecto de un compuesto de ensayo sobre la formación de AMP cíclico mediada por GPCR

La inhibición de AMPc mediada por receptor se puede ensayar en las células huésped que expresan GPCR humano. Las células se siembran en placas de 96 pocillos y se incuban en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) suplementada con 10 mM de HEPES, 5 mM de teofilina, 2 µg/ml de aprotinina, 0,5 mg/ml leupeptina, y 10 µg/ml de fosforamidón durante 20 minutos a 37°C en 5% CO₂. Un compuesto de ensayo y se incuban durante 10 minutos adicionales a 37°C. El medio se aspira, y la reacción se detiene mediante la adición de 100 mM de HCl. Las placas se almacenan a 4°C durante 15 minutos. El contenido de AMPc en la solución de paradese se mide mediante radioinmunoensayo.

La radiactividad se cuantifica usando un contador gamma equipado con el software sw reducción de datos. Un compuesto de ensayo que disminuye la radiactividad del contenido de un pocillo con relación a la radiactividad del contenido de un pocillo en la ausencia de los compuestos de ensayo se identifica como un inhibidor potencial de la formación de AMPc.

Ejemplo 4

Efecto de un compuesto de ensayo sobre la movilización de calcio intracelular

La concentración de calcio libre intracelular se puede medir mediante microespectrofluorometría usando el tinte indicador fluorescente Fura-2/AM (Bush *et al.*, J. Neurochem. 57, 562-74, 1991). Las células transfectadas de manera estable se siembran en una placa de cultivo de 35 mm que contiene una de inserción de cubre objetos de vidrio. Las células se lavan con HBS, se incuban con un compuesto de ensayo y se cargan con 100 µl de Fura-2/AM (10 µM) durante 20-40 minutos. Después de lavar con HBS para retirar la solución de Fura-2/AM, se equilibran las células en HBS durante 10-20 minutos. Después las células se visualizan bajo el objetivo 40 X de un microscopio Leitz Fluovolt FS.

La emisión de fluorescencia se determina a 510 nM, con longitudes de onda de excitación que alternan entre 340 nM y 380 nM. Los datos de fluorescencia brutos se convierten en concentraciones de calcio usando de concentración de calcio convencionales y técnicas de análisis de software. Un compuesto de ensayo que aumenta la fluorescencia en al menos un 15% con relación a la fluorescencia en la ausencia de un compuesto de ensayo se identifica un compuesto que moviliza el calcio intracelular.

Ejemplo 5

Efecto de un compuesto de ensayo sobre el metabolismo de fosfoinosítido

Células que expresan de manera estable el ADNc de GPCR humano se siembran en placas de 96 pocillos y medio de crecimiento hasta confluencia. El día antes del ensayo, se cambia el medio de crecimiento a 100 µl de medio que contiene 1% de suero y 0,5 µ Ci de ³H-miinositol. Las placas se incuban durante toda una noche en un incubador de CO₂ (5% CO₂ a 37°C). Inmediatamente antes del ensayo, se retira el medio y se reemplaza por 200 µl de PBS que contiene 10 mM de LiCl, y las células se equilibran con el nuevo medio durante 20 minutos. Durante este intervalo, se equilibran también las células con, antagonista, se añade como una alícuota de 10 µl de una solución concentrada 20 veces en PBS.

La acumulación de fosfato de ³H-inositol a partir del metabolismo de inositol fosfolípido se comienza mediante la adición de 10 µl de una solución que contiene un compuesto de ensayo. Al primer pocillo se añaden 10 µl de una solución que contiene un compuesto de ensayo. Al primer pocillo se añaden 10 µl para medir la acumulación basal. Se ensayan once concentraciones diferentes de compuesto de ensayo en los siguientes 11 pocillos de cada fila de placas. Todos los ensayos se realizan por duplicado mediante repetición de las mismas adiciones en dos filas de placas consecutivas.

Las placas se incuban en un incubador de CO₂ durante una hora. La reacción se termina mediante la adición de 15 µl de 50% v/v de ácido tricloroacético TCA), seguido de una incubación de 40 minutos a 4°C. Después de neutralizar TCA con 40 µl de 1 M Tris, el contenido de los pocillos se transfiere a una placa de filtro de Multiscreen HV (Millipore) que contiene Dowex AG1-X8 (maya de 200-400, forma de formiato). Las placas de filtro se preparan mediante la adición de 200 µl de suspensión de Dowex AG1-X8 (50% v/v, agua: resina) a cada pocillo. Las placas de filtro se conocen en un tubo múltiple a vacío para lavar o eluir el lecho de resina. Cada pocillo se lava 2 veces con 200 µl de agua, seguido de 2 x 200 µl de 5 mM de tetraborato de sodio/60 mM de formiato de amina.

ES 2 305 229 T3

Los ^3H -IP se eluyen en placas vacías de 96 pocillos con 200 μl de 1,2 M de formiato de amonio/0,1 ácido fórmico. El contenido de los pocillos se añade a 3 ml de cóctel de centelleo, y se determina la radiactividad mediante conteo de líquido de centelleo.

5 Ejemplo 6

Procedimientos de unión al receptor

10 Ensayos de unión convencionales. Los ensayos de unión se llevan a cabo en un tampón de unión que contiene 50 mM HEPES, pH 7,4, 0,5% de BSA, y 5 mM de MgCl_2 . El ensayo convencional para la unión de radioligando a fragmentos de membrana que comprende polipéptidos de GPCR se lleva a cabo como sigue en placas de 96 pocillos (por ejemplo, placas de Dynatech Immulon II Removawell). Se diluye el radioligando en tampón de unión + PMSF/Baci hasta las cpm deseadas por 50 μl , después las alícuotas de 50 μl se añaden a los pocillos. Para las muestras de unión no específicas alícuotas de 5 μl de 40 μM de ligando frío se añade también por pocillo. La unión se inicia mediante la adición de 150 μl por pocillo de membrana diluidos hasta la concentración deseada (10-30 μg de proteína de membrana/pocillo) en tampón de unión + PMSF/Baci. Después las placas se cubren con selladores de placa Linbro mylar (Flow Labs) y se colocan en un Dynatech Microshaker II. Se deja que la unión proceda a temperatura ambiente durante 1-2 horas y se detiene centrifugando la placa durante 15 minutos a 2.000 x g. Se decantan los sobrenadantes, y los sedimentos de membrana se lavan una vez mediante la adición de 200 μl de tampón de unión enfriado con hielo, agitación breve y recentrifugación. Los pocillos individuales se colocan en tubos de 12 x 75 mm y se cuentan en un contador LKB Gammamaster (78% de eficacia). La unión específica mediante este procedimiento es idéntica a la medida cuando el ligando libre se retira mediante filtración rápida (3-5 segundos) y lavando sobre filtros de fibra de vidrio revestidos con polietilenimina.

25 También se usan tres variaciones del ensayo de unión convencional:

1. Los ensayos de unión de radioligandos competitivos con un intervalo de concentración de ligandos frío frente a ligando marcado con ^{125}I se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente con una modificación. Todas las diluciones de ligandos que se ensayan se realizan en 40 X PMSF/Baci hasta una concentración de 40 X de concentración final en el ensayo. Las muestras de péptido (5 μl cada una) después se añaden por pocillo de microtitulación. Las membranas y radioligandos se diluyen en tampón de unión sin inhibidores de proteasa. El radioligando se añade y se mezcla con ligando frío, y después se inicia la unión mediante la adición de membranas.
2. La reticulación química del radioligando con el receptor se realiza después de una etapa de unión idéntica al ensayo estándar. Sin embargo la etapa de lavado se realiza con tampón de unión menos BSA para reducir la posibilidad de reticulación no específica de radioligando con BSA. La etapa de reticulación se lleva a cabo como se describe más adelante.
3. También se llevan a cabo los ensayos de unión a mayor escala para obtener sedimentos de membrana para los estudios sobre la solubilización del complejo receptor: ligando y para la purificación del receptor. Estos son idénticos a los ensayos convencionales excepto que (a) la unión se lleva a cabo en tubos de polipropileno en volúmenes entre 1-250 ml, (b) concentración de proteína de membrana es siempre 0,5 mg/ml, y (c) para la purificación del receptor, la concentración de BSA en el tampón de unión se reduce hasta 0,25%, y la etapa de lavado se realiza con tampón de unión sin BSA, que reduce la contaminación de BSA del receptor purificado.

50 Ejemplo 7

Reticulación química de radioligando al receptor

Después de una etapa de unión de radioligando como se ha descrito anteriormente, se vuelven a suspender los sedimentos de membrana en 200 μl por pocillo de placa de microtitulación de tampón de unión enfriado con hielo sin BSA. Después se añaden 5 μl por pocillo de 4 mM de N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOS, Pierce) en DMSO y se mezclan. Las muestras se mantienen en hielo y se irradian con UV durante 10 minutos con una lámpara Mineralight R-52G (UVP Inc., San Gabriel, Calif.) a una distancia de 5 de -10 cm. Después las muestras se transfieren a tubos de microcentrifugación Eppendorf, las membranas sedimentadas por centrifugación, se retiran los sobrenadantes, y se solubilizan las membranas en muestra de tampón de muestra Laemmli SDS para electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). PAGE se lleva a cabo como se describe más adelante. Las proteínas radiomarcadas se visualizan mediante autorradiografía sobre los geles secos con película Kodak XAR y DuPont tamices de intensificados de imágenes Du pont.

Ejemplo 8

Solubilización de membranas

5 La solubilización de membranas se lleva a cabo en tampón que contiene 25 mM Tris, pH 8, 10% glicerol (p/v) y 0,2 mM de CaCl_2 (tampón de solubilización). Los detergentes altamente solubles incluyen Triton X-100, desoxicolato, desoxicolato:lisolecitina, CHAPS, y agentes dipolares se preparan en tapón de solubilización a concentraciones del 10% y se almacenan como alícuotas congeladas. La lisolecitina se prepara reciente debido a la insolubilidad después de la congelación-descongelación y la digitonina se prepara reciente a concentraciones inferiores debido a su solubilidad
10 más limitada.

Para solubilizar las membranas, los sedimentos lavados después de la etapa de unión se vuelven a suspender sin partículas visibles mediante pipeteado y agitación en aparato Vortex en tampón de solubilización a 100.000 x g durante 30 minutos. Los sobrenadantes se retiran y se mantienen sobre hielo y los gránulos se eliminan.

15

Ejemplo 9

Ensayo de receptores solubilizados

20

Después de la unión de los ^{125}I y solubilización de las membranas con detergente, el complejo intacto de R : L se puede ensayar cuatro procedimientos diferentes. Todos se llevan a cabo en hielo o en una habitación fría a 4-10°C.).

1. Cromatografía en columna (Knuhtsen *et al.*, Biochem. J. 254, 641-647, 1988). Columnas de Sephadex G-50 (8 x 250 mm) se equilibran con tampón de solubilización que contiene detergente a la concentración usada para solubilizar las membranas y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Las muestras de membranas solubilizadas (0,2-0,5 ml) se aplican a las columnas y se eluyen a un caudal de aproximadamente 0,7 ml/minuto. Se recogen las muestras (0,18 ml). Se determina la radiactividad en un contador gamma. Los volúmenes nulos de las columnas se determinan mediante el volumen de elución de dextrano azul. La radiactividad que eluye en el volumen nulo se considera unido a proteína. La
30 radiactividad que eluye más tarde, al mismo volumen que los ^{125}I libres, se considera no unido.

2. Precipitación con polietilenglicol (Cuatrecasas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 318-322, 1972). Para una muestra de 100 μl de membranas solubilizadas en un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm, se añaden 0,5 ml de 1% (p/v) de globulina gamma bovina (Sigma) en 0,1 M tampón de fosfato de sodio, seguido de 0,5 ml de 25% (p/v) de polietilenglicol (Sigma) y se mezcla. La mezcla se mantiene en hielo durante 15 minutos. Después se añaden por muestra 3 ml de 0,1 M de fosfato de sodio, pH 7,4,. Las muestras se filtran rápidamente (1-3 segundos) se filtran sobre filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B y se lavan con 4 ml del tampón fosfato. El complejo receptor precipitado por PEG: ligando de ^{125}I se determina mediante conteo gamma de los filtros.

3. La unión de filtro GFB/PEI (Bruns *et al.*, Analytical Biochem. 132, 74-81, 1983). Los filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B se sumergen en 0,3% de polietilénimina (PEI, Sigma) durante 3 horas. Las muestras de las membranas solubilizadas (25-100 μl) se reemplazan en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm. Después se añaden por muestra 4 ml de tampón de solubilización sin detergente y las muestras se filtran inmediatamente a través de los filtros GFB/PEI (1-3 segundos) y se lavan con 4 ml de tampón de solubilización. Las CPM del complejo receptor: ligandos ^{125}I adsorbido a los filtros se determinan mediante conteo gamma.

4. Carbón/Dextrano (Paul y Said, Peptides 7 [Supl. 1], 147-149, 1986). Dextrano T70 (0,5 g, Pharmacia) se disuelve en 1 litro de agua, después se añaden 5 g de carbón activado (Norit A, alcalino; Fisher Scientific). La suspensión se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se almacena a 4°C. hasta uso. Para medir el complejo R:L, 4 partes por volumen de suspensión de carbón/dextrano se añaden a 1 parte por volumen de membrana solubilizada. Las muestras se mezclan y se almacenan durante 2 minutos y después se centrifugan durante 2 minutos a 11.000 x g en un tubo de microcentrífuga Beckman. El radioligando libre se adsorbe en carbón/dextrano y se desecha con el sedimento. Los complejos de receptor: ligandos ^{125}I permanecen en el sobrenadante y se determinan mediante conteo gamma.

55

Ejemplo 10

Purificación del receptor

60 La unión del receptor de biotilino a las membranas GH4 Cl se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente. Las incubaciones son durante 1 hora a temperatura ambiente. En el protocolo de purificación convencional, las incubaciones de unión contienen 10 nM de Bio-S29. Se añade el ligando ^{125}I como un trazador a niveles de 5.000-100.000 cpm por mg de proteína de membrana. Las incubaciones de control contienen 10 μM de ligando frío para saturar el receptor con ligando no biotinilado.

65

La solubilización del complejo receptor:ligando también se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente, con 0,15% de desoxicolato: lisolecitina en tampón de solubilización que contiene 0,2 mM de MgCl_2 , obteniendo sobrenadantes de 100.000 x g que contenían el complejo R:L.

ES 2 305 229 T3

La estreptavidina inmovilizada (estreptavidina reticulada a 6% de perlas de agarose, Pierce Chemical Co.; "SA-agarosa") se lava en tampón de solubilización y se añade a las membranas solubilizadas como 1/30 del volumen final. Esta mezcla se incuba con agitación constante mediante rotación por volteo durante 4-5 horas a 4-10°C. Después la mezcla se aplica a una columna y el material no unido se lava a su través. La unión de radioligando a SA-agarosa se determina comparando las cpm en el sobrenadante de 100.000 x g con la del effluente de columna después de la adsorción a SA-agarosa. Finalmente, la columna se lava con 12-15 volúmenes de columna de tampón de solubilización + 0,15% desoxicolato:lisolectina +1/500 (vol/vol) 100 x 4pasa.

La columna de la estreptavidina se eluye con tampón de solubilización +0,1 mM EDTA+0,1 mM EGTA+0,1 mM GTP-gamma-S (Sigma) + 0,15% (p/vol) desoxicolato:lisolectina +1/1000 (vol/vol) 100. veces. 4pasa. Primero, un volumen de columna de tampón de elución se pasa a través de la columna y se detiene el flujo durante 20-30 minutos. Después 3-4 más volúmenes de columna de tampón de elución se pasan a su través. Se combinan todos los eluatos.

Los eluatos de la columna de estreptavidina se incuban durante toda una noche (12-15 horas) con aglutinina de germen de trigo inmovilizado (WGA agarosa, Labs Vector) para adsorber el receptor mediante de carbohidrato unido de manera covalente con lecitina WGA. La relación (vol/vol) de agarosa de WGA a eluato de columna de estreptavidina es generalmente 1:400. Un intervalo entre 1:1000 a 1:200 también se puede usar. Después de la etapa de conservación, la resina se sedimenta mediante centrifugación, el sobrenadante se retira y se guarda, y después la resina se lava 3 veces (aproximadamente 2 minutos cada una) en tampón que contiene 50 mM HEPES, pH 8, 5 mM MgCl₂, y 0,15% desoxicolato:lisolectina. Para eluir el receptor unido a WGA, la resina se extrae mediante mezcla repetida (mezclador Vortex a baja velocidad) durante un período de 15-30 minutos en hielo, con 3 columnas de resina cada vez, de 10 mM N-N'-N''-triacetilquitotriosa en el mismo tampón de HEPES usado para lavar la resina. Después de la etapa de elución, se centrifuga la resina y el sobrenadante se retira cuidadosamente, sin sedimentos de WGA-agarosa. Los tres eluatos combinados contienen el receptor final, purificado. El material no unido a WGA contienen subunidades de proteína G eluidas específicamente de la columna de estreptavidina, así como contaminantes no específicas. Todas estas fracciones se almacenan congeladas a -90°C.

