



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 709**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 16/18 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)	A61P 9/10 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)	A61P 3/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04818967 .4**

96 Fecha de presentación : **19.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1693456**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Procedimiento de identificación de moduladores de un receptor acoplado a la proteína G.**

30 Prioridad: **19.11.2003 JP 2003-389624**
26.04.2004 JP 2004-130371
19.10.2004 JP 2004-304780

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.05.2011

73 Titular/es: **DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED**
3-5-1, Nihonbashi Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP
KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE
FOUNDATION

72 Inventor/es: **Ohara, Osamu;**
Nagase, Takahiro;
Ohishi, Michio;
Okajima, Daisuke y
Yokota, Hiroshi

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 709 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de moduladores de un receptor acoplado a la proteína G

5 **Campo técnico**

La presente invención utiliza un gen que codifica un receptor acoplado a la proteína G y el producto génico del mismo. Más específicamente, la presente invención utiliza un gen que codifica un receptor acoplado a la proteína G para el que la forma sulfatada del octapéptido de colecistoquinina (a la que, en adelante, se hace referencia como "CCK-8S") actúa como un ligando, y el producto génico del mismo. Todavía más específicamente, la presente invención utiliza un ADN que codifica una proteína con la función de receptor acoplado a la proteína G o la cadena complementaria de la misma, un ADN que comprende una secuencia parcial de bases del ADN, un vector recombinante que contiene el ADN anterior o la cadena complementaria del mismo, y un transformante con el vector recombinante allí introducido. La invención utiliza asimismo una proteína con la función de receptor acoplado a la proteína G, y un anticuerpo frente a la proteína. La invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto que inhibe o estimula una función de la proteína. La invención se refiere además a un procedimiento para identificar un agonista de la proteína anterior. Una enfermedad atribuible a un descenso en el nivel de CCK-8S y/o un descenso en su función puede ser por ejemplo la demencia (que comprende la enfermedad de Alzheimer), los trastornos de ansiedad, la obesidad y la diabetes. Una enfermedad relacionada con la angiogénesis puede ser, por ejemplo, el infarto cerebral, la contusión cerebral o la enfermedad tumoral.

Antecedentes de la técnica

El documento JP 2003/284573 da a conocer secuencias de aminoácidos similares a la secuencia de aminoácidos definida en la secuencia SEC ID nº 2 de la presente invención.

El documento JP 11/032766 y Shiratsuchi T. et al. (1997) -*Cytogen3et Cell Genet.*, vol. 79, págs. 103-108- describen la clonación del gen receptor BAI2 y de variantes de corte y empalme del mismo.

El documento EP 1 270 724 A2 da a conocer procedimientos para identificar ligandos, agonistas y antagonistas para el BAI2 humano. El documento EP 1 270 724 A2 se refiere asimismo a la entrada de una base de datos con el número de registro ADC86417 que describe una proteína BAI2 del GPCR humana codificante de nucleótidos (SEC ID nº 870) similar a la secuencia SEC ID nº 1 de la presente invención.

Kee Hae Jin et. al. (2002) -*Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 22, nº 9, págs. 1054-1067- dan a conocer la secuencia de aminoácidos del receptor BAI2 humano y múrido y las isoformas de corte y empalme del mismo.

La entrada de la base de datos con el número de registro ABP81929 da a conocer una secuencia de aminoácidos de BAI2 y las secuencias de nucleótidos codificantes.

El receptor acoplado a la proteína G (al que, en adelante, se hace referencia como "GPCR") es un receptor de luz, olor y sabor, y, al mismo tiempo, es receptor de neurotransmisor y hormona y actúa como importante sensor de células en los organismos vivos, desde las levaduras hasta los seres humanos.

El GPCR es una glicoproteína que está presente en la membrana celular, que es un tipo de receptor de transmembrana de siete dominios con la característica estructural que consiste en presentar siete dominios de membrana celular, constituyendo una superfamilia con muchos miembros. Ya se han identificado mil genes GPCR o más y se están efectuando estudios relativos a la estructura tridimensional de GPCR, los estimuladores extracelulares (a los que en adelante se hace referencia como "ligando", refiriéndose este término a una sustancia con la capacidad de unirse a un receptor) de GPCR, los sistemas intracelulares de transducción de señales mediante GPCR, y las funciones del mismo y similares.

Cuando un GPCR recibe un estímulo de un ligando, se une a una proteína G presente dentro de la célula. La proteína G es una proteína que se acopla al GPCR y que presenta una función como factor de transducción de señales en la célula. La proteína G se clasifica ampliamente en varios tipos de familias según las funciones relacionadas con diversos factores (en adelante, denominadas "efectoras") implicados en la transducción de señales en los sistemas intracelulares de transducción de señales y la diferencia de los genes que codifican la proteína. Las proteínas G pertenecientes a cada familia son trímeros que comprenden tres subunidades denominadas α , β y γ , y la guanosina 5'-difosfato (GDP) suele estar unida específicamente a la subunidad α . La proteína G unida a la GDP es una forma inactiva que no muestra acción alguna con respecto al efector. Cuando el GPCR es estimulado por un ligando, tiene lugar una reacción de intercambio entre la GDP unida a la proteína G y la guanosina 5'-trifosfato (GTP) presente en la célula, mediante la cual se libera la GDP de la proteína G y, a continuación, la proteína G se une a la GTP para formar una proteína G unida a GTP. Se hace referencia a la proteína G unida a GTP como forma activa, y rápidamente se disocia en una subunidad α unida a GTP (α GTP) y un dímero ($\beta\gamma$) que comprende las subunidades β - y γ . α GTP y $\beta\gamma$ actúan directamente en un efector (por ejemplo, un canal iónico de calcio o un canal iónico de

potasio) para activar el sistema intracelular de transducción de señales, induciendo, como resultado, diversas respuestas fisiológicas.

5 Entre la superfamilia de GPCR, el inhibidor 2 de la angiogénesis de cerebro humano (en adelante, abreviado con las siglas hBAI2) se clasifica en la clase B (de tipo secretina) y su gen está registrado en el sistema GenBank con el número de registro AB 005298.

10 Aunque existe un informe (bibliografía 1 no relacionada con patentes) que se refiere a la información de las secuencias y la distribución de la expresión de hBAI2, no se han descrito ni la función de hBAI2 ni su participación en enfermedades. Sin embargo, según una comparación estructural con BAI1, homólogo de BAI2, se considera que el dominio de trombospondina de tipo I (en adelante, denominado "dominio TSP-I") está presente en el dominio extracelular (bibliografía 2 no relacionada con patentes). El dominio TSP-I es un dominio característico reconocido en una región que comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 385 hasta la posición 522 en la trombospondina, y es conocido que participa en la matriz extracelular de la trombospondina y como importante dominio funcional en la capacidad de inhibición de la angiogénesis.

15 Con respecto al hBAI1, se ha documentado que su expresión se encuentra especialmente elevada en el cerebro humano, que un dominio con habilidad inhibidora de la angiogénesis está presente en la región extracelular y que existe la posibilidad de que su expresión esté sujeta al control por parte de p53 y similares, lo que sugiere la posibilidad de que este gen participe de alguna manera en algún mecanismo relacionado con la angiogénesis en el cerebro (bibliografías 1 a 4 no relacionadas con patentes).

20 Con respecto al gen de ratón BAI2, relacionado con hBAI2, se ha documentado que se observa una correlación negativa en la cantidad de expresión entre BAI2 y el factor vascular de crecimiento endotelial en el tejido cerebral de un modelo de rata con isquemia cerebral, y se considera que, de forma similar a hBAI1, el BAI2 de ratón podría participar en la angiogénesis. Además, también se ha documentado la existencia de una variante de corte y empalme del mismo (especie de ARN producida por el corte y empalme del ARNm) (bibliografía 3 no relacionada con patentes).

25 Aunque a partir de la información de la secuencia se puede predecir que tanto hBAI1 como hBAI2 pertenecen a la familia del GPCR, no se ha encontrado ningún documento que mencione su funcionamiento como GPCR, ni información relativa a ligandos.

30 Es conocido que la colecistoquinina (en adelante, abreviada con las siglas "CCK") es una hormona gastrointestinal que libera la célula endocrina en la membrana mucosa duodenal. La CCK se secreta con la ingesta de grasas, y favorece la contracción de la vesícula biliar y la secreción de la enzima pancreática. Presenta actividad en los órganos digestivos, como la contracción de la vesícula biliar, la estimulación de la secreción de enzima pancreática y el estímulo del movimiento intestinal. La CCK también se considera una sustancia de señalización que transmite la sensación de saciedad a las neuronas cerebrales.