Ejemplo 11

Identificación de los compuestos de ensayo que se unen a polipéptidos de GPCR

Los polipéptidos de GPCR purificados que comprenden una proteína glutatión-S-transferasa y absorbidos en pocillos derivatizados de glutatión de placas de microtitulación de 96 pocillos se ponen en contacto con los compuestos de ensayo a partir de una genoteca de moléculas pequeñas a pH 7,0 en una solución de tampón fisiológico. Los polipéptidos de GPCR comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. Los compuestos de ensayo comprenden una etiqueta fluorescente. Las muestras se incuban durante 5 minutos a una hora. Las muestras de control se incuban en la ausencia de un compuesto de ensayo.

La solución de tampón que contiene los compuestos de ensayo se lava de los pocillos. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de GPCR se detecta mediante mediciones de fluorescencia del contenido de los pocillos. Un compuesto de ensayo que incrementa la fluorescencia en un pocillo en al menos 15% con relación a la fluorescencia de un pocillo en el que un compuesto de ensayo no incubado se identifica como un compuesto que se une a un polipéptido de GPCR.

Ejemplo 12

Identificación de un compuesto de ensayo que disminuye la expresión del gen de GPCR

Un compuesto de ensayo se administra a un cultivo de células gástricas humanas y se incuban a 37°C durante 10 a 45 minutos. Un cultivo del mismo tipo de células incubado durante el mismo tiempo sin el compuesto de ensayo proporciona un control negativo.

Se aísla en ARN de los dos cultivos como se ha descrito en Chirgwin *et al.*, Biochem. 18, 5294-99, 1979). Se preparan transferencia de Northern usando 20 a 30 µg de ARN total y se hibridan con una sonda específica de GPCR marcada con ³²P a 65°C en Express-hyb (CLONTECH). La sonda comprende al menos 11 nucleótidos seleccionados entre el complemento de la SEQ ID NO: 1. Un compuesto de ensayo que disminuye la señal específica de GPCR con relación a la señal obtenida en la ausencia del compuesto de ensayo se identifica como un inhibidor de la expresión del gen de GPCR.

Ejemplo 13

*Sistemas de ensayo celulares*5 *Selección del receptor acoplado a G_i*

Se transfieren las células de manera estable con el receptor relevante y con una construcción de luciferasa de CRE inducible. Las células se desarrollan en 50% de medio de Eagle modificado de Dulbecco/50% de F12 (DMEM/F12) suplementado con 10% de FBS, a 37°C en una atmósfera humidificada con 10% de CO₂ y se dividen de manera rutinaria a una relación de 1:10 cada 2 ó 3 días. Los cultivos de ensayo se siembran en placas de 384 pocillos a una densidad apropiada (por ejemplo, 2000 células/pocillo en 35 µl de medio de cultivo celular) en DMEM/F12 con FBS, y se hacen crecer durante 48 horas (intervalo: ~ 24-60 horas, dependiendo de la línea celular). El medio de crecimiento después se cambia con medio sin suero (SFM; por ejemplo, Ultra-CHO), que contiene 0,1% de BSA. Los compuestos de ensayo disueltos en DMSO se diluyen en SFM y se transfieren a los cultivos de ensayo (concentración final máxima 10 µmolar), seguido de la adición de forskolina (~ 1 µmolar, concentración final.) en SFM + 0,1% BSA 10 minutos más tarde. En el caso de la selección de antagonistas se añaden tanto, una concentración apropiada de agonista como de forskolina. Las placas se incuban a 37°C en 10% de CO₂ durante 3 horas. Después se retira el sobrenadante, se lisan las células con reactivo de lisis (25 mmolar de tampón fosfato, pH 7,8, que contiene 2 mmolar de DDT, 10% de glicerol y 3% de Triton X100). La reacción de luciferasa se comienza mediante la adición de tampón de sustrato (por ejemplo, reactivo de ensayo de luciferasa, Promega) y luminiscencia se determina inmediatamente (por ejemplo, luminómetro Berthold o sistema de cámara Hamamatsu).

25 *Selección del receptor acoplado a G_s*

Se transfectan de manera estable con el receptor relevante y con una construcción de luciferasa de CRE inducible. Se hacen crecer las células en 50% de medio de Eagle modificada por Dulbecco/50% de F12 (DMEM/F12) suplementado con 10% de FBS, a 37°C en una atmósfera humidificada con 10% de CO₂ y se dividen de manera rutinaria a una relación de 1:10 cada 2 ó 3 días. Los cultivos de ensayo se siembran en placas de 384 pocillos a una densidad apropiada (por ejemplo, 1000 ó 2000 células/pocillo en 35 µl de medio de cultivo celular) en DMEM/F12 con FBS, y se hacen crecer durante 48 horas (intervalo: ~ 24-60 horas, dependiendo de la línea celular). El ensayo se comienza mediante la adición de los compuestos de ensayo en medio sin (SFM; por ejemplo, Ultra-CHO), que contiene 0,1% de BSA. Los compuestos de ensayo disueltos en DMSO se diluyen en SFM y se transfieren a los cultivos de ensayo (concentración final máxima 10 µmolar, DMSO concentración < 0,6%). En el caso de la selección de antagonistas se añade una concentración apropiada durante 5-10 minutos más tarde. Las placas se incuban a 37°C en 10% de CO₂ durante 3 horas. Después se lisan las células 10 µl de reactivo de lisis por pocillo (25 mmolar de tampón fosfato, pH 7,8, que contiene 2 mmolar de DDT, 10% de glicerol y 3% de Triton X100) y la reacción de luciferasa se comienza mediante la adición de tampón de 20 µl de tampón de sustrato (por ejemplo, reactivo de ensayo de luciferasa, Promega). La medición de luminiscencia se comienza inmediatamente (por ejemplo, luminómetro Berthold o sistema de cámara Hamamatsu).

40

Selección de receptor acoplado a G_q

Se transfieren de manera estable células con el receptor relevante. Las células que expresan la proteína del receptor funcional se hacen crecer en 50% de medio de Eagle modificada por Dulbecco/50% de F12 (DMEM/F12) suplementado con 10% de FBS, a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y se dividen de manera rutinaria a una relación dependiente de la línea celular cada 3 ó 4 días. Los cultivos de ensayo se siembran en placas de 384 pocillos a una densidad apropiada (por ejemplo, 2000 células/pocillo en 35 µl de medio de cultivo celular) en DMEM/F12 con FBS, y se hacen crecer durante 48 horas (intervalo: ~ 24-60 horas, dependiendo de la línea celular). El medio de crecimiento después se cambia con solución salina fisiológica (por ejemplo, solución de Tyrode). Los compuestos de ensayo disueltos en DMSO se diluyen en solución de Tyrode que contiene 0,1% de BSA y se transpiren a los cultivos de ensayo (concentración final máxima 10 µmolar). Después de la adición del agonista específico del receptor el incremento del calcio intracelular mediado por G_p resultante se mide usando sistemas de lectura apropiados (por ejemplo, tintes sensibles a calcio).

55

Ejemplo 14

Ensayo in vivo de la validación de los compuestos/diana

60

1. *Ensayos mecánicos agudos*1.1. *Reducción de los niveles de hormona en plasma mitógenos*

Este ensayo no tumoral mide la capacidad de un compuesto de reducir o bien el nivel endógeno de una hormona circulante o el nivel de la hormona producida en respuesta a un estímulo biológico. A los roedores se les administra compuesto de ensayo (p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c.). A un tiempo predeterminado después de la administración del compuesto de ensayo, se recoge plasma de sangre. Se ensaya el plasma para determinar los niveles en plasma de la hor-

mona de interés. Si los niveles circulantes de la hormona son demasiado bajos y/o variables proporcionan resultados consistentes, el nivel de la hormona se puede elevar mediante un pretratamiento con un estímulo biológico (es decir, LHRH se puede inyectar i.m. en ratones a una dosificación de 30 ng/ratón para inducir una explosión de la síntesis de testosterona). La programación de la recogida de plasma se debería ajustar para que coincidiera con el máximo de la respuesta de la hormona inducida. Los efectos del compuesto se comparan con un grupo de control tratado con vehículo. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o desigual seguido de un ensayo de la t de Student. La significación es un valor de $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control del vehículo.

1.2. Mecanismo de fibras huecas de ensayo de acción

Se prepararon fibras huecas con la(s) línea(s) celulares y se implantaron por vía intraperitoneal y/o por vía subcutánea en roedores. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. Las fibras se recogen de acuerdo con el protocolo de ensayo de lectura, se pueden incluir ensayos para la expresión génica (bADN, PCR, o Taqman), o una actividad bioquímica específica (es decir, niveles de AMPc). Los resultados se analizan mediante el ensayo de t de Student o ensayo después la varianza entre grupos, se compara mediante el ensayo F con significación a $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control del vehículo.

2. Ensayos *in Vivo* funcionales subagudos

2.1. Reducción en masa de los tejidos dependientes de hormona

Éste es otro ensayo no tumoral que mide la capacidad de un compuesto de reducir la masa de un tejido dependiente de la hormona (es decir, vesículas seminales en machos y útero en hembras). Se administra a los roedores compuesto de ensayo (p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c.) de acuerdo con un programa predeterminado y durante una duración predeterminada (es decir, 1 semana). A la terminación del estudio, se pesan los animales, se escinde el órgano diana, cualquier fluido se expresa, y se registra el peso del órgano. También se puede recoger plasma de sangre. El plasma se puede ensayar para determinar los niveles de una hormona de interés o para los niveles del agente de ensayo. Los pesos de los órganos se pueden directamente comparar o se pueden normalizar para el peso corporal del animal. Los efectos de los compuestos se comparan con un grupo de control tratado con vehículo. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o diferente seguido de un ensayo de Student. La significación es el valor de $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control del vehículo.

2.2. Ensayo de proliferación de fibra hueca

Se preparan fibras huecas con al línea(s) celular(s) deseada(s) y se implantan por vía intraperitoneal y/o subcutánea en roedores. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. Se recogen las fibras de acuerdo con el protocolo de ensayo de lectura específico. Se determina la proliferación de células mediante la medida de un marcador de número de células (es decir, MTT o LDH). El número de células y cambio en el número de células del inóculo de partida se analizan mediante el ensayo de t de Student o ensayo de Rank Sum después la varianza entre grupos se compara mediante un ensayo de F, con significación a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control de vehículo.

2.3. Modelos antiangiogénesis

2.3.1. Angiogenesis de la córnea

Gránulos de Hidron con o sin factores de crecimiento o células se implantan en un microbolsillo creado quirúrgicamente en córnea de roedores. La administración de compuesto puede ser sistémica o local (compuesto mezclado con factores de crecimiento en el sedimento de hidron). Se recogen las corneas a los 7 días después del implante inmediatamente después de la infusión intracardíaca de carbono coloidal y se fijan en 10% de formalina. La lectura es de puntuación y/o análisis de imagen cualitativa. Las puntuaciones cualitativas se comparan mediante el ensayo de Rank Sum. Los datos de análisis de imágenes se evalúan mediante la medición del área de neovascularización (en pixels) y los promedios de los grupos se comparan mediante el ensayo de t de Student (2 colas). La significación es $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de factor de crecimiento o células solamente.

2.3.2. Angiogenesis de matrigel

Matrigel, que contiene células o factores de crecimiento, se inyecta de manera simultánea por vía subcutánea. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. se recogen obturadores de matrigel en un(os) momento(s) y se preparan para lectura. La lectura es un ensayo basado en ELISA para la concentración de hemoglobina y/o examen histológico (es decir, recuento de recipiente, tinción especial para los marcadores de superficie endotelial: CD31, factor-8). Se analizan las lecturas mediante ensayo de t de Student, después la varianza entre los grupos se compara mediante ensayo de F, con una significación determinada a $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control de vehículo.

3. Eficacia antitumoral primaria

3.1. Modelos de terapia temprana

3.1.1. Tumor subcutáneo

Las células o fragmentos tumorales se implantan por vía subcutánea el día 0. El vehículo y/o compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con el programa determinado comenzando en un momento, usualmente el día 1, antes de la posibilidad de medir la carga tumoral. Se registran los pesos corporales y mediciones de tumores 2-3 veces cada semana. Los pesos medios de cuerpo y tumor netos se calculan para cada día de recogida de datos. La eficacia antitumoral se puede determinar inicialmente comparando el tamaño de tumores tratados (T) y control[®] un día dado mediante un ensayo de t de Student, después la varianza entre grupos se compara mediante un ensayo F, con significación determinada a $p \leq 0,05$. El experimento también se puede continuar pasado el fin de la dosificación en cuyo caso las mediciones de tumor continuarían registrándose para controlar el retraso del crecimiento de tumor. Los retrasos del crecimiento del tumor se expresan como la diferencia en el tiempo medio para los grupos tratados y de control para alcanzar un tamaño predeterminado dividido por el tiempo medio para el grupo de control para alcanzar el tamaño. Los retrasos de crecimiento se comparan mediante la generación de las curvas Kaplan-Meier a partir de los tiempos para que los tumores individuales alcancen el tamaño de evaluación. La significación es $p \leq 0,05$.

3.1.2. Modelos de tumores Intraperitoneal Intracraneales

Se inyectan células tumorales por vía intraperitoneal o por vía intracranial el día 0. Se administran los compuestos p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con el programa predeterminado comenzando el día 1. Se registran las observaciones de morbilidad y/o mortalidad dos veces al día. Los datos de morbilidad/mortalidad se expresan en términos del tiempo medio de supervivencia y el número de supervivientes a largo plazo se indica de manera separada. Los tiempos de supervivencia se usan para las curvas de Kaplan-Meier. La significación es $p \leq 0,05$ mediante un ensayo de grado logarítmico comparado con el grupo control en el experimento.

3.2. Modelo de enfermedad establecido

Se implantan células o fragmentos tumorales por vía subcutánea y se hacen crecer hasta el tamaño deseado para el tratamiento que se va a comenzar. Una vez que intervalo de tamaño se ha determinado, los ratones se distribuyen al azar en los grupos de tratamiento. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado. Se miden los pesos de tumor y de cuerpo y se registran 2-3 veces a la semana. Los pesos medios de tumores de todos los grupos durante los días después de la inoculación se representan gráficamente para comparación. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o diferente seguido de un ensayo de t de Student para comparar los tamaños de tumores en los grupos tratados y de control al final del tratamiento. La significación es $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control. Las mediciones de tumores se pueden registrar después de que la dosificación se haya parado para controlar el retraso del crecimiento de tumor. Los retrasos de crecimiento de tumor se expresan como la diferencia en el tiempo medio para que los grupos tratados y de control alcancen un tamaño predeterminado dividido por el tiempo medio para que el grupo de control alcance ese tamaño. Los retrasos de crecimiento se comparan mediante la generación de las curvas Kaplan-Meier a partir de los tiempos para que los tumores individuales alcancen el tamaño de evaluación. La significación es valor de $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control de vehículo.

3.3. Modelos de enfermedad ortotópicos

3.3.1. Ensayo de almohadilla grasa mamaria

Se implantan directamente células o fragmentos tumorales, de origen de adenocarcinoma mamario, en una almohadilla de grasa mamaria expuesta y reflejada quirúrgicamente en roedores. La almohadilla de grasa se vuelve a colocar en su posición original y el sitio quirúrgico se cierra. También se pueden administrar hormonas a los roedores para apoyar el crecimiento de los tumores. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado. Se miden los pesos de tumor y cuerpo y se registran 2-3 veces a la semana. Los pesos medios de tumores de todos los grupos durante los días después de la inoculación se representan gráficamente para comparación. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o diferente seguido de un ensayo de t de Student para comparar los tamaños de tumor en los grupos tratados y de control al final del tratamiento. La significación es $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control.