35 La CCK es un polipéptido de cadena lineal compuesto de 33 residuos de aminoácidos (en adelante, abreviado con las siglas "CCK-33"), y es conocido que el séptimo residuo de tirosina del extremo C se encuentra sulfatado. Mediante el procesamiento postraduccional de CCK, se producen fragmentos de diversas longitudes con distintos sitios de escisión en el extremo N, como CCK-4, CCK-8, CCK-12, CCK-33 y CCK-58. Se ha constatado que la actividad fisiológica y la cantidad de cada uno de estos fragmentos es distinta. Además, se ha documentado que la ceruleína que se extrae de la piel de la rana es un compuesto con una estructura química parecida a la de la CCK y que presenta la misma actividad biológica.

40 La CCK se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro. Por ejemplo, se ha observado en grandes cantidades en el córtex frontal, el hipocampo, el cuerpo amigdaloides, y el hipotálamo, y también se ha documentado su acción en los nervios centrales, como la participación en la analgesia, la sedación, el control de la ingesta de comida, la memoria y el aprendizaje. La CCK se encuentra parcialmente colocalizada con la DA (dopamina) y el GABA (ácido γ -aminobutírico), y también se ha documentado su interacción con 5HT (serotonina; 5-hidroxitriptamina) del sistema nervioso y similares. También se ha documentado que la liberación de CCK es regulada por GABA. Los fragmentos CCK-8 y CCK-4 se han documentado principalmente como CCK que presenta actividad biológica que está presente en el cerebro. El CCK-8 que se encuentra en el cerebro es un tipo sulfatado (CCK-8S) en el que el séptimo residuo de tirosina del extremo C se encuentra sulfatado.

45 Recientemente, se ha documentado que la CCK es fundamental para la retención memorística. Por ejemplo, se ha clarificado que la ausencia de CCK-8S dificulta el uso de la memoria al nivel consciente y su traducción en acciones, y que el CCK-4 (un tetrapéptido del extremo C de CCK-33) obstruye la recuperación mnemotécnica.

50 Se ha documentado que los receptores CCK-A y CCK-B son receptores CCK. Ambos son receptores acoplados a la proteína G. La expresión del receptor CCK-A se ha detectado en tejidos y células que se originan en el tubo digestivo, y en leucocitos de la sangre y similares. El receptor CCK-A participa en la regulación alimentaria del sistema intracelular de transducción de señales mediante, por ejemplo, la promoción de efectores como la

65

fosfolipasa C y la adenil ciclasa. La expresión del receptor CCK-B se ha detectado en tejidos y células que se originan en el cerebro y el tubo digestivo, y en leucocitos de la sangre y similares. El receptor CCK-B también se conoce como el "receptor gastrina", y participa en la regulación alimentaria y la proliferación celular en el sistema intracelular de transducción de señales mediante, por ejemplo, la promoción de efectores como la fosfolipasa C y el influjo intracelular de iones de calcio. En los últimos años se ha centrado la atención en la relación entre el receptor CCK-B y la ansiedad.

Bibliografía 1 no relacionada con patentes: Shiratsuchi, T. et al., *Cytogenetics and cell genetics*, 1997, vol. 79, págs. 103-108.

Bibliografía 2 no relacionada con patentes: Nishimori, H. et al., *Oncogene*, 1997, vol. 15, págs. 2145-2150.

Bibliografía 3 no relacionada con patentes: Kee, H. J. et al., *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2002, vol. 22, págs. 1054-1067.

Bibliografía 4 no relacionada con patentes: Kaur, B. et al., *American Journal of Pathology*, 2003, vol. 162, págs. 19-27.

Exposición de la invención

[Problemas que debe resolver la invención]

El GPCR es un importante sensor de células *in vivo* y una de las principales moléculas diana de los remedios que se están desarrollando para diversas enfermedades. Aunque ya se han encontrado un gran número de GPCR, la identificación de un GPCR nuevo puede considerarse una importante aportación al campo del desarrollo farmacéutico.

Otro de los objetivos de la presente invención consiste en encontrar y proporcionar un ligando de una proteína con una función equivalente a la de GPCR. Se describe un procedimiento para producir la proteína, un vector recombinante que contenga el gen y un transformante en el que se introduce el vector recombinante. También se describe un anticuerpo frente a la proteína. Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un medio para identificar un compuesto que inhiba o estimule la función de la proteína.

[Medios para resolver los problemas]

Se llevó a cabo un estudio exhaustivo y continuado, y se descubrió una proteína, considerada un GPCR, que se origina en un receptor de proteína de membrana funcional con un dominio de transmembrana de siete dominios y un gen que codifica la proteína, y se logró obtener el producto génico del mismo usando el gen. Se aclaró que la proteína se expresaba en la membrana celular de células de animales que expresaban el gen, y se producía una respuesta fisiológica mediante la estimulación de ligandos a través de la transducción intracelular de señales. También se aclaró que la proteína interactuó con una proteína que participa en la transducción intracelular de señales en la región del extremo C de la misma, y que tenía tres dominios TSP-I conocidos por estar relacionados con una función de inhibición de la angiogénesis en su secuencia de aminoácidos. Además, se descubrió que CCK-8S actuaba como ligando del receptor de proteína de membrana funcional.

De esta forma, la presente invención utiliza un ADN seleccionado de entre el grupo siguiente:

(i) un ADN constituido por una secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 del listado de secuencias o una cadena complementaria de la misma;

(ii) un ADN que contiene el ADN de (i) o una cadena complementaria del mismo;

(iii) un ADN con una homología de por lo menos 70% con la secuencia de bases del ADN de (i) o (ii) y que codifica una proteína con una función equivalente a un receptor acoplado a la proteína G, o una cadena complementaria de la misma;

(iv) un ADN que comprende una secuencia de bases con una variación que incluye una delección, una sustitución y una adición de entre uno y varios nucleótidos en la secuencia de bases del ADN según una cualquiera de (i) a (ii) y que codifica una proteína con una función equivalente a un receptor acoplado a la proteína G, o una cadena complementaria de la misma; y

(v) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con el ADN según cualquiera de (i) a (iv) y que codifica una proteína con una función equivalente a un receptor acoplado a la proteína G, o una cadena complementaria de la misma.

La presente invención utiliza además un ADN compuesto de una secuencia parcial de bases del ADN mencionado anteriormente.

La presente invención utiliza además el ADN mencionado anteriormente, en la que la función equivalente al receptor

acoplado a la proteína G es una función que activa una proteína G mediante la unión con un ligando.

La presente invención utiliza además el ADN mencionado anteriormente, en la que el ligando es un péptido seleccionado del siguiente grupo:

- 5 (i) forma sulfatada del octapéptido de colecistoquinina (SEC ID nº 14, en adelante abreviado con las siglas «CCK-8S»); y
- 10 (ii) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de un aminoácido homólogo en la secuencia de aminoácidos de CCK-8S a excepción de un residuo sulfatado de tirosina en la séptima posición del extremo C del péptido, y una función que induce un aumento de una concentración intracelular de calcio o un cambio en un potencial de membrana celular en una célula que expresa el ADN utilizable en la presente invención.

15 La presente invención también utiliza un vector recombinante que contiene el ADN mencionado anteriormente.

La presente invención utiliza además el vector recombinante mencionado anteriormente, en la que el vector recombinante es un vector de expresión recombinante.

20 La presente invención utiliza además un transformante que se introdujo con el vector recombinante mencionado anteriormente.

La presente invención utiliza además un transformante derivado de una célula animal que se introdujo con el vector recombinante mencionado anteriormente.

25 La presente invención utiliza además una línea celular con número de depósito FERM BP-10101.

La presente invención utiliza además proteínas codificadas por el ADN mencionado anteriormente.

30 La presente invención utiliza además una proteína seleccionada de entre el grupo siguiente:

- (i) una proteína compuesta de una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 del listado de secuencias;
- 35 (ii) una proteína que contiene la proteína de (i);
- (iii) una proteína con una homología de por lo menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o (ii) y con una función equivalente a un receptor acoplado a la proteína G; y
- 40 (iv) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una variación que incluye una delección, una sustitución y una adición de entre uno y varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína según una cualquiera de (i) a (iii), y con una función equivalente al receptor acoplado a la proteína G.

45 La presente invención utiliza además una proteína compuesta de una secuencia parcial de una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 del listado de secuencias.

La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, que presenta una función equivalente a un receptor acoplado a la proteína G.

50 La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, que presenta una función de inhibición de la angiogénesis.

La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, que presenta una función que interactúa con una proteína con actividad guanilato-quinasa y/o una proteína con una función de adhesión intercelular.