Las mediciones de tumores se pueden registrar después de que se haya parado la dosificación para control del retraso de crecimiento tumoral. Los retrasos del crecimiento tumoral se expresan como la diferencia en el tiempo medio para los grupos tratados y de control para lograr un tamaño predeterminado dividido por el tiempo medio para que el grupo de control alcance ese tamaño. Los retrasos de crecimiento se comparan mediante generación de las curvas Kaplan-Meier a partir de los tiempos para que los tumores individuales alcancen el tamaño de evaluación. La significación es valor de $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control del vehículo. Además, este modelo proporciona una oportuni-

dad para incrementar la velocidad de metástasis espontánea de este tipo de tumor. La metástasis se puede determinar a la terminación del estudio mediante recuento del número de focos visibles por órgano diana, o midiendo el peso del órgano diana. Los medios de estos puntos finales se comparan mediante el ensayo de t de Student después de llevar a cabo un ensato F, con la significación determinada a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo del experimento de control.

3.3.2. Ensayo intraprostático

Se implantan directamente células o fragmentos tumorales, de adenocarcinoma prostático en un lóbulo dorsal de la próstata en roedores. La próstata se hace externo mediante una incisión abdominal de manera que el tumor se pueda implantar de manera específica en el lóbulo dorsal mientras se verifica que el implante no entra en las vesículas seminales. La próstata inoculada con éxito se reemplaza en el abdomen y se cierra la incisión a través del abdomen y la piel. vuelve a colocar en su posición original y el sitio quirúrgico se cierra. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado. Se miden los pesos de tumor y cuerpo y se registran 2-3 veces a la semana. En un momento predeterminado, el experimento terminó y se diseccionó el animal. El tamaño del tumor primario se mide en tres dimensiones usando o bien un calibre o un micrómetro ocular unido a un campo de disección. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o diferente seguido de un ensayo de t de Student para comparar los tamaños de tumor en los grupos tratados y de control al final del tratamiento. La significación es $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control. Este modelo proporciona una oportunidad para incrementar la velocidad de metástasis espontánea de este tipo de tumor. La metástasis se puede determinar a la terminación del estudio mediante recuento del número de focos visibles por órgano diana, (es decir, los pulmones), o midiendo el peso del órgano diana (es decir, los ganglios linfáticos regionales). Las medias de estos puntos finales se comparan mediante ensayo de t de Student después de llevar a cabo un ensato F, con la significación determinada a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo en el experimento.

3.3.3. Ensayo intrabronquial

Se pueden implantar células tumorales de origen pulmonar por vía intrabronquial realizando una incisión a través de la piel y exposición de la tráquea. La tráquea se perfora con el extremo biselado de una aguja de 25 de calibre y las células tumorales se inoculan en el bronquio principal usando una aguja de calibre 27 con borde plano con una curvatura de 90°. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado. Se miden los pesos de tumor y cuerpo y se registran 2-3 veces a la semana. En un momento predeterminado, el experimento terminó y se diseccionó el animal. El tamaño del tumor primario se mide en tres dimensiones usando o bien un calibre o un micrómetro ocular unido a un campo de disección. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o diferente seguido de un ensayo de t de Student para comparar los tamaños de tumor en los grupos tratados y de control al final del tratamiento. La significación es $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control. Este modelo proporciona una oportunidad para incrementar la velocidad de metástasis espontánea de este tipo de tumor. La metástasis se puede determinar a la terminación del estudio mediante recuento del número de focos visibles por órgano diana, (es decir, el pulmón contralateral), o midiendo el peso del órgano diana. Las medias de estos puntos finales se comparan mediante ensayo de t de Student después de llevar a cabo un ensato F, con la significación determinada a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo en el experimento.

3.3.4. Ensayo intratecal

Se pueden implantar células tumorales de origen gastrointestinal por vía intratecal realizando una incisión abdominal a través de la piel y externalización del intestino. Se inoculan células tumorales en la pared cecal sin penetración del lumen del intestino usando una aguja de calibre 27 ó 30. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado. Se miden los pesos de tumor y cuerpo y se registran 2-3 veces a la semana. En un momento predeterminado, el experimento terminó y se diseccionó el animal. El tamaño del tumor primario se mide en tres dimensiones usando o bien un calibre o un micrómetro ocular unido a un campo de disección. Se realiza un ensayo F para determinar si la varianza es igual o diferente seguido de un ensayo de t de Student para comparar los tamaños de tumor en los grupos tratados y de control al final del tratamiento. La significación es $p \leq 0,05$ cuando se compara con el grupo de control. Este modelo proporciona una oportunidad para incrementar la velocidad de metástasis espontánea de este tipo de tumor. La metástasis se puede determinar a la terminación del estudio mediante recuento del número de focos visibles por órgano diana, (es decir, el hígado), o midiendo el peso del órgano diana. Las medias de estos puntos finales se comparan mediante ensayo de t de Student después de llevar a cabo un ensato F, con la significación determinada a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo en el experimento.

4. Eficacia antitumoral secundaria (metastásica)

4.1. Metástasis espontánea

Se inoculan células tumorales s.c. y se deja que los tumores se desarrollen hasta un intervalo predeterminado para los estudios de metástasis espontáneos para el pulmón o hígado. Después estos tumores primarios se escinden. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado que puede

incluir el período que conduce a la escisión del tumor primario para evaluar las terapias dirigidas a la inhibición de las fases tempranas de la metástasis de tumores. Las observaciones de morbilidad y/o se registran diariamente. Los pesos corporales se miden y se registran dos veces a la semana. Los puntos finales potenciales incluyen tiempo de supervivencia, números de focos visibles por órgano diana, o peso de órgano diana. Cuando el tiempo de supervivencia se usa como el punto final los otros valores no están determinados. Los datos de supervivencia se usan para generar curvas de Kaplan-Meier. La significación es $p \leq 0,05$ mediante un ensayo de grado logarítmico comparado con el grupo control en el experimento. El número medio de focos de tumores visibles, como se determina en un microscopio de disección, y los pesos medios de los órganos diana se comparan mediante ensayo de t de Student después de llevar a cabo un ensayo F, con una significación determinada a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control en el experimento para ambos de estos puntos finales.

4.2. Metástasis forzada

Se inyectan células tumorales en la vena de la cola, o el ventrículo izquierdo del corazón en los estudios de metástasis experimentales (forzados) de pulmón, hígado, y de hueso, respectivamente. Los compuestos se administran p.o., i.p., i.v., i.m., o s.c. de acuerdo con un programa predeterminado. Las observaciones de morbilidad y/o mortalidad se registran en base diaria. Se miden los pesos corporales y se registran dos veces a la semana. Los puntos finales potenciales incluyen tiempo de supervivencia, número de focos visibles por órgano diana, o peso de órgano diana. Cuando el tiempo de supervivencia se usa como el punto final de los otros valores no están determinados. Los datos de supervivencia se usan para generar curvas de Kaplan-Meier. La significación es $p \leq 0,05$ mediante un ensayo de grado logarítmico comparado con el grupo control en el experimento. El número medio de focos de tumores visibles, como se determina en un microscopio de disección, y los pesos medios de los órganos diana se comparan mediante ensayo de t de Student después de llevar a cabo un ensayo F, con una significación determinada a $p \leq 0,05$ comparado con el grupo de control en el experimento para ambos de estos puntos finales.

Ejemplo 15

Ensayo de inhibición de proliferación: Los oligonucleótidos no codificantes suprimen el crecimiento de líneas celulares de cáncer

La línea celular usada para ensayar es la línea celular HCT116 de cáncer de colon humano. Se cultivan las células en RPMI-1640 con 10-15% de suero de ternera fetal a una concentración de 10.000 células por mililitro en un volumen de 0,5 ml y se mantiene a 37°C en una atmósfera de 95% de aire/5% de CO₂.

Los oligoribonucleótidos de fosforotioatos se sintetizan en un sintetizador de ADN Biosystems Model 380B usando química de fosforoamidita. Una secuencia de 24 bases complementarias a los nucleótidos en la posición 1 a 24 de SEQ ID NO: 1 se usa como el oligonucleótido de ensayo. Como control, se usa otra secuencia (aleatoria): 5'-TCA ACT GAC TAG ATG TAC GAC-3'. Después del ensamblaje y desprotección, los oligonucleótidos se precipitan dos veces con etanol, se secan, y se suspenden en solución salina tamponada con fosfato a la concentración deseada. Se ensaya la pureza de los oligonucleótidos mediante electroforesis en gel de sílice y HPLC de intercambio iónico. Los oligonucleótidos purificados se añaden al medio de cultivo a una concentración de 10 μ M una vez al día durante siete días.

La adición del oligonucleótido de ensayo durante siete días da como resultado una reducción en la expresión significativa de GPCR humano como se determina mediante transferencia de Western. Este efecto no se observa con el oligonucleótido de control. Después de 3 a 7 días, se cuenta el número de células en los cultivos usando un contador de células automático. El número de células en los cultivos se trata con el oligonucleótido de ensayo (expresado como 100%) se compara con el número de células en los cultivos tratados con el oligonucleótido de control no es más de 30% del control, que indica que la inhibición del GPCR humano tiene un efecto antiproliferativo sobre las células cancerosas.

Ejemplo 16

Diabetes: compuestos de ensayo in vivo/validación de la diana

1. Producción de glucosa

La sobreproducción de glucosa por el hígado, debido a una tasa potenciada de gluconeogénesis, es la principal causa de la hiperglucemia en ayunas en diabetes. Las ratas o ratones en ayunas durante toda una noche tienen tasas elevadas de gluconeogénesis como las ratas o ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina con alimentación a voluntad. Las ratas se hacen diabéticas con una sola inyección de 40 mg/kg de estreptozotocina mientras a los ratones C57BL/KsJ se les proporciona 40-60 mg/kg i.p. durante cinco días consecutivos. Se mide la glucosa en sangre a partir de la sangre de la punta de la cola y después los compuestos se administran mediante vías diferentes (p.o., i.p., i.v., s.c.). Se recoge sangre en diversos momentos después y se mide la glucosa. Como alternativa, se administran los compuestos durante varios días, después los animales se dejan en ayunas durante toda una noche, se recoge la

sangre y se mide la glucosa en sangre. Los compuestos que inhiben la producción de glucosa disminuirán los niveles de glucosa en plasma comparados con el grupo de control tratado con vehículo.

2. Sensibilidad a insulina

Ratones tanto ob/ob como db/db así como ratas Zucker diabéticas son hiperglicémicos, hiperinsulinémicos y resistentes a insulina. Se toman muestra de los animales previamente, se miden sus niveles de glucosa, y se agrupan de manera que el nivel medio de glucosa sea el mismo para cada grupo. Los compuestos se administran diariamente cada día o dos veces al día mediante vías diferentes (p.o., i.p., s.c.) durante 7-28 días. Se recoge sangre en diversos momentos y se determinan los niveles de glucosa e insulina en plasma. Los compuestos que mejoran la sensibilidad a insulina en estos modelos disminuirán los niveles tanto de glucosa como insulina en plasma cuando se compara con el grupo de control tratado con vehículo.

3. Secreción de insulina

Los compuestos que potencian la secreción de insulina a partir del páncreas incrementarán los niveles de insulina en plasma y mejorarán la desaparición de glucosa en plasma después de la administración de una carga de glucosa. Cuando se miden los niveles de insulina, se administran los compuestos mediante vías diferentes (p.o., i.p., s.c. o i.v.) a ratas o ratones normales en ayunas durante toda una noche. En el momento apropiado se proporciona una carga de glucosa intravenosa (0,4 g/kg), se recoge sangre un minuto más tarde. Se determinan los niveles de insulina en plasma. Los compuestos que potencian la secreción de insulina incrementarán los niveles de insulina en plasma comparado con los animales a los que solo se les ha proporcionado solamente glucosa. Cuando se mide la desaparición de glucosa, se toma muestra de la sangre de los animales en el momento apropiado después de la administración del compuesto, después se proporciona una carga de glucosa o bien oral o por vía intraperitoneal (1 g/kg), se toma muestra de sangre de nuevo después de 15, 30, 60 y 90 minutos y se determinan los niveles de glucosa en sangre. Los compuestos que incrementan los niveles de insulina disminuirán los niveles de glucosa y el área bajo la curva de glucosa cuando se compara con el grupo tratado con vehículo al que se proporciona solamente glucosa.

Los compuestos que potencian la secreción de insulina a partir del páncreas incrementarán los niveles de insulina en plasma y mejorarán la desaparición de glucosa en plasma después de la administración de una carga de glucosa. Cuando se miden los niveles de insulina, los compuestos que regulan GPCR se administran mediante diferentes vías (p.o., i.p., s.c., o i.v.) a ratas o ratones normales en ayunas durante toda la noche. En el momento apropiado se administra una carga de glucosa intravenosa (0,4 g/kg), se recoge sangre un minuto más tarde. Se determinan los niveles de insulina. Los compuestos de ensayo que potencian la secreción de insulina incrementarán los niveles de insulina en plasma comparados con los animales a los que se les proporciona solamente glucosa. Cuando se mide la desaparición de glucosa, se toma muestra de sangre de los animales en el momento adecuado después de la administración del compuesto, después se proporciona una carga de glucosa o bien oral o intraperitoneal (1 g/kg), se toma muestra de sangre de nuevo después de 15, 30, 60, y 90 minutos y se determinan los niveles de glucosa en plasma. Los compuestos de ensayo que incrementan los niveles de insulina disminuirán los niveles de glucosa y el área bajo la curva de glucosa cuando se compara con el grupo tratado con vehículo al que se proporciona solamente glucosa.

4. Producción de glucosa

La sobreproducción de glucosa por el hígado, debido a una tasa potenciada de gluconeogénesis, es la causa principal de hiperglicemia en ayunas en diabetes. Las ratas o ratones en ayunas durante toda la noche tienen tasas elevadas de gluconeogénesis como las ratas o ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina alimentados a voluntad. Las ratas se hacen diabéticas con una sola inyección intravenosa de 40 mg/kg de estreptozotocina mientras a los ratones C57BL/KsJ se les proporciona 40-60 mg/kg i.p. durante 5 días consecutivos. La glucosa en sangre se mide a partir de sangre de la punta de la cola y se administran los compuestos mediante vías diferentes (p.o., i.p., i.v., s.c.). Se recoge la sangre en diferentes momentos después de esto y se mide la glucosa. Como alternativa, se administra los compuestos durante varios días, después los animales se dejan en ayunas durante toda una noche, se recoge sangre y se mide la glucosa en plasma. Los compuestos que inhiben la producción de glucosa disminuirán los niveles de glucosa en plasma comparado con el grupo de control tratado con vehículo.

5. Sensibilidad de insulina

Ratones tanto ob/ob como db/db así como ratas Zucker diabéticas son hiperglicémicos, hiperinsulinémicos y resistentes a insulina. Se toman muestra de los animales previamente, se miden sus niveles de glucosa, y se agrupan de manera que el nivel medio de glucosa sea el mismo para cada grupo. Los compuestos se administran diariamente cada día o dos veces al día mediante vías diferentes (p.o., i.p., s.c.) durante 7-28 días. Se recoge sangre en diversos momentos y se determinan los niveles de glucosa e insulina en plasma. Los compuestos que mejoran la sensibilidad a insulina en estos modelos disminuirán los niveles tanto de glucosa como insulina en plasma cuando se compara con el grupo de control tratado con vehículo.

6. Secreción de insulina

Los compuestos que potencian la secreción de insulina a partir del páncreas incrementarán los niveles de insulina en plasma y mejorarán la desaparición de glucosa en plasma después de la administración de una carga de glucosa. Cuando se miden los niveles de insulina, se administran los compuestos mediante vías diferentes (p.o., i.p., s.c. o i.v.) a ratas o ratones normales en ayunas durante toda una noche. En el momento apropiado se proporciona una carga de glucosa intravenosa (0,4 g/kg), se recoge sangre un minuto más tarde. Se determinan los niveles de insulina en plasma. Los compuestos que potencian la secreción de insulina incrementarán los niveles de insulina en plasma comparado con los animales a los que solo se les ha proporcionado solamente glucosa. Cuando se mide la desaparición de glucosa, se toma muestra de la sangre de los animales en el momento apropiado después de la administración del compuesto, después se proporciona una carga de glucosa o bien oral o por vía intraperitoneal (1 g/kg), se toma muestra de sangre de nuevo después de 15, 30, 60 y 90 minutos y se determinan los niveles de glucosa en sangre. Los compuestos que incrementan los niveles de insulina disminuirán los niveles de glucosa y el área bajo la curva de glucosa cuando se compara con el grupo tratado con vehículo al que se proporciona solamente glucosa.