55 La presente invención utiliza además una proteína seleccionada de entre el grupo siguiente, que es una proteína con una función equivalente a un receptor acoplado a la proteína G, una función que interactúa con una proteína con una función de adhesión intercelular y/o una proteína con actividad guanilato-quinasa, y una función de inhibición de la angiogénesis:

- (i) una proteína compuesta de una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 del listado de secuencias;
- 65 (ii) una proteína que contiene la proteína de (i);

(iii) una proteína con una homología de por lo menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o (ii); y

5 (iv) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una variación que incluye una delección, una sustitución o una adición de entre uno y varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína según una cualquiera de (i) a (iii).

10 La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, en la que la función equivalente al receptor acoplado a la proteína G es una función que activa una proteína G mediante la unión con un ligando.

La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, que presenta una función que genera un cambio en un potencial de membrana celular cuando un ligando está unido a la proteína en una célula.

15 La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, que presenta una función que aumenta una concentración intracelular de calcio cuando un ligando está unido a la proteína en una célula.

La presente invención utiliza además la proteína mencionada anteriormente, en la que el ligando es un péptido seleccionado de entre el grupo siguiente:

20 (i) forma sulfatada del octapéptido de colecistoquinina (SEC ID nº 14, en adelante abreviado con las siglas «CCK-8S»);

25 (ii) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de un aminoácido homólogo en la secuencia de aminoácidos de CCK-8S a excepción de un residuo sulfatado de tirosina en la séptima posición del extremo C del péptido, y con una función que induce un aumento de una concentración intracelular de calcio o un cambio en un potencial de membrana celular en una célula que expresa el ADN utilizable en la presente invención.

30 La memoria describe un procedimiento para producir la proteína mencionada anteriormente, que comprende el cultivo del transformante mencionado anteriormente.

La presente invención utiliza un anticuerpo que reconoce inmunológicamente la proteína mencionada anteriormente.

35 La presente invención se refiere además al procedimiento de identificación mencionado anteriormente, la selección de un compuesto de prueba o de una sustancia de prueba que modifica un potencial de membrana celular es la selección de una sustancia de prueba que genera una variación de corriente que es característica de un receptor acoplado a la proteína G.

40 La presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula la unión de la proteína mencionada anteriormente con un ligando o una función de la proteína, que comprende la utilización de por lo menos un elemento del grupo compuesto del ADN mencionado anteriormente, el vector recombinante mencionado anteriormente, el transformante mencionado anteriormente, la línea celular mencionada anteriormente, la proteína mencionada anteriormente, y el anticuerpo mencionado anteriormente.

45 La presente invención se refiere además a los procedimientos que se reivindican.

50 La presente invención se refiere además a un procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula una función de la proteína mencionada anteriormente, que comprende la posibilidad de que el transformante mencionado anteriormente y un compuesto de prueba coexistan en condiciones que permitan la interacción con el transformante o la línea celular mencionada anteriormente, introduciendo un sistema que mide una función de una proteína que se expresa en una membrana celular del transformante, y determinando si el compuesto de prueba inhibe o favorece, o no lo hace, la función de la proteína mediante la detección de la existencia o no de la función de la proteína, o un cambio en la misma. La presente invención también se refiere al procedimiento de identificación mencionado anteriormente, en el que el sistema que mide una función de una proteína que se expresa en una membrana celular del transformante es un sistema que mide un cambio en una concentración intracelular de calcio producido por la adición de un ligando, y la detección de la existencia o no de una función de la proteína, o un cambio en la misma, es la detección de un cambio en una concentración intracelular de calcio.

60 La presente invención se refiere además al procedimiento de identificación mencionado anteriormente, en el que el sistema que mide una función de una proteína que se expresa en una membrana celular del transformante es un sistema que mide un cambio en un potencial de membrana producido por la adición de un ligando, y la detección de la existencia o no de una función de la proteína, o un cambio en la misma, es la detección de un cambio en un potencial de membrana.

65 La presente invención se refiere además al procedimiento de identificación mencionado anteriormente, en la que el

ligando es un péptido seleccionado de entre el grupo siguiente:

(i) forma sulfatada del octapéptido de colecistoquinina (SEC ID nº 14, en adelante abreviado con las siglas "CCK-8S"); y

(ii) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de un aminoácido homólogo en la secuencia de aminoácidos de CCK-8S a excepción de un residuo sulfatado de tirosina en la séptima posición del extremo C del péptido, y con una función que induce un aumento de una concentración intracelular de calcio o un cambio en un potencial de membrana celular en una célula que expresa el ADN utilizable en la presente invención.

La presente invención se refiere además al procedimiento de ensayo mencionado anteriormente, que comprende la utilización de por lo menos un elemento del grupo constituido por el ADN mencionado anteriormente, el vector recombinante mencionado anteriormente, el transformante mencionado anteriormente, la línea celular mencionada anteriormente, la proteína mencionada anteriormente, y el anticuerpo mencionado anteriormente.

[Ventajas de la invención]

Se describe una proteína derivada del receptor de proteína de membrana funcional que presenta un dominio de transmembrana de siete dominios que se considera que es un GPCR y un ADN que codifica la proteína. Puesto que esta proteína presenta tres dominios TSP-I, se cree que participa en la inhibición de la angiogénesis. Además, puesto que la proteína interacciona con una proteína de la familia MAGUK (homólogo de guanilato-quinasa asociado a la membrana) (presentando la proteína actividad guanilato-quinasa y una función de adhesión intercelular) en la región del extremo C de la misma, es posible que la proteína participe en la función de adhesión intercelular de las células.

Según la presente invención, también se descubrió que CCK-8S actuaba como ligando del receptor de proteína de membrana funcional. Puesto que CCK-8S indujo una respuesta biológica a través del receptor de proteína de membrana funcional de la presente invención a la baja concentración de 1 nM, se considera que CCK-8S es un ligando *in vivo* del receptor de proteína de membrana funcional. Se ha documentado que CCK-8S es fundamental para la retención memorística; por ejemplo, que la ausencia de CCK-8S dificulta el uso de la memoria al nivel consciente y su traducción en acciones. Se considera que la acción de CCK-8S con respecto a este tipo de función neurológica tiene lugar a través del receptor de proteína de membrana funcional descrito en la presente invención. Se considera, por tanto, que un agonista del receptor de proteína de membrana funcional descrito en la presente invención ejerce una acción que es equivalente a la de CCK-8S, es decir, una acción que modifica una función neurológica como la memoria y similares.

Según la presente invención, es posible identificar y obtener un agonista de un receptor de proteína de membrana funcional en el que actúe CCK-8S. También se describe la posibilidad de modificar la función neurológica usando el agonista. Por ejemplo, es posible mejorar la memoria utilizando el agonista. Además, utilizando el agonista, es posible aliviar una enfermedad o los síntomas que acompañan a la obstaculización de la función neurológica.

Es posible diagnosticar, prevenir y/o tratar una enfermedad provocada por una anomalía en la proteína y/o el ADN, por ejemplo, una enfermedad relacionada con la angiogénesis. Algunos ejemplos de este tipo de enfermedad son el infarto cerebral, la contusión cerebral y la enfermedad tumoral. Además, puesto que la proteína es un receptor de proteína de membrana funcional, también es posible diagnosticar, prevenir y/o tratar una enfermedad provocada por una reducción o desaparición, o similares, en la función y/o en la cantidad de un ligando de la misma, por ejemplo, CCK-8S. Algunos ejemplos de este tipo de enfermedad son las enfermedades acompañadas de daños en la función neurológica de la memoria o similares, incluyéndose entre los ejemplos concretos de las mismas la enfermedad de Alzheimer.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra una comparación entre un dominio de función de un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 y un péptido codificado por hBAI2. (Ejemplo 1).

La figura 2 representa que, cuando el clon de ADNc ph01207 se expresaba en células CHO-K1, una línea celular animal, en forma de una proteína de fusión FLAG-tag y una proteína de fusión HA-tag, respectivamente, dichas proteínas se expresaban en la membrana celular (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). La detección de la proteína en la membrana celular se analizó mediante fluorocitometría, con anticuerpos anti-FLAG-tag y anti-HA-tag. En la figura, la región que aparece en negro representa a las células que expresaron cada proteína de fusión tag, mientras que la región que aparece en blanco representa a las células de control que no expresaron las proteínas. (Ejemplo 2)