Ejemplo 17

20 Ensayo de compuestos *In vivo*/validación diana

1. Dolor

Dolor agudo

Se mide el dolor agudo sobre una placa caliente principalmente en ratas. Se usan dos variantes de ensayo en placa caliente: en la variante clásica los animales se colocan en una superficie caliente (52 a 56°C) y el tiempo de latencia se mide hasta que los animales muestran un comportamiento nocifensivo, tal como el escalón o lamedura de pata. La otra variante es una placa de temperatura creciente donde los animales experimentales se colocan sobre una superficie de temperatura neutra. Posteriormente esta superficie se calienta de manera lenta pero constante hasta que los animales comienzan a lamer una pata posterior. La temperatura que se alcanza cuando comienza la lamedura de la pata posterior es una medida del umbral del dolor.

Se ensayan los compuestos contra un grupo de control tratado con vehículo. La aplicación de la sustancia se realiza en diferentes momentos mediante diferentes vías de aplicación (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradérmica, transdérmica) antes del ensayo de dolor.

Dolor persistente

El dolor persistente se mide con el ensayo de formalina o capsaicina, principalmente en ratas. Una solución de formalina al 1 a 5% o 10 a 100 µg de capsaicina se inyecta en una pata trasera del animal experimental. Después de la aplicación de formalina o capsaicina los animales muestran reacciones nocifensivas de tipo retroceso, lamido y golpeado de la pata afectada. El número de reacciones nocifensivas dentro de un marco de tiempo de hasta 90 minutos es una medida de la intensidad de dolor.

Los compuestos se ensayan contra un grupo de control tratado con vehículo. La aplicación de sustancias se realiza en momentos de tiempo diferentes mediante vías de aplicación diferentes (i. v., i. p., p. o., i. t., i. c. v., s. c., intradérmica, transdérmica) antes de la administración de formalina o capsaicina.

Dolor neuropático

El dolor neuropático se induce mediante variantes diferentes de lesión de nervio ciático unilateral principalmente en ratas. La operación se realiza bajo anestesia. La primera variante de lesión de nervio ciático se produce colocando ligaduras constrictoras holgadas alrededor del nervio ciático común. La segunda variante es la ligadura estrecha de aproximadamente la mitad del diámetro del nervio ciático común. En la siguiente variante, se usa un grupo de modelos en el que las ligaduras o secciones transversales se hacen de los nervios espinales o bien L5 y L6, o el nervio espinal L% solamente. La cuarta variante implica una axotomía de las tres ramas terminales del nervio ciático (nervios tibial y común perineales) que dejan el nervio sural restante intacto mientras que la última variante comprende la axotomía de solamente la rama tibial que deja los nervios sural y común sin lesionar. Los animales de control se tratan con una operación fingida.

Después de la operación, los animales lesionados en los nervios desarrollan una alodinia mecánica crónica, alodinia fría, así como una hiperalgesia térmica. La alodinia mecánica se mide por medio de un transductor de presión (anestesiómetro electrónico de von Frey, IITC Inc. - Life Science Instruments, Woodland Hills, S. A, Estados Unidos; sistema electrónico von Frey, Somedic sales AB, Orbi, Suecia). La hiperalgesia térmica se mide por medio de una fuente de calor radiante (ensayo Plantar, Ugo Basile, Comerio, Italia), o por medio de una placa fría de 5 a 10°C

donde las reacciones nocifensivas de la pata trasera afectada se cuentan como una medida de la intensidad de dolor. Un ensayo adicional para el dolor inducido por frío es el recuento de reacciones nocifensivas, o duración de respuestas nocifensivas después de la administración plantar de acetona al miembro posterior afectado. El dolor crónico en general se determina registrando el ritmo circadiano en actividad (Surjo y Arndt, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania), y puntuando diferencias en el andar (foot print patterns; programa FOOTPRINTS, Klapdor y col., 1997. A low cost method to analyse footprint patterns. J. Neurosci. Methods 75, 49-54).

Los compuestos se ensayan contra los grupos de control operados fingidamente o tratado con vehículo. La aplicación de sustancia se realiza en momentos de tipo diferentes mediante las vías de aplicación diferentes (i. v., i. p., p. o., i. t., i. c. v., s. c., intradérmica, transdérmica) antes del ensayo de dolor.

Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio se induce principalmente en ratas mediante la inyección de 0,75 mg de carragenano o adyuvante de Freund en una pata trasera. Los animales desarrollan un edema con alodinia mecánica así como hiperalgesia térmica. La alodinia mecánica se mide por medio de un transductor de presión (anestesiómetro electrónico de von Frey, IITC Inc. - Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, Estados Unidos). La hiperalgesia térmica se mide por medio de una fuente de calor radiante (ensayo Plantar, Ugo Basile, Comerio, Italia, estimulador térmico de la pata, G. Ozaki, Universidad de California, Estados Unidos). Para la medición de edema se están usando dos procedimientos. En el primer procedimiento, los animales se sacrifican y las patas traseras afectadas se seccionan y se pesan. El segundo procedimiento comprende diferencias en el volumen de la pata midiendo el desplazamiento de agua en un pletismómetro (Ugo Basile, Comerio, Italia).

Los compuestos se ensayan contra grupos de control inflamados así como tratados con vehículo. La aplicación de sustancia se realiza en momentos de tipo diferentes mediante las vías de aplicación diferentes (i. v., i. p., p. o., i. t., i. c. v., s. c., intradérmica, transdérmica) antes del ensayo de dolor.

Dolor neuropático diabético

Ratas tratadas con una sola inyección intraperitoneal de 50 a 80 mg/kg de estreptozotocina desarrollan una hiperglucemia profunda y alodinia mecánica dentro de 1 a 3 semanas. La alodinia mecánica se mide por medio de un transductor de presión (anestesiómetro electrónico de von Frey, IITC Inc. - Life Science Instruments, Woodland Hills, S. A, Estados Unidos).

Los compuestos se ensayan contra grupos de control tratados con vehículo diabéticos y no diabéticos. La aplicación de sustancia se realiza en momentos de tipo diferentes mediante las vías de aplicación diferentes (i. v., i. p., p. o., i. t., i. c. v., s. c., intradérmica, transdérmica) antes del ensayo de dolor.

2. Enfermedad de Parkinson

Lesión por 6-hidroxidopamina (6-OH-DA)

La degeneración de las rutas nigroestriada y estratopalidal dopaminérgica es el episodio patológico central en la enfermedad de Parkinson. Este trastorno de ha imitado experimentalmente en ratas usando inyecciones estereotáxicas unilaterales individuales/secuenciales de 6-OH-DA en el haz prosencefálico medio (MFB).

Se usan machos de ratas Wistar (Harlan Winkelmann, Alemania), que pesan 200 ± 250 g en el comienzo del experimento. Las ratas se mantienen en un ambiente controlado de temperatura y humedad en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con el acceso libre a alimento y agua cuando no están en condiciones experimentales. Los siguientes protocolos *in vivo* están aprobados por las autoridades gubernamentales. Se hacen todos los esfuerzos para minimizar que el animal sufra, para reducir el número de animales usados, y para utilizar técnicas alternativas *in vivo*.

A los animales se les administra pargilina el día de la cirugía (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos; 50 mg/kg i. p.) con el fin de inhibir el metabolismo de 6-OHDA por la monoamino oxidasa y desmetilimipramina HCl (Sigma; 25 mg/kg i. p.) con el fin de evitar la ingesta de 6-OHDA por terminales noradrenérgicos. Treinta minutos más tarde las ratas de anestesia con pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y se colocan en una estructura estereotáxica. Con el fin de lesionar la ruta DA nigroestriada se inyectan 4 μ l de ácido ascórbico al 0,01%-solución salina que contiene 8 μ g de 6-OHDA HBr (Sigma) en el haz prosencefálico medio izquierdo a una velocidad de 1 μ l/min (2,4 mm anterior, 1,49 mm lateral, -2,7 mm ventral a Bregma y a superficie del cráneo). Se deja la aguja en lugar 5 minutos adicionales para permitir que se produzca la difusión.

Ensayo de escalón

La aquinesia del miembro anterior se determina tres semanas después del establecimiento de la lesión usando un protocolo de ensayo por etapas modificado. En resumen, los animales son mantenidos por el experimentador con una mano fijando los miembros traseros y elevando ligeramente la parte del miembro por encima de la superficie. Una pata está tocando la mesa, y después de mueve lentamente oblicuamente (5 s durante 1 m), primero en la dirección delantera y después en la trasera. El número de etapas de ajuste se cuenta para ambas patas en la dirección delantera y trasera de movimiento. La secuencia de ensayo es posición delantera y trasera de la para derecha ajustando el escalón, seguido de direcciones delantera y trasera de la pata izquierda. El ensayo se repite tres veces tres días consecutivos, después de un período inicial de entrenamiento de tres días antes de del primer ensayo. El escalón ajustado delantero no revela diferencias consistentes entre animales lesionados y de control sanos. Por lo tanto el análisis de restringe a escalón ajustado de la parte de atrás.

Ensayo de equilibrio

Los ajustes de equilibrio después del desafío postural también se miden durante las sesiones de ensayo de escalón. Las ratas se mantienen en la misma posición como se describe en el ensayo de escalón y, en lugar de moverse lateralmente, se inclina por el experimentador hacia el lado de la para que toca la pata. Esta maniobra da como resultado la pérdida de equilibrio y la capacidad de las ratas de recuperar el equilibrio mediante movimientos de de la pata delantera se puntúa en una escala que varía entre 0 y 3. La puntuación 0 se proporciona para una colocación normal de la parte delantera. Cuando el movimiento de la parte delantera se retrasa pero se del equilibrio postural detectado, se proporciona la puntuación 1. La puntuación 2 representa una reacción de la pata delantera, clara, todavía insuficiente, como se evidencia mediante la contracción muscular, pero que carece de éxito cuando recupera el equilibrio, y al puntuación 3 se proporciona para ninguna reacción de movimiento. El ensayo se repite tres veces al día en cada lado durante tres días consecutivos después de un período de entrenamiento inicial de tres días antes del primer ensayo.

Ensayo de escalera (estiramiento de pata)

Una versión modificada del ensayo de la escalera se usa para la evaluación del comportamiento de estiramiento de la pata tres semanas después del establecimiento de la lesión primaria y secundaria. Se usan cajas de ensayo de plexiglás con una plataforma central y escalera removible sobre cada lado. El aparato de diseña de tal manera que solamente la pata sobre el mismo lado en cada escalera se puede usar, proporcionando de esta manera una medida de uso del miembro delantero independiente. Para cada ensayo los animales se dejan en las cajas de ensayo durante 15 minutos. La escalera doble se llena con gránulos 7 x 3 de pienso (gránulos de alimento de precisión, fórmula: P, dieta de roedor purificada, tamaño 45 mg; Sandown Scientific) en cada lado. Después de cada ensayo se cuentan separadamente el número de gránulos comidos (gránulos recuperados con éxito) y el número de gránulos tomados (tocados pero abandonados) para cada pata y la tasa de éxito (gránulos comidos/gránulos tomados). Después de tres días de privación de alimento (12 g por animal al día) los animales se ensayan durante 11 días. Se lleva a cabo un análisis completo solamente durante los últimos cinco días.

Tratamiento MPTP

La neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) provoca degeneración de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (DAérgica) en roedores, primates no humanos, y se res humanos y, haciendo de esta manera, reproduce muchos de los síntomas de la enfermedad de Parkinson. MPTP conduce a un marcado descenso en los niveles de dopamina y sus metabolitos, y en el número de terminales dopaminérgicos en el estriado así como pérdida grave de los cuerpos celulares de tirosina hidrolasa (TH)- inmunorreactivos en al sustancia negra, pars compacta.

Con el fin de obtener lesiones graves y de larga duración, y reducir la mortalidad, los animales reciben inyecciones individuales de MPTP, y después de ensayan para evaluar la gravedad de la lesión 7-10 días después. Las inyecciones sucesivas de MPTP se administran los días 1, 2, y 3. Los animales reciben la aplicación de 4 mg/kg de clorhidrato de MPTP (Sigma) en solución salina una vez al día. Todas las inyecciones son intraperitoneales (i. p.) y la solución madre de MPTP se congela entre inyecciones. Los animales se decapitan el día 11.

Inmunohistología

A la finalización de los experimentos de comportamiento, todos los animales se anestesian con 3 ml de tiopental (1 g/40 ml i. p., Tyrol Pharma). Los ratones se prefunden transcárdialmente con PBS 0,01 M (pH 7,4) durante 2 minutos, seguido de paraformaldehído al 4% (Merck) en PBS durante 15 minutos. Se retiran los cerebros y se colocan en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4°C. Para deshidratación se transfieren después a una solución de sacarosa al 20% (Meck) en PBS 0,1 M a 4°C hasta que se humedecen. Los cerebros se congelan en metilbutano a -20°C durante 2 minutos y se almacenan a -70°C. Usando un microtomo de arrastre (mod. 3800 - Frigocut, Leica), se toman secciones de 25 µm del gen del cuerpo calloso (AP 1,7 mm) al hipocampo (AP 21,8 mm) y de AP 24,16 a AP 26,72. Se cortan 46 secciones y se almacenan en clasificadores en tampón Tris 0,25 M (pH 7,4) para inmunohistoquímica.

Se procesa una serie de secciones para evaluar la inmunohistoquímica de la tirosina hidrolasa sin flotar (TH). Después de tres enjuagues en PBS 0,1 M, la actividad de la peroxidasa se inactiva durante 10 minutos en H_2O_2 al 0,3% ± PBS. Después de enjuagar en PBS, se preincuban secciones en suero bovino normal al 10% (Sigma) durante 5 minutos como agente de bloqueo y se transfieren a cualquier antisuero de conejo anti-rata TH primario (dilución 1:2000).

Después de la incubación durante toda una noche a temperatura ambiente, se enjuagan secciones para inmunorreactividad TH en PBS (2 x 10 minutos) y se incuban en inmunoglobulina G anti-conejo biotilada enjuagada en cabra (dilución 1:200) (Vector) durante 90 minutos, se enjuga repetidamente y se transfiere a solución de Vectastáina ABC (Vector) durante 1 hora. El clorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB; Sigma) en PBS 0,1 M, suplementado con H_2O_2 al 0,005%, sirve como cromógeno en la reacción posterior de visualización. Se montan secciones sobre portaobjetos revestidos de gelatina, se dejan durante toda una noche, se tiñen por contraste con hematoxilina deshidratada en concentraciones crecientes de alcohol y se limpian en butilacetato. Los cubreobjetos se montan en entellan.

Ensayo de la varilla rotatoria

Los inventores usan una modificación del procedimiento descrito por Rozas y Labendaira-García (1997), con un sistema Rotamex CR-1 (Columbus Instruments, Columbus, OH) que comprende un ordenador personal IBM-compatible, una carta de adquisición de datos CIO-24, una unidad de control, y una unidad de varilla rotatoria de cuatro bandas. La unidad de varilla rotatoria consta de un eje rotante (diámetro 7,3 cm) y compartimientos individuales para cada ratón. El software del sistema permite la programación previa de los protocolos de sesión con velocidades rotacionales variantes (0-80 rpm). Se usan rayos infrarrojos para detectar un ratón que cae en la rejilla de base debajo de la varilla rotatoria. El sistema registra la caída como el final del experimento para ese ratón, y el tiempo total de la varilla rotatoria, así como, así como el tiempo de caída y todos los parámetros de establecimiento se registran. El sistema también permite que una corriente débil pase a través de la rejilla de base, para ayudar el entrenamiento.

1. Demencia

La tarea de reconocimiento de objetos

La tarea de reconocimiento de objetos se ha diseñado para determinar los efectos de las manipulaciones experimentales del comportamiento cognitivo de roedores. Una rata se coloca en un campo abierto, en el que están presentes dos objetos idénticos. Las ratas inspeccionan ambos objetos durante la primera prueba de la tarea de reconocimiento de objetos. En una segunda prueba, después de un intervalo de retención de por ejemplo 24, horas, uno de los dos objetos usados en esta prueba inicial, el objeto "familiar", y un objeto novedoso se colocan en el campo abierto. El tiempo de inspección en cada uno de los objetos se registra. Las medidas básicas en la tarea OR es el tiempo gastado por una rata que explora los dos objetos de la segunda prueba. La buena retención se refleja por unos tiempos de exploración más altos hacia el objeto novedoso que el objeto "familiar".

La administración del potenciador de cognición supuesto a la primera prueba predominantemente permite la determinación de los efectos tras la adquisición, y eventualmente tras los procedimientos de consolidación. La administración del compuesto de ensayo después de la primera prueba permite la determinación de los efectos tras los procedimientos de consolidación, mientras que la administración antes de la segunda prueba permite medir los efectos tras los procedimientos de recuperación.

La tarea de evitación pasiva

La tarea de evitación pasiva determina el comportamiento de memoria en ratas y ratones. El aparato de anulación inhibidora consta de una caja de dos compartimientos con un compartimiento luminoso y un compartimiento oscuro. Los dos compartimientos están separados por una puerta de guillotina que puede operar el experimentador. Un umbral de 2 cm separa los dos compartimientos cuando la puerta de guillotina se levanta. Cuando la puerta está abierta, la iluminación en el compartimiento oscuro es aproximadamente 2 lux. La intensidad de la luz es aproximadamente 500 lux en el centro del suelo del compartimiento luminoso.

Se proporcionan dos sesiones de habituación, una sesión de choque, y una sesión de retención, separadas por intervalos Inter-sesión de 24 horas. En las sesiones de habituación y la sesión de retención la rata se deja se deja explorar el aparato durante 300 segundos. La rata se coloca en el compartimiento luminoso, en frente de la pared opuesta de la puerta de guillotina. Después de un período de acomodación de 15 segundos, se abre al puerta de guillotina de manera que todas las partes del aparato se puedan visitar libremente. Las ratas normalmente evitan las áreas de luz brillante y entrarán dentro del compartimiento oscuro en unos pocos segundos.

En la sesión de choque la puerta de guillotina entre los compartimientos se reduce tan pronto como la rata ha entrado en el compartimiento oscuro con sus cuatro patas, y se administra un choque en las patas de 1 mA de alerta se administra durante 2 segundos. La rata se retira del aparato y se vuelve a colocar en su jaula de alojamiento. El procedimiento durante la sesión de retención es idéntica a la de las sesiones de habituaciones.

La latencia a través de la etapa, que es la primera latencia de entrada en el compartimiento oscuro (en segundos) durante la sesión de retención es un índice del comportamiento de memoria del animal; cuanto más larga es la latencia para entrar al compartimiento oscuro, mejor es la retención. Un compuesto de ensayo se proporciona una hora y media antes de la sesión de choque, junto con 1 mg/kg de escopolamina. La escopolamina altera el comportamiento de la memoria durante la sesión de retención 24 horas después. Si el compuesto de ensayo aumenta la latencia de entrada comparado con los controles tratados con escopolamina, es probable que posean potencial que eleva la cognición.

La tarea de escape del agua de Morris

La tarea de escape de Morris mide la orientación espacial de aprendizaje de roedores. Es un sistema de ensayo que se ha usado en gran medida para investigar los efectos de los agentes terapéuticos supuestos sobre las funciones cognitivas de ratas y ratones. El comportamiento de un animal se determina en un tanque de agua circular con una plataforma de escape que se sumerge aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del agua. La plataforma de escape no es visible para un animal que nada en el tanque de agua. Se proporcionan señales extra laberinto abundantes por los muebles en la habitación, incluyendo escritorios, equipo de ordenador, un segundo tanque de agua, la presencia del experimentador, y por un radio de una repisa que esta jugando suavemente.

Los animales reciben cuatro pruebas durante cinco sesiones de adquisición. Una prueba se comienza colocando un animal en el estanque, enfrente de la pared del tanque. Cada una de las cuatro posiciones de partida en los cuadrantes norte, este, sur, y oeste se usa una vez en una serie de cuatro pruebas; su orden está distribuido al azar. La plataforma de escape está siempre en la misma posición. Se termina una prueba tan pronto como el animal había subido sobre la plataforma de escape o cuando habían transcurrido 90 segundos, cualquiera de los casos sucede primero. El animal de deja estar sobre la plataforma durante 30 segundos. Después se saca de la plataforma y se comienza la siguiente prueba. Si un animal no encuentra la plataforma en 90 segundos lo pone sobre la plataforma el experimentador y se deja estar durante 30 segundos. Después de la cuarta prueba del quinto sesión diaria, se proporciona una prueba adicional como una prueba de sonda: la plataforma se retira, y el tiempo que el animal pasa en los cuatro cuadrantes de mide durante 30 ó 60 segundos. En la prueba de sonda, todos los animales comienzan desde la misma posición de partida, opuesto al cuadrante donde la plataforma de escape se había posicionado durante la adquisición.

Se toman cuatro medidades diferentes para evaluar el comportamiento de un animal durante el entrenamiento de adquisición; latencia de escape, distancia viajada, distancia a la plataforma, y velocidad de natación. Las siguientes medidas se evalúan para la prueba de sonda: tiempo(s) en cuadrantes y distancia viajada (cm) en los cuatro cuadrantes. La prueba de sonda proporciona información adicional sobre cómo de bien un animal aprende la posición de la plataforma de escape. Si un animal gasta más tiempo y nada una distancia más larga en el cuadrante donde la plataforma se ha posicionado durante las sesiones de adquisición que en cualquier otro cuadrante, se concluye que la posición de la plataforma se ha aprendido bien.

Con el fin de determinar los efectos de los compuestos potenciadores de cognición supuestos, se usan ratas o ratones con lesiones de cerebro específicas que alteran las funciones cognitivas, o animales tratados con compuestos tales como escopolamina o MK-801, que interfieren con el aprendizaje normal, o animales viejos que padecen déficits cognitivos.

La tarea de alternación espontánea de laberinto T

La tarea de alternación espontánea de laberinto T (TeMCAT) determina el comportamiento de memoria espacial en ratones. El brazo de partida y los dos brazos de objetivo del laberinto en T se proporcionan con puertas de guillotina que se pueden operar manualmente por el experimentador. Un ratón se pone en el brazo de partida en el comienzo del entrenamiento. Se cierra la puerta de guillotina. Al final de la prueba, la "prueba forzada", se bloquea el brazo objetivo a o bien izquierdo o derecho bajando la puerta de guillotina. Después de que el ratón se ha liberado del brazo de partida, negociará el laberinto, eventualmente entra en el brazo objetivo abierto, u regresa a la posición de partida, donde se confinará durante 5 segundos, reduciendo la puerta de guillotina. Después, el animal puede elegir libremente entre el brazo objetivo izquierdo y derecho (todas las puertas de guillotina abiertas) durante las 14 pruebas "de elección libre". Tan pronto como el ratón ha entrado en el brazo objetivo, se cierra la otra. El ratón eventualmente regresa al brazo de partida y es libre de visitar cualquiera de los brazos objetivo si lo desea después de que se ha confinado en el brazo de partida durante 5 segundos. Después de la finalización de las 14 pruebas de elección libre en una sesión, se retira el animal del laberinto, el animal nunca está manipulado.

Se calcula el porcentaje de alteraciones de las 14 pruebas. Este porcentaje y el tiempo total necesario para completar la primera prueba forzada y las posteriores 14 pruebas de elección libre(en s) se analiza. Los déficits cognitivos se inducen usualmente por una inyección de escopolamina, 30 minutos antes del comienzo de la sesión de entrenamiento. La escopolamina reducía el porcentaje de alteraciones que cambia o reduce el nivel. Un potenciador de cognición, que está ya administrado antes de la sesión de entrenamiento, antagonizará, al menos parcialmente la reducción inducida por escopolamina en la tasa de alternancia espontánea.

Ejemplo 18

Expresión de GPCR humano recombinante

5 El vector de expresión de *Pichia pastoris* pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) se usa para producir grandes cantidades de los polipéptidos de GPCR humano recombinante en levadura. La secuencia de ADN que codifica GPCR se deriva de la SEQ ID N° 1. Antes de la inserción en el vector pPICZB, la secuencia de ADN se modifica mediante procedimientos bien conocidos de tal forma que contiene en su extremo 5' un codón de inicio y en su extremo 3' un sitio de escisión de enteroquinasa, y una marca indicadora His6 y un codón de terminación. Además, en ambas secuencias de reconocimiento de los extremos para las endonucleasas de restricción se añaden y después de la digestión del sitio de clonación múltiple de pPICZ B con las correspondientes enzimas de restricción la secuencia de ADN modificada se liga en pPICZB. El vector de expresión se diseña para la expresión inducible en *Pichia pastoris*, conducida por un promotor de levadura. El vector pPICZ/md-His6 resultante se usa para transformar la levadura.

15 La levadura se cultiva en condiciones usuales en matraces de 5 litros y la proteína producida de manera recombinante se aísla del cultivo mediante cromatografía de afinidad (resina Ni-NTA) en presencia de urea 8 M. El polipéptido unido se eluye con tampón, pH 3,5, y se neutraliza. La separación del polipéptido de la marca indicadora His6 se realiza mediante proteólisis específica del sitio usando enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtiene el polipéptido de GPCR humano purificado.

Ejemplo 19

Expresión específica del tejido de GPCR

25 El patrón de expresión cualitativo de GPCR en diversos tejidos se determina mediante Reacción en cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR).

Para demostrar que GPCR está implicado en el proceso patológico de COPD, el panel de expresión inicial consta de muestras de ARN de tejidos respiratorios y células inflamatorias relevantes a COPD: pulmón (adulto y fetal), tráquea, células de tipo II alveolar cultivadas y aisladas, células epiteliales bronquiales humanas cultivadas, células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas cultivadas, células de músculo liso bronquiales cultivadas, células H441 (de tipo Clara), neutrófilos y monocitos aislados de recientemente, y monocitos cultivados (de tipo macrófago). También se lleva a cabo el perfil del mapa corporal, usando paneles de ARN total comprados en Clontech. Los tejidos son glándula adrenal, médula ósea, cerebro, colon, corazón, riñón, hígado, glándula mamaria, páncreas, próstata, glándula salivar, músculo esquelético, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, tráquea, tiroides, y útero.

Para demostrar que GPCR está implicado en cáncer, se determina la expresión en los siguientes tejidos: glándula adrenal, médula ósea, cerebro, cerebelo, colon, cerebro fetal, hígado fetal, riñón, hígado, pulmón, glándula mamaria, páncreas, placenta, próstata, glándula salivar, músculo esquelético, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, útero, y linfocitos de la sangre periférica. También se determina la expresión en las siguientes líneas celulares: DU-145 (próstata), NCI-H125 (pulmón), HT-29 (colon), COLO-205 (colon), A-549 (pulmón), NCI-H460 (pulmón), HT-116 (colon), DLD-1 (colon), MDA-MD-231 (mama), LS174T (colon), ZF-75 (mama), MDA-MN-435 (mama), HT-1080, MCF-7 (mama), y U87. También se analizan los pares coincidentes de tejido maligno y normal del mismo paciente.

Para demostrar que el GPCR está implicado en proceso patológico de obesidad, se determina la expresión en los siguientes tejidos: tejido adiposo subcutáneo, tejido adiposo mesentérico, glándula adrenal, médula ósea, cerebro (cerebelo, médula espinal, córtex cerebral, caudato, médula, sustancia nigra, y putamen), colon, cerebro fetal, corazón, riñón, hígado, pulmón, glándula mamaria, páncreas, placenta, próstata, glándula salivar, músculo esquelético, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, y útero. También se ensayan líneas celulares de neuroblastoma SK-Nr-Be (2), Hr, Sk-N-As, HTB-10, IMR-32, SNSY-5Y, T3, SK-N-D2, D283, DAOY, CHP-2, U87MG, BE(2) C, T986, KANTS, MO59K, CHP234, C6 (rat), SK-N-F1, SK-PU-DW, PFSK-1, BE(2) M17, y MCIXC para la expresión de GPCR. Como etapa final, se compara la expresión de GPCR en las células derivadas de individuos normales con la expresión de células derivadas de individuos obesos.

Para demostrar que GPCR está implicado en el proceso patológico de diabetes, se selecciona el siguiente panel del cuerpo entero que muestra expresión predominante o altamente relativa: tejido subcutáneo y mesentérico, glándula adrenal, médula ósea, cerebro, colon, cerebro fetal, corazón, hipotálamo, riñón, hígado, pulmón, glándula mamaria, páncreas, placenta, próstata, glándula salivar, músculo esquelético, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, y útero. Se ensayan células de islotes humanos y una genoteca de células de islotes. Como etapa final, se compara la expresión de GPCR en las células derivadas de individuos normales con la expresión de las células derivadas de individuos derivados.

Para demostrar que GPCR está implicado en los trastornos de SNC, se seleccionan los siguientes tejidos: cerebro fetal y adulto, músculo, corazón, pulmón, riñón, hígado, timo, testículos, colon, placenta, tráquea, páncreas, riñón, mucosa gástrica, colon, hígado, cerebelo, piel, cortex (de Alzheimer y normal), hipotálamo, córtex, amígdala, cerebelo, hipocampo, plexo coroide, tálamo, y médula espinal.

Para demostrar que el GPCR está implicado en el proceso patológico de asma, se selecciona el siguiente panel del cuerpo entero que muestra expresión predominante o altamente relativa en pulmón o tejidos inmunes: cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, tráquea, médula ósea, colon, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula mamaria, músculo esquelético, próstata, testículos, útero, cerebelo, cerebro fetal, hígado fetal, médula espinal, placenta, glándula adrenal, páncreas, glándula salivar, tiroides, leucocitos de sangre periférica, ganglio linfático, y amígdala. Una vez que se establece, las células de pulmón y sistema inmune se seleccionan para localizar la expresión a subconjuntos de células particulares: pulmón células endoteliales microvasculares, células bronquiales/de tráquea, células del músculo liso bronquiales/de tráquea, fibroblastos de pulmón, células T (subconjunto 1 de auxiliares T, subconjunto 2 de auxiliares T, subconjunto de células NKT, y linfocitos t citotóxicos), células B, células mononucleares (monocitos y macrófago), mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, y células dendríticas. Como etapa final, se compara la expresión de GPCR en las células derivadas de individuos normales con la expresión de las células derivadas de individuos asmáticos.

Perfil de expresión cuantitativa. El perfil de expresión cuantitativa se realiza en la forma de análisis cuantitativo de PCR llamado “análisis cinética” discreto en primer lugar en Higuchi *et al.*, BioTechnology 10, 413-17, 1992, y Higuchi *et al.*, BioTechnology 11, 1026-30, 1993. El principio es que cualquier ciclo dado dentro de la fase exponencial de la PCR, la cantidad de producto es proporcional al número inicial de copias del molde.

Si la amplificación se realiza en la presencia de un oligonucleótido fluorescentes inactivado de manera interna (sonda Taqman) complementario con la secuencia diana, la sonda se escinde mediante la actividad de la endonucleasa 5'-3' de Taq ADN polimerasa y un tinte fluorescente liberado en el medio (Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 727 6-80, 1991). Debido a la emisión de fluorescencia se incrementará en proporción directa con la cantidad del producto amplificado específico, se puede detectar la fase de crecimiento exponencial del producto de PCR y usarse para determinar la concentración del molde inicial (Heid *et al.*, Genome Res. 6, 986-94, 1996, y Gibson *et al.*, Genome Res. 6, 995-1001, 1996).

La amplificación de un control endógeno se puede realizar para estandarizar la cantidad de ARN de muestra añadida a una reacción. En este tipo de experimento, el control de elección es el ARN ribosómico 18S. Debido a que los tintes indicadores con diferentes espectros de emisión están disponibles, la diana y el control endógeno se puede cuantificar de manera independiente en el mismo tubo si se usan las sondas se etiquetan con diferentes tipos.

Todas las mediciones de “PCR de tiempo real” de fluorescencia se realizan en ABI Prism 7700.

Extracción de ARN y preparación de ADNc. ARN total de los tejidos enumerados anteriormente se usan para la cuantificación de la expresión. Los ARN marcados “de autopsia” se extrajeron a partir de tejidos autópticos con el reactivo TRIzol (Life Technologies, MD) de acuerdo con el protocolo de del fabricante.

Cincuenta μg de cada ARN se trataron con ADNasa I durante 1 hora a 37°C in en la siguiente mezcla de reacción: 0,2 U/ μl sin ARNasa I (Roche Diagnostics, Alemania); 0,4 U/ μl de inhibidor de la ARNasa (PE Applied Biosystems, CA); 10 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; y 1 mM DTT.

Después de la incubación, se extrae el ARN una vez con 1 volumen de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y una vez con cloroformo, y se precipitó con 1/10 volúmenes de 3 M de acetato de sodio, pH 5,2, y 2 volúmenes de etanol.