La figura 3 representa las formas de onda que se pueden observar cuando la respuesta de ligando del GPCR se

mide por variaciones en el potencial de membrana de las células (forma de onda producida por la respuesta específica de GPCR [forma de onda 1], formas de onda producidas por elementos artificiales y similares (formas de onda 2-4), y formas de onda reconocidas cuando no había respuesta (formas de onda 5 y 6]). (Ejemplo 3)

5 La figura 4-A es una vista que representa que la concentración de Ca^{2+} intracelular aumentó con la adición de 1 nM de CCK-8S (SEC ID nº 14) en la línea celular CHO-K1 (HA-ph01207#10-6) que expresa de forma estable el clon de ADNc ph01207 en forma de proteína de fusión HA-tag. Por contraste, en la línea celular CHO-K1 que no se transfectó con este ADNc, no se observó un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular con la adición de CCK-8S (SEC ID nº 14). El eje horizontal representa el tiempo transcurrido desde la adición de CCK-8S (SEC ID nº 14) a las células, y el eje longitudinal muestra la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Ejemplo 5)

15 La figura 4-B es una vista que representa que un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la adición de 1 nM de CCK-8NS no se observó en la línea celular CHO-K1 (HA-ph01207#10-6) que expresa de forma estable el clon de ADNc ph01207 en forma de proteína de fusión HA-tag. Aunque CCK-8NS (forma no sulfatada de CCK-8) es un octapéptido de CCK compuesto de la misma secuencia de aminoácidos que CCK-8S, es un péptido en el que el séptimo residuo de tirosina del extremo C no está sulfatado. Un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la adición de CCK-8NS tampoco se observó en una línea celular CHO-K1 que no se transfectó con el clon de ADNc ph01207. El eje horizontal representa el tiempo transcurrido desde la adición de CCK-8NS a las células, y el eje longitudinal muestra la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Ejemplo 5)

20 La figura 4-C es una vista que representa que un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la adición de 1 nM de CCK-4 no se observó en la línea celular CHO-K1 (HA-ph01207#10-6) que expresa de forma estable el clon de ADNc ph01207 en forma de proteína de fusión HA-tag. Un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la adición de CCK-4 tampoco se observó en la línea celular CHO-K1 que no se transfectó con el ADNc. El eje horizontal muestra el tiempo transcurrido desde la adición de CCK-4 a las células, y el eje longitudinal representa la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Ejemplo 5)

30 La figura 4-D es una vista que representa que la concentración de Ca^{2+} intracelular aumentó con la adición de 10 μM de ionóforo de calcio A23187 en la línea celular CHO-K1 (HA-ph01207#10-6) que expresa de forma estable el clon de ADNc ph01207 en forma de proteína de fusión HA-tag. Un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la adición de A23187 también se observó en la línea celular CHO-K1 que no se transfectó con el ADNc. El eje horizontal muestra el tiempo transcurrido desde la adición de A23187 a las células, y el eje longitudinal muestra la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Ejemplo 5)

35 La figura 4-E es una vista que representa las concentraciones de Ca^{2+} intracelular tras la adición de un amortiguador en la línea celular CHO-K1 (HA-ph01207#10-6) que expresa de forma estable el clon de ADNc ph01207 en forma de proteína de fusión HA-tag y la línea celular CHO-K1 que no se transfectó con el ADNc. El eje horizontal muestra el tiempo transcurrido desde la adición del amortiguador a las células, y el eje longitudinal muestra la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Ejemplo 5)

40 Descripción detallada

La presente invención reivindica los derechos de prioridad de las solicitudes de patente japonesas nº 2003-389624, nº 2004-130371 y nº 2004-304780.

45 A continuación se describen con mayor detalle los ejemplos relacionados con la presente invención. Sin embargo, debe apreciarse que la descripción detallada siguiente se proporciona únicamente a título de ejemplo explicativo y no limitativo de la presente invención.

50 En la presente memoria, el término "proteína" se utiliza a veces como término genérico que se refiere a una proteína completa sintética o aislada, a un polipéptido completo sintético o aislado, o a un oligopéptido completo sintético o aislado. En este caso, la proteína, polipéptido u oligopéptido presenta un tamaño mínimo de dos aminoácidos. En adelante, es posible que se utilicen uno o tres caracteres cuando se represente a un aminoácido.