Cincuenta μg de cada ARN de los tejidos autópticos se trataron con el kit sin ADNasa comprado en Ambion (Ambion, TX). Después de la resuspensión y cuantificación espectrofotométrica de cada muestra se transcribe de manera inversa con los reactivos de Transcripción inversa de TaqMan (PE Applied Biosystems, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración final de ARN en la mezcla de reacción es 200 ng/ μl . La transcripción inversa se lleva a cabo con 2,5 μM de cebadores de hexámeros al azar.

Análisis cuantitativo de TaqMan. Se diseñan cebadores y sonda específicos de acuerdo con las recomendaciones de PE Applied Biosystems; la sonda se puede etiquetar en el extremo de 5' con FAM (6-carboxi-fluoresceína) y en el extremo 3' con TAMRA (6-carboxi tetrametil-rodamina). Los experimentos de cuantificación se realizan sobre 10 ng de ARN transcrito de manera inversa a partir de cada muestra. Cada determinación se realiza por triplicado.

El contenido de ADNc total se normaliza con la cuantificación simultánea (multiplex PCR) del ARN ribosómico 18S usando los reactivos del ensayo TaqMan desarrollados previamente (PDAR) kit de control (PE Applied Biosystems, CA).

La mezcla de reacción de ensayo es como sigue: 1X final TaqMan Universal PCR Master Mix (a partir de solución solución madre 2 X) (PE Applied Biosystems, CA); 1 X PDAR control-ARN 18S (a partir de solución madre 20 X); 300 nM de cebador directo; 900 nM de cebador inverso; 200 nM de sonda; 10 ng de ADNc; y agua hasta 25 μl .

Se llevan a cabo cada una de las siguientes etapas una vez: pre PCR, 2 minutos a 50°C, y 10 minutos a 95°C. Se llevan a cabo las siguientes etapas 40 veces: desnaturalización, 15 segundos a 95°C, hibridación/extensión, 1 minuto a 60°C.

ES 2 305 229 T3

El experimento se realiza sobre un detector de secuencia ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, CA). Al final del experimento, los datos de fluorescencia adquiridos durante la PCR se procesan como se describe en el manual de usuarios de ABI Prism 7700 in con el fin de lograr mejor sustracción del fondo así como linealidad de señal con la cantidad diana de partida.

Ejemplo 20

Perfil de expresión

Se aisló ARN celular total a partir de células mediante uno de dos procedimientos estándar: (1) centrifugación en gradiente de densidad de isotiocianato de guanidina/cloruro de cesio o (2) el protocolo reactivo Tri de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). El ARN total preparado mediante el reactivo Tri se trató con ADNasa I para reatirar la contaminación de ADN genómico. Se aisló ARN a partir de las siguientes fuentes: células de músculo liso coronario; cerebro, testículos, páncreas, estómago, cerebelo, tráquea, glándula adrenal, músculo esquelético, glándula salivar, intestino delgado, próstata, hígado fetal, placenta, cerebro fetal, útero, glándula mamaria, corazón, bazo, pulmón, células HeLa, hígado, riñón, timo, médula ósea, tiroides, colon, vejiga, médula espinal, sangre periférica, hígado, cirrosis hepática, páncreas, cirrosis hepática, bazo, cirrosis hepática, cerebro total de Alzheimer, pulmón fetal, tumor de mama, tumor de colon, tumor de pulmón, células HEK 293, adiposo, pericardio, corazón fetal, tumor de tiroides, células MDA MB 231, células HEP G2, células HUVEC, riñón fetal, mama, células Jurkat T, córtex del cerebro de Alzheimer, cerviz, esófago, tálamo, circunvolución precentral, hipocampo, lóbulo occipital, pedúnculos cerebrales, circunvolución postcentral, lóbulo temporal, lóbulo parietal, cerebelo (derecho), cerebelo (izquierdo), amígdala de cerebelo, meninges cerebrales, protuberancias, lóbulo frontal, córtex cerebral, cuerpo calloso, vermix del cerebelo, lóbulo frontal del cerebro de Alzheimer, septo interventricular, atrio del corazón (derecho), atrio del corazón (izquierdo), y ventrículo del corazón (izquierdo).

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de GPCR humano, ARN total de cada fuente de célula o de tejido se transcribió primero de manera inversa. Ochenta y cinco μg de ARN total RNA se transcribió de manera inversa 1 μmole de cebadores de hexámero aleatorios, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (Qiagen, Hilden, Germany), 3000 U RnaseQut (Invitrogen, Groningen, Netherlands) en un volumen final de 680 μl . El tampón de síntesis de la primera hebra y Omniscript (2 u/ μl) de transcriptasa inversa eran de (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos y se enfrió en hielo. El volumen se ajustó hasta 6800 μl con agua, produciendo una concentración final de 12.5 ng/ μl de ARN de partida.

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de GPCR humano en las células y tejidos se usó el sistema de detección de secuencias Perkin Elmer ABI Prism[®]. 7700 o Biorad iCycler de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se establecieron para el GPCR humano cuantitativo y la administración de los genes HPRT, GAPDH, beta-actina, y otros. Los cebadores directos e inversos y sonda para el GPCR se diseñaron usando el software Perkin Elmer ABI Primer Express[™] y se sintetizaron mediante TibMolBiol (Berlin, Alemania). La secuencia del cebador directo X era: GGGTACTGGTCCTGCCTCC. La secuencia del cebador inverso X era AGAGGTTGGCAAGCAGGGA. La sonda fluorogénica, marcada con FAM como el tinte indicador y TAMRA como inactivador, es CGTCTACTTGGCTCCCAACTTCTCCTTCC.

Se establecieron las siguientes reacciones en un volumen final de 25 μl : tampón A 1X TaqMan A, 5,5 mM de MgCl_2 , 200 nM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dUTP, 0.025 U/ μl de AmpliTaq Oro.TM., 0,01 de U/ μl de AmpErase UNG[®] y sonda 1X, cebadores directos e inversos de GPCR humano cada uno a 200 nM, 200 nM de sonda marcada con FAM/TAMRA de GPCR humano, y 5 μl de ADNc de molde. Los parámetros del ciclo térmico eran 2 min HOLD a 50°C, 10 min HOLD a 95°C, seguido de una fusión a 95°C durante 15 sec e hibridación/extensión a 60°C durante 1 min para cada uno de los 40 ciclos.

Cálculo de los valores de CT corregidos

El valor de CT se calcula como se ha descrito anteriormente. El valor de CF se calcula como sigue:

1. Se establecieron las reacciones de PCR para cuantificar la administración de los genes (HKG) para cada muestra de ADNc.

2. Los valores de CTHKG se calcularon como se ha descrito anteriormente.

3. Se calculan los valores medios de CT se todos los HKG para cada ADNc (n = número de HKG):

$$(\text{Valor de CT}_{\text{HKG1}} + \text{Valor de CT}_{\text{HKG2}} + \text{Valor de CT}_{\text{HKG-X}}) / n = \text{valores medios de CT}_{\text{ADNc-X}}$$

(n = número de los ADNc)

4.

(Valor medio de CT_{ADNc-1} + Valor medio de CT_{ADNc-X}) / y = valor medio de CT_{panel}

5 (y = número de los ADNc)

5.

10 (Valor medio de CT_{panel} - Valor medio de CT_{ADNc-X} = CF_{ADNc-X}

6.

15 $CT_{ADNc-X} + CF_{ADNc-X} = CT_{cor-ADNc-X}$

Cálculo de la expresión relativa

20 Definición:

La más alta $CT_{cor-ADNc-X \neq 40}$ se define como $CT_{cor-ADNc-X}$ [alto]

25 Expresión relativa = $2e(CT_{cor-ADNc-X}$ [alto] - $CT_{cor-ADNc-Y}$)

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) is se muestra en las Figs. 11-13.

30 El ARNm de GPCR humano se expresa en diferentes tejidos humanos. Se expresa en gran medida en la circunvolución postcentral, meninges cerebrales, corazón (atrio: izquierdo + derecho), sangre periférica, pulmón tumor, hígado fetal, hígado (cirrosis), estómago, intestino delgado, colon, riñón, riñón fetal, tumor de mama, glándula mamaria, tráquea, placenta.

35 El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en tejidos de cerebro como circunvolución postcentral y meninges cerebrales. Los expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y enfermedades periféricas y del sistema nervioso central.

40 El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en tumor de pulmón y tumor de mama. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y cáncer.

El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en hígado, hígado (cirrosis hepática), riñón, riñón fetal. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y enfermedades del hígado y riñón.

45 El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en placenta. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y enfermedades genito urinarias.

El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en glándula mamaria. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y enfermedades de los órganos secretores.

50 El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en la sangre periférica. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y hematología, asma y COPD.

55 El ARNm de GPCR humano se expresa en gran medida en corazón. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados sugiere una asociación entre GPCR humano y enfermedades cardiovasculares.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la detección de un polinucleótido que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

I) hibridar un polinucleótido seleccionado entre el grupo constituido por:

10 a) un polinucleótido que codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

i. secuencias de aminoácidos que son al menos un 50% idénticas a las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2; y

15 ii. las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2.

b) a polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1;

20 c) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido especificado en (a) y (b) y codifica un Polipéptido del receptor acoplado a la proteína G;

d) un polinucleótido cuya secuencia se deriva las secuencias de polinucleótido especificadas en (a) a (c) debido a la generación del código genético y codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G; y

25 e) un polinucleótido que representa un fragmento o o variación alélica de una secuencia de polinucleótidos especificada en (a) a (d) y codifica un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G a un material de ácido nucleico de una muestra biológica, formando de esta forma un complejo de hibridación; y

II) detectar dicho complejo de hibridación.

30 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que antes de la hibridación, se amplifica el material de ácido nucleico de la muestra biológica.

35 3. Un procedimiento para la detección de un polinucleótido de la reivindicación 1 o un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G codificado por tal polinucleótido que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra biológica con un oligonucleótido que interactúa de manera específica con el polinucleótido o con el anticuerpo que interactúa de manera específica con el polipéptido del receptor acoplado a la proteína G y

40 b) detectar la interacción.

4. Un procedimiento de selección de agentes útiles para el tratamiento de cáncer de mama o de pulmón que disminuye la actividad de un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G, que comprende las etapas de:

45 a) poner en contacto un compuesto de ensayo con cualquier polipéptido del receptor acoplado a la proteína G codificado por un polinucleótido de la reivindicación 1;

50 b) detectar la unión del compuesto de ensayo al polipéptido del receptor acoplado a la proteína G, en el que un compuesto de ensayo que se une al polipéptido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G.

5. Un procedimiento de selección de agentes útiles para el tratamiento de cáncer de colon que incrementa la actividad de un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G, que comprende las etapas de:

55 a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G codificado por un polinucleótido de la reivindicación 1; y

60 b) detectar una actividad del receptor acoplado a la proteína G del polipéptido, en el que un compuesto de ensayo que incrementa la actividad del receptor acoplado a la proteína G se identifica como un agente terapéutico potencial para el tratamiento de cáncer de colon.

6. Un procedimiento de selección de agentes útiles para el tratamiento de cáncer de pulmón o de mama que disminuye la actividad del polipéptido del receptor acoplado a la proteína G, que comprende las etapas de:

65 a) poner en contacto un compuesto de ensayo con cualquier polinucleótido de la reivindicación 1; y

ES 2 305 229 T3

b) detectar la unión del compuesto de ensayo al polinucleótido, en el que un compuesto de ensayo que se une al polinucleótido se identifica como un agente terapéutico potencial para disminuir la actividad de un polipéptido del receptor acoplado a la proteína G.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1

```

atgacgcccc acagcaactgg cgaggtgccc agccccattc ccaagggggc tttggggctc
tccctggccc tggcaagcct catcatcacc gcgaacctgc tcctagccct gggcatcgcc
tgggaccgcc gcctgogcag cccacctget ggetgcttct tcctgagcct actgctggct
gggctgctca cgggtctggc attgccaca ttgccagggc tgtggaacca gagtgcggg
ggttactggc cctgcctcct cgtctacttg gctcccaact tctccttct ctcctgctt
gccaacctct tgetggtgca cggggagcgc tacatggcag tcctgaggcc actccagccc
cctgggagca ttcggctggc cctgctcttc acctgggctg gtcccttct ctttgccagt
ctgcccgctc tggggtggaa ccaactggacc cctggtgcca actgcagctc ccaggctatc
ttcccagccc cctacctgta cctcgaagtc tatgggctcc tgetgcccgc cgtgggtget
gctgccttcc tctctgtccg cgtgctggcc actgcccacc gccagctgca ggacatctgc
cggctggagc gggcagtggt ccgcgatgag cctccgccc tggcccgggc ccttacctgg
aggcaggcaa gggcacaggc tggagccatg ctgctcttcg ggctgtgctg ggggccctac
gtggccacac tgctcctctc agtcctggcc tatgagcagc gcccgccact ggggcctggg
acactgttgt cctcctcttc cctaggaagt gccagtgcag cggcagtgcc cgtagccatg
gggctgggag atcagcgcta cacagcccc tggagggcag ccgccaaaag gtgcctgcag
gggctgtggg gaagagcctc ccgggacagt cccggcccca gcattgccta ccaccaagc
agccaaagca gtgtcgacct ggacttgaac

```

Fig. 2

MTPNSTGEVP SPIPKGALGL SLALASLIIT ANLLLALGIA WDRRLRSPPA GCFFLSLLI
 GLLTGLALPT LPGLWNQSRG GYWSCLLVYL APNFSFLSLL ANLLLVHEGER YMAVLRPLQI
 PGSIRLALLL TWAGPLLFAF LPALGWNHWT PGANCSSQAI FPAPYLYLEV YGLLLPAVC
 AAFLSVRVLA TAHRQLQDIC RLERAVCRDE PSALARALTW RQARAQAGAM LLFGLCWGP
 VATLLLSVLA YEQRPLGPG TLLSLLSLGS ASAAAVPVAM GLGDQRYTAP WRAAAQRCL
 GLWGRASRDS PGPSIAYHPS SQSSVDLDLN

Fig. 3

ACCTGGGCCCCGCTTCTATAGAAGGTATTTTAGCCAAACTGGACCCGCGGCTATGAGCA
 GCGCCCGCCACTGGGGCCTGGGACACTGTTGTCCCTCCTCTCCCTAGGAAGTGCCAGTGC
 AGCGGCAGTGCCCGTAGCCATGGGGCTGGGCGATCAGCGCTACACAGCCCCCTGGAGGGC
 AGCCGCCCAAAGGTGCCTGCAGGGGCTGTGGGGAAGAGCCTCCCGGGACAGTCCCGGCCC
 CAGCATTGCCTACCACCCAAGCAGCCAAAGCAGTGTGACCTGGACTTGAATAAAGGAA
 GGGCCTCTGCTGACTCCTACCAGAGCATCCGTCCAGCTCAGCCATCCAGCCTGTCTCTAC
 TGGGCCCCACTTCTCTGGATCAGAGACCCTGCCTCTGTTTGACCCGCACTGACTGAATA
 AAGCTCCTCATAGGCCG

Fig. 4

GGCCTGGCCCCGCTGTCCCTACTGGGTGGAGACACCATGTACTTGGTCCACTTGTGCTCT
 TCAGCCAGGACACCAGACATGGTCCAAACCGCTGCAGGGCTGGCTGCAGCAACTCCCTGA
 CACTCAGGAAGGCCAGGCTGGGCAGGCAATACCTGCTCCCAACAGCCATGCATGCCGGC
 TGCCGCTCCAGGACTCCCTGTCCCCAGGACCAAGATGACGCCCAACAGCACTGGCGAGG
 TGCCAGCCCCATTCCTAAGGGGGCTTTGGGGCTCTCCCTGGCCCTGGCAAGCCTCATCA
 TCACCGCGAACCTGCTCCTAGCCCTGGGCATCGCCTGGGACCGCCGCCTGCGCAGCCCAC
 CTGCTGGCTGCTTCTTCCTGAGCCTACTGCTGGCTGGGCTGCTCACGGGTCTGGCATTCG
 CCACATTGCCAGGGCTGTGGAACCAAGAGTCGCCGGG

Fig. 5

TTTTTAACGGCCAGAGGAGCTTTATTCAGTCAGTGCAGGGGTCAAACAGAGGCAGGGTCTC
 TGATCCAGAGAAGTGGGGCCAGTAGAGACAGGCTGGATGGCTGAGCTGGACGGATGCTC
 TGGTAGGAGTCAGCAGAGGCCCTTCCTTTAGTTCAAGTCCAGGTCGACACTGCTTTGGCT
 GCTTGGGTGGTAGGCAATGCTGGGGCCGGGACTGTCCCGGGAGGCTCTTCCCCACAGCCC
 CTGCAGGCACCTTTGGGCGGCTGCCCTCCAGGGGGCTGTGTAGCGCTGATCGCCAGCCC
 CATGGCTACGGGCACTGCCGCTGCACTGGCACTTCCTAGGGAGAGGAGGGACAACAGTGT
 CCCAGGCCCCAGTGGCGTCATCTTGGTCCTGNGGACAGGGGAGTCCTGGAGCGGCAGCCG
 GCATGCATGGCTGT

Fig. 6

TATGAGAGTCTTTATCTGTTTCACCCCGGTGAGAGCATTTTGAATTTCTTTATTGACGTA
 CTTACTTCCCTGATTGGACATTTCTTGAGCTCATTTGTCTGAGACCGTGTGGTCCCCAG
 GACTGGGCCAGTCTCGCCAGGTGAGGAGCAGGGCCAGAAAGAGGAGCAGGGTGTTCATCA
 TGGCTCCAATTCTGGAGTCTTTGCACGCCTCGGTGAGCGGC

FIG. 7

BLAST - alineación de 413 contra el homólogo del receptor EDG-7
aagenesseq | Y06411 | Y06411 humano.

Este acierto se puntúa a: 2e-11 (valor de expectación)

Longitud de alineamiento (superposición): 268

Identities: 30%

Matriz de puntuación: BLOSUM62 (usado para inferir el patrón de
consenso)

Base de datos investigada: aagenesseq

```

Q:      16 GAL-
GLSLALASLIITANLLLALGIAWDRRLRSPPAGCFFLSLLLAGLLTGLALPTLPGL
      GAL GLS:A::L:::NLL:::I. ..R R.   C. :::L::LLTG.
L
H:      47 GALRGLSVAASCLVVLLENLLVLAAITSHMRSRRWVYYCL-VNITLSDLLTGA
LANVL

      WNQSRRGYWSCLLVYLAPNFSFLSLLAN---
LLL VHGERYMAVLRPLQPPGSIRLALL--
      : :R.   : .   :L.... F.:L.A:   LL.. GER:::RP:::G:

LSGARTFRLAPAQWFLREGLLFTALAASTFSLFTAGERFATMVRPVAESGATKTSRVYG

      ---
LTWAGPLLFPALGWNHWTFGANCSSQAIFPAPYLYLEVYGLLLPAVGAAAFSLV
      L.W. ..L...LP.LGWN .. .CSS :.P  LY : Y L.. .:
      FIGLCWLLAALLGMLPILGWNCLCAFDRCSS--LLP---LYSKRYILFCLVI
--

RVLATAHRQLQDICRLERAVCRDEPSALARALTWRQARAQAGAMLLFGLCWGPYVATLLL
      VLAT.   . I RL :A   :..P...AR. . R ... . :L.F
: CWGP....LL.
-
VLATIMGLYGAI FRLVQASGQKAPRPAARRKARRLLKTVLMILLAFLVCWGPLFGLLLA

SVLA---YEQRPPPLGPGTLLSLLSLGSA      271
.V... :.Q.   G . :L:L. L.SA
DVFGSNLWAQEQYLRGMDWILALAVINSA      301

```

FIG. 8

HMMPFAM - alineación de 413 contra el receptor de membrana
 pfam|hmm| 7tm_17 EDG-7. (familia de rodopsina)

Este acierto se puntúa a: 12,5 (valor de expectación)

Matriz de puntuación: BLOSUM62 (usado para inferir el patrón de
 consenso)

```

Q:      31 ANLLLLALGIWDRRLRsPPAGCFFLSILLAGLLTGLALPTLPGLWNQS--RRGYWS--
-C
      .NL::L I. ::LR .P...F.L:L:A.LL L.LP. . .: . . :.
C
H:      1
GNLLVilvilrtkkrlr.tptnifilNLAvADLLflltllppwalyyylvggsedWpfGsalC
      LLVYLAPNFSFLSLLANLLL VHGERYMAVLRPLQPPGSIR-----
LALLLTWAGPILLFA
      LV'... ::::: :: L...:RY:A::.PL: . . :::LL.W.
.LL.:
klvtaldvvnmyaSilllLtaISiDRYlAivhPlrytrrrtsprrrAkvvillvWvlallls
      SLPALGWNEWTPGAN-----CSSQAIFPA-----
PYLYLEVYGLLLPaVG
      P.L T .. C . .: .L. ...G.LLP
:
lPpllfswvktveegngtlnvnvtvClidfpeestasvstwlrsyvlstlvGFllP.ll
AAAFLSVRVLATAHrqlqdicrleravcrdepsalaraltwRQARAQAGAMLLFGLCWGP
      .....R:L.T.. :.A:. . .:::F LCW
P
vilvcYtrIlrtlr.....kaaktllvvvvvFvLCWlP
      YVATLLLSVLA 250
      Y...LLL..L.
      yfivllldtlc 222

```

FIG. 9

Análisis de Genewise de la salida nº 413 de geenwise

Puntuación 811,05 bits sobre la alineación total

Las puntuaciones como bits sobre un modelo de codificación sincrónica

```

413          1
MTPNSTGEVPSPIPKGALGLSLALASLIITANLLLALGIAWDRRLRSP
MTPNSTGEVPSPIPKGALGLSLALASLIITANLLLALGIAWDRRLRSP
MTPNSTGEVPSPIPKGALGLSLALASLIITANLLLALGIAWDRRLRSP
AC055884      -91463
aacaaagggcacacaggtgctcgcgacaaagacccgcgagtgccccacc

tccagcgatcgctcagctgtctctcgtttccatttctgtcgaggtggcc

ggccctcgccctcggtggccgcgaccccgcgacgcccgcgccat

413          50
AGCFFLSLLLAGLLTGLALPTLPGLWNQSRGYWSCLLVYLAPNFSFLS
AGCFFLSLLLAGLLTGLALPTLPGLWNQSRGYWSCLLVYLAPNFSFLS
AGCFFLSLLLAGLLTGLALPTLPGLWNQSRGYWSCLLVYLAPNFSFLS
AC055884      -91316
ggtttcacccggccagcgtcatcgctacaccgttttcggtgcatttct

cggtttgtttcggtcgtctcctcgtaaggggagcgtttatccatcttc

tccccgcaggtggcgtgagcagagggcgctcgccccccgccccccc

413          99
LLANLLLVEGERYMAVLRPLQPPGSIRLALLLTWAGPLLFAFLPALGWN
LLANLLLVEGERYMAVLRPLQPPGSIRLALLLTWAGPLLFAFLPALGWN
LLANLLLVEGERYMAVLRPLQPPGSIRLALLLTWAGPLLFAFLPALGWN
AC055884      -91169
ccgactcgcggttaggcaccccgaaaccgcccattggccctgaccgcgta

ttcatttttagagatcttgctaccggtgtctttcgcgctttcgctcctgga

gtcccgggcgccgacggacgctgctggcgcccgctcgctctgctgggc

```

FIG. 9 continuación

413 148
HWTPGANCSSQAIFFAPYLYLEVYGLLLPAVGAAFLSVRVLATAHRQL

HWTPGANCSSQAIFFAPYLYLEVYGLLLPAVGAAFLSVRVLATAHRQL

HWTPGANCSSQAIFFAPYLYLEVYGLLLPAVGAAFLSVRVLATAHRQL

AC055884 -91022
ctacggatatcgatcgctctcggtgccccggggggtctgcgcgagcccc

agccgcaggcacttcccatatatagtttctgccccttctgttcccagat

cgcttcccccggtccaccgcccactgcggcggtttccctccggtccccg

413 197
QDICRLERAVCRDEPSALARALTWRQARAQAGAMLLFGLCWGPYVATLL

QDICRLERAVCRDEPSALARALTWRQARAQAGAMLLFGLCWGPYVATLL

QDICRLERAVCRDEPSALARALTWRQARAQAGAMLLFGLCWGPYVATLL

AC055884 -90875
cgatccgcgggtcggctgcgcgcatacgagcgggacctgttgcgtggacc

aatggtagctggaaccctcgctcggaagcacgcttttgtgggcatcctt

gccccgggagcctgcccgcgctcgggagagtagcgccggcgccgcagc

413 246
LSVLAYEQRPPLGPGTLLSLLSLGSASAAVPVAMGLGDQRYTAPWRAA

LSVLAYEQRPPLGPGTLLSLLSLGSASAAVPVAMGLGDQRYTAPWRAA

LSVLAYEQRPPLGPGTLLSLLSLGSASAAVPVAMGLGDQRYTAPWRAA

AC055884 -90728
ctgcgtgccccgcgacttccctcgagagggcgagcgccctagctagg

tcttcaaagcctgcgcttcttctggcgccctctctgtgaagaccggcc

FIG. 9 continuación

cacgctggcgaggtgaggccccaatctagagcacgggctgccaccggac

```

413          295 AQRCLQGLWGRASRDSPGPSIAYHPSSQSSVDLDLN
                AQRCLQGLWGRASRDSPGPSIAYHPSSQSSVDLDLN
                AQRCLQGLWGRASRDSPGPSIAYHPSSQSSVDLDLN
AC055884      -90581 gcatccgctgagtcgacgcaagtccaacaaggcgta
                caggtagtggggccgagcgcgtaacggaggtatata
                cagcgggggaaccgctccccctcccaccactccgcgc
    
```

//

Gen 1

Gen 91463 90474

Exón 91463 90474

```

>AC055884.[91463:90472].sp.tr
MTPNSTGEVPSPIPKGALGLSLALASLIITANLLLALGLAWDRRLRSPAGCFFLSLLLA
GLLTGLALPTLPGLWNQSRRGYWSCLLVYLAPNFSFLSLLANLLLVHGERYMAVLRPLQP
PGSIRLALLLTWAGPLLFAFLPALGWNHWTPGANCSSQAI FPAPYLYLEVYGLLLPAVGA
AAFLSVRVLATAHRQLQDICRLERAVCRDEPSALARALTWRQARAQAGAMLLFGLCWGPY
VATLLLSVLAYEQRPPLGPGTLLSLLSLGSASAAVPVAMGLGDQRYTAPWRAAAQRCLQ
GLWGRASRDSPGPSIAYHPSSQSSVDLDLN
    
```

//

FIG. 9 continuación

>AC055884. [91463:90472]. sp

ATGACGCCCAACAGCACTGGCGAGGTGCCAGCCCCATTCCCAAGGGGGCTTTGGGGCTC
TCCCTGGCCCTGGCAAGCCTCATCATCACCGCGAACCTGCTCCTAGCCCTGGGCATCGCC
TGGGACCGCCGCCTGCGCAGCCCACCTGCTGGCTGCTTCTTCCTGAGCCTACTGCTGGCT
GGGCTGCTCACGGGTCTGGCATTGCCACATTGCCAGGGCTGTGGAACCAGAGTCGCCGG
GGTTACTGGTCCTGCCTCCTCGTCTACTTGGCTCCCAACTTCTCCTTCCTCTCCCTGCTT
GCCAACCTCTTGCTGGTGCACGGGGAGCGCTACATGGCAGTCCTGAGGCCACTCCAGCCC
CCTGGGAGCATTTCGGCTGGCCCTGCTCCTCACCTGGGCTGGTCCCCTGCTCTTTGCCAGT
CTGCCCCGCTCTGGGGTGAACCACTGGACCCCTGGTGCCAAGTGCAGCTCCAGGCTATC
TTCCAGCCCCCTACCTGTACCTCGAAGTCTATGGGCTCCTGCTGCCCGCCGTGGGTGCT
GCTGCCTTCCTCTCTGTCCGCGTGCTGGCCACTGCCACCGCCAGCTGCAGGACATCTGC
CGGCTGGAGCGGGCAGTGTGCCGCGATGAGCCCTCCGCCCTGGCCCGGGCCCTTACCTGG
AGGCAGGCAAGGGCACAGGCTGGAGCCATGCTGCTCTTCGGGCTGTGCTGGGGGCCCTAC
GTGGCCCACTGCTCCTCTCAGTCCTGGCCTATGAGCAGCGCCCGCCACTGGGGCCTGGG
ACACTGTTGTCCCTCCTCTCCCTAGGAAGTGCCAGTGCAGCGGCAGTGGCCGTAGCCATG
GGGCTGGGCGATCAGCGCTACACAGCCCCCTGGAGGGCAGCCGCCCAAAGGTGCCTGCAG
GGGCTGTGGGGAAGAGCCTCCCGGGACAGTCCCGGCCCCAGCATTGCCTACCACCCAAGC
AGCCAAAGCAGTGTGACCTGGACTTGAAC

//

AC055884	GeneWise	match	90472	91463	811.05	-
----------	----------	-------	-------	-------	--------	---

413

AC055884	GeneWise	cds	91462	904720.00	-
----------	----------	-----	-------	-----------	---

0

BLASTN - alineación de 413_ ADN contra GENBANK|AC055884|

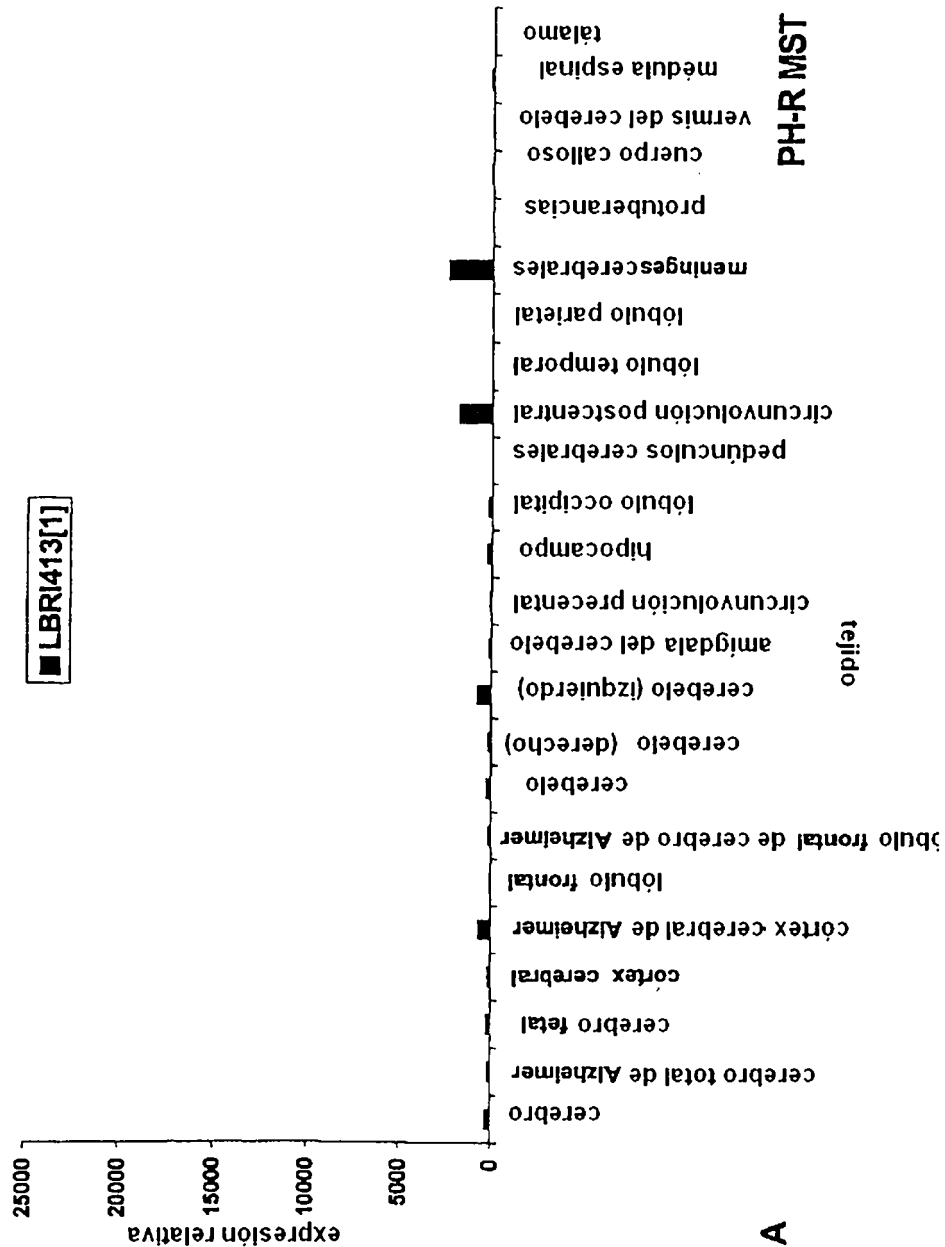
Fig. 10

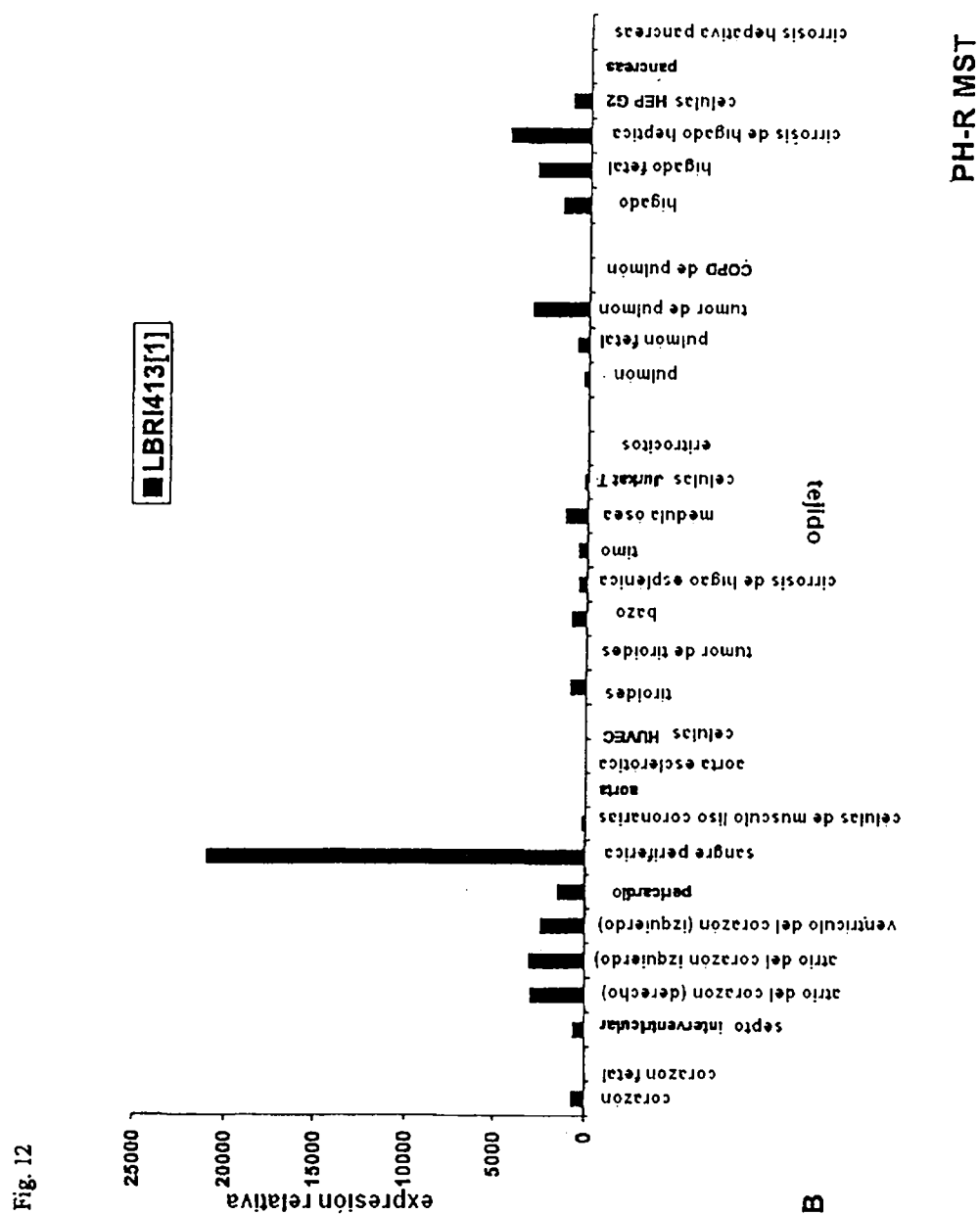
MTPNSTGEVP SPIPKGALGL SLALASLIIT ANLLLALGIA WDRRLRSPPA GCFFLSLLLA
GLLTGLALPT LPGLWNQSRR GYWSCLLVYL APNFSFLSLL ANLLLVHGER YMAVLRPLQP.

PGSIRLALLL TWAGPLL FAS LPALGWNHWT PGANCSSQAI FPAPYLYLEV YGLLLPAVGA
AAFLSVRVLA TAHRQLQDLC RLERAVCRDE PSALARALTW RQARAQAGAM LLFGLCWGPY
VATLLLSVLA YEQRPPLGPG TLLSLLSLGS ASAAAVPVAM GLGDQRYTAP WRAAAQRCLQ

GLWGRASRDS PGPSIAYHPS SQSSVDLDLN

Fig. 11





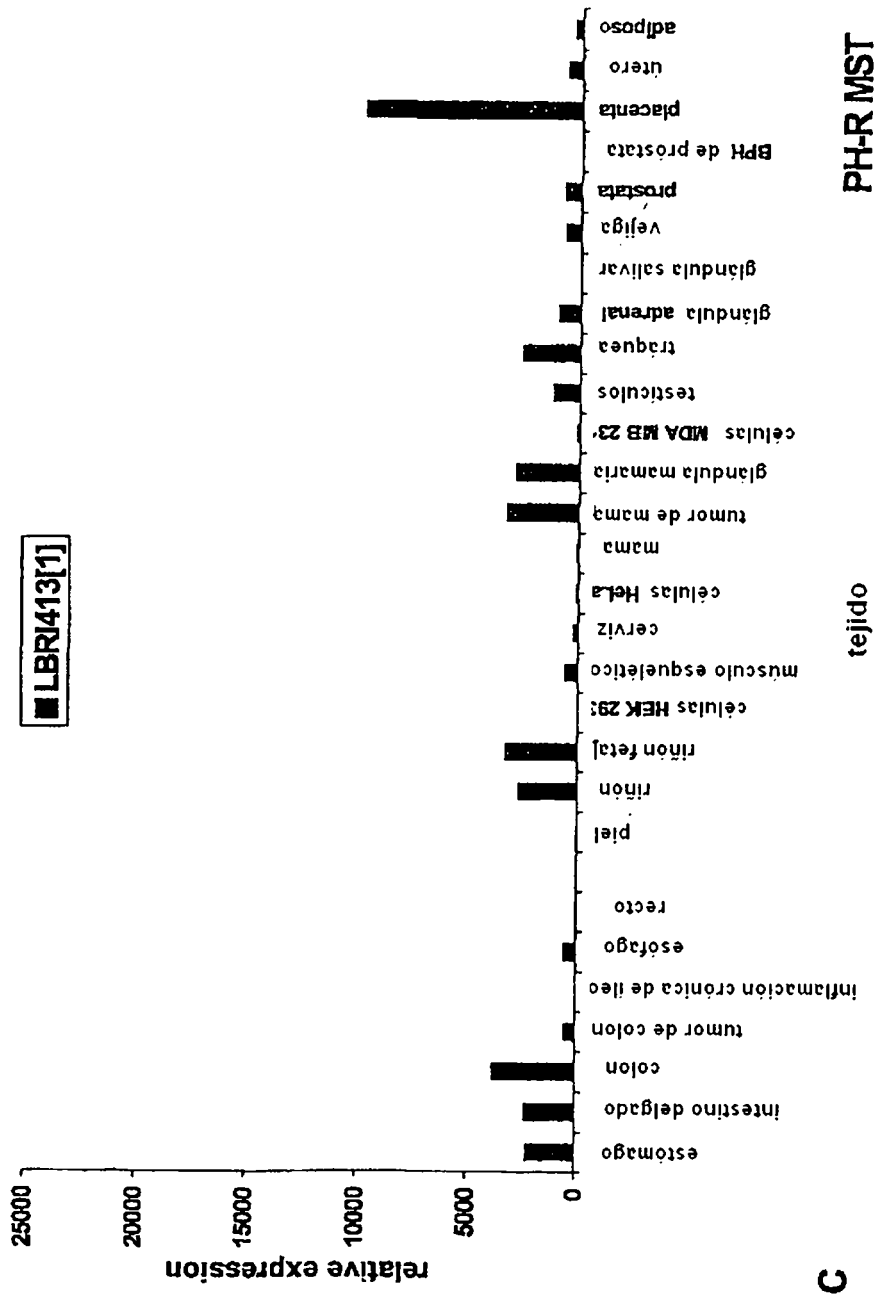


Fig. 13

ES 2 305 229 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bayer AG

5 <120> REGULACIÓN DEL RECEPTOR ACOPLADO A LA PROTEÍNA G HUMANA

<130> Lio 302

<150> USSN 60/269,410

<151> 2001-02-20

10 <150> USSN 60/323,809

<151> 2001-09-21

<160> 6

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25	atgacgcccc acagcaactgg cgagggtgccc agccccattc ccaagggggc tttggggctc	60
	tccctgggcc tggcaagcct catcatcacc gcgaacctgc tcctagccct gggcatcgcc	120
	tgggaccgccc gcctgcgcag cccacctgct ggctgcttct tcctgagcct actgctggct	180
30	gggctgctca cgggtctggc attgccaca ttgccagggc tgtggaacca gagtgcgccg	240
	ggttactggt cctgcctcct cgtctacttg gctcccaact tctccttctt ctccctgctt	300
35	gccaacctct tgetggtgca cggggagcgc tacatggcag tcctgaggcc actccagccc	360
	cctgggagca ttcggctggc cctgctcttc acctgggctg gtccccctgt ctttgccagt	420
40	ctgcccgtct tgggggtggaa ccactggacc cctggtgcca actgcagctc ccaggctatc	480
	ttcccagccc cctacctgta cctcgaagtc tatgggctcc tgctgcccgc cgtgggtgct	540
45	gctgccttcc tctctgtccg cgtgctggcc actgcccacc gccagctgca ggacatctgc	600
	cggctggagc gggcagtggt ccgcgatgag ccctccgccc tggcccgggc ccttacctgg	660
	aggcaggcaa gggcacaggc tggagccatg ctgctcttcg ggctgtgctg ggggccctac	720
50	gtggccacac tgctcctctc agtcctggcc tatgagcagc gcccgccact ggggcctggg	780
	acactgttgt ccctcctctc cctaggaagt gccagtgcag cggcagtgcc cgtagccatg	840
55	gggctgggcg atcagcgcta cacagccccc tggaggggcag ccgcccagag gtgcctgcag	900
	gggctgtggg gaagagcctc ccgggacagt cccggcccca gcattgccta ccaccaagc	960
	agccaaagca gtgtcgacct ggacttgaac	990

60

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 305 229 T3

<400> 2

5	Met	Thr	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Glu	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Pro	Lys	Gly	
	1				5					10					15		
10	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile	Ile	Thr	Ala	Asn	
				20					25					30			
15	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Ile	Ala	Trp	Asp	Arg	Arg	Leu	Arg	Ser	Pro	
			35					40					45				
20	Pro	Ala	Gly	Cys	Phe	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Thr	
		50					55					60					
25	Gly	Leu	Ala	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Trp	Asn	Gln	Ser	Arg	Arg	
	65					70					75					80	
30	Gly	Tyr	Trp	Ser	Cys	Leu	Leu	Val	Tyr	Leu	Ala	Pro	Asn	Phe	Ser	Phe	
					85					90					95		
35																	
40																	
45																	
50																	
55																	
60																	
65																	

ES 2 305 229 T3

	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	Leu	Val	His	Gly	Glu	Arg	Tyr	Met
				100					105					110		
5	Ala	Val	Leu	Arg	Pro	Leu	Gln	Pro	Pro	Gly	Ser	Ile	Arg	Leu	Ala	Leu
			115					120					125			
10	Leu	Leu	Thr	Trp	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Leu	Pro	Ala	Leu
		130					135						140			
15	Gly	Trp	Asn	His	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	Asn	Cys	Ser	Ser	Gln	Ala	Ile
	145					150					155					160
20	Phe	Pro	Ala	Pro	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro
					165					170						175
25	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	Ala
				180					185					190		
30	His	Arg	Gln	Leu	Gln	Asp	Ile	Cys	Arg	Leu	Glu	Arg	Ala	Val	Cys	Arg
			195					200					205			
35	Asp	Glu	Pro	Ser	Ala	Leu	Ala	Arg	Ala	Leu	Thr	Trp	Arg	Gln	Ala	Arg
	210						215					220				
40	Ala	Gln	Ala	Gly	Ala	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Leu	Cys	Trp	Gly	Pro	Tyr
	225					230					235					240
45	Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Tyr	Glu	Gln	Arg	Pro	Pro
				245						250					255	
50	Leu	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Ala	Ser
				260					265					270		
55	Ala	Ala	Ala	Val	Pro	Val	Ala	Met	Gly	Leu	Gly	Asp	Gln	Arg	Tyr	Thr
			275					280					285			
60	Ala	Pro	Trp	Arg	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Cys	Leu	Gln	Gly	Leu	Trp	Gly
		290					295					300				
65	Arg	Ala	Ser	Arg	Asp	Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Ile	Ala	Tyr	His	Pro	Ser
	305					310					315					320
	Ser	Gln	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Asp	Leu	Asn						
					325					330						

ES 2 305 229 T3

<210> 3
 <211> 437
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 10 **acctggggccc cgcttctata gaaggtatatt tagccaaaac tggacccgcg gctatgagca 60**
 gcgcccgcga ctggggcctg ggacactggt gtccctcctc tccctaggaa gtgccagtgc 120
 15 **agcggcagtg cccgtagcca tggggctggg cgatcagcgc tacacagccc cctggagggc 180**
 agccgcccga aggtgcctgc aggggctgtg gggaagagcc tcccgggaca gtcccggccc 240
 cagcattgcc taccacccaa gcagccaaag cagtgtcgac ctggacttga actaaaggaa 300
 20 **gggcctctgc tgactcctac cagagcatcc gtccagctca gccatccagc ctgtctctac 360**
 tgggccccac ttctctggat cagagaccct gcctctgttt gaccccgcac tgactgaata 420
 25 **aagctcctca taggcgcg 437**

<210> 4
 30 <211> 456
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 4
 ggcctggccc cgetgtccct actgggtgga gacaccatgt acttgggtcca cttgtgctct 60
 40 **tcagccagga caccagacat ggtccaaacc gctgcagggc tggetgcagc aactccctga 120**
 cactcaggaa ggcccaggct gggcaggcaa tacctgtctc caacagccat gcatgccggc 180
 tgccgctcca ggactccctc gtccccagga ccaagatgac gcccacagc actggcgagg 240
 45 **tgcccagccc cattcccaag ggggcttttg ggtctctcct ggccctggca agcctcatca 300**
 tcaccgcgaa cctgtctcta gccctgggca tcgctggga ccgcccctg cgcagccac 360
 50 **ctgtctggctg cttcttctctg agcctactgc tggetgggct gctcacgggt ctggcattgc 420**
 ccacattgcc agggctgttg aaccagagtc gccggg 456

55 <210> 5
 <211> 434
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc característica
 <222> (391)..(392)
 65 <223> n=a, t, g o c

ES 2 305 229 T3

<400> 5

5	ttttaacgg ccagaggagc ttatttcagt cagtgcgggg tcaaacagag gcagggtctc	60
	tgatccagag aagtggggcc cagtagagac aggetggatg gctgagetgg acggatgctc	120
	tggtaggagt cagcagaggc ccttccttta gttcaagtcc aggtcgacac tgctttggct	180
10	gcttgggtgg taggcaatgc tggggcggg actgtcccgg gaggtctctc cccacagccc	240
	ctgcaggcac ctttggggcg ctgccctcca gggggctgtg tagcgctgat cggccagccc	300
15	catggctacg ggcactgccg ctgcactggc acttcctagg gagaggaggg acaacagtgt	360
	cccaggcccc agtggcgta tcttggctct gnggacaggg ggtcctgga gcggcagccg	420
	gcatgcatgg ctgt	434

20

<210> 6

<211> 221

<212> ADN

25

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

30

	tatgagagtc ttatctgtt tcaccccggt gagagcattt tgaatttcct tattgacgta	60
	ettacttccc tgattggaca ttctctggag ctcatgtct gagaccgtgt ggtccccag	120
35	gactgggcca gtctcgccag gtgaggagca gggccagaaa gaggagcagg gtgttcatca	180
	tggtctcaat tctggagtct ttgcacgcct cggtcagcgg c	221

40

45

50

55

60

65