55 La presente invención describe una nueva proteína derivada del receptor de proteína de membrana funcional que presenta un dominio de transmembrana de siete dominios que se considera que es un GPCR, y un ADN que codifica la proteína. Puesto que esta proteína presenta tres dominios TSP-I, se considera que participa en la inhibición de la angiogénesis. Además, puesto que la proteína interacciona con una proteína de la familia MAGUK (una proteína con actividad guanilato-quinasa y una función de adhesión intercelular) en la región del extremo C de la misma, existe la posibilidad de que la proteína esté asociada a una función de adhesión intercelular de las células.

60 Mediante la presente invención, también se descubrió que CCK-8S (SEC ID nº 14) actúa como ligando de un receptor de proteína de membrana funcional de la presente proteína. Puesto que CCK-8S (SEC ID nº 14) inició una respuesta biológica a través del receptor de proteína de membrana funcional a una baja concentración de 1 nM, se consideró que CCK-8S (SEC ID nº 14) es un ligando *in vivo* del receptor de proteína de membrana funcional. Se ha documentado que CCK-8S es fundamental para la retención memorística; por ejemplo, que la ausencia de CCK-8S

(SEC ID nº 14) dificulta el uso de la memoria a un nivel consciente y su traducción en acciones. Se consideró que la acción de CCK-8S (SEC ID nº 14) con respecto a este tipo de función neurológica tiene lugar a través del receptor de proteína de membrana funcional de la presente invención.

5 (ADN)

10 El ADN utilizado en la invención es un clon de ADNc con una región que codifica un dominio de transmembrana de siete dominios que se identificó a partir de una genoteca de ADNc de cadena larga derivada del cerebro humano. La genoteca de ADNc de cadena larga derivada del cerebro humano es una genoteca de ADNc que comprende clones de ADNc cuya secuencia completa de bases se determinó tras el aislamiento de fragmentos de ADNc mediante análisis de dbEST (base de datos de etiquetas de secuencia expresada) a partir de una genoteca de ADNc construida mediante un procedimiento ordinario que utiliza polyA⁺RKA (Clontech Inc.; número de catálogo 6516-1, 6525-1 y 6578-1) comercializado derivado de cerebro humano, cerebro fetal e hipocampo cerebral como material de partida.

15 Como ejemplos de una forma específica del ADN utilizado en la presente invención, es posible mencionar un ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 del listado de secuencias o la secuencia complementaria de la misma. En la presente memoria, es posible referirse a un ADN que comprende la secuencia complementaria de un ADN determinado como una "cadena complementaria". El ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 comprende una nueva secuencia de bases de 4557 pb incluye in marco de lectura abierto (ORF) que codifica 1518 residuos de aminoácidos (SEC ID nº 2) con un segmento que se predice que es una secuencia de señal (20 residuos de aminoácidos del extremo N).

20 Mediante búsqueda por homología se aclaró que el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 presenta homología con hBAI2 (GenBank, número de registro AB005298). Se considera que, además de cuatro dominios TSP-I, la proteína codificada por hBAI2 tiene un dominio GPS y un dominio de la familia 2 del GPCR (dominio de transmembrana de siete dominios).

25 Se descubrió que las características estructurales de la proteína (SEC ID nº 2) que es codificada por el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 incluyen, además de tres dominios TSP-I, la presencia de un dominio GPS y un dominio de la familia 2 del GPCR (véase la figura 1).

30 Mediante la comparación de secuencias, se aclaró que existe una diferencia en el número de dominios TSP-I y la secuencia de aminoácidos del extremo C entre la proteína (SEC ID nº 2) codificada por el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 y la proteína codificada por hBAI2 (véase la figura 1). Más específicamente, se descubrió que 55 residuos de aminoácidos que incluyen un dominio TSP-I en el lado de la región del extremo N de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por hBAI2 son eliminados en la presente proteína (SEC ID nº 2), y que en la región del extremo C, un residuo de aminoácidos que corresponde a la lisina en la posición 1406 se inserta en la presente proteína (SEC ID nº 2). Existe por tanto una posibilidad de que la presente proteína (SEC ID nº 2) sea una variante de corte y empalme de hBAI2.

35 El ADN que comprende la secuencia de bases representadas por la secuencia SEC ID nº 1 se expresó en la membrana celular cuando se expresaba en una célula animal. Además, en la célula animal que expresaba el ADN, se obtuvo una respuesta a la acción de un ligando. También se aclaró que el producto génico del presente ADN puede interactuar con las proteínas de la familia MAGUK DLG2, DLG3 y DLG4 o AIP1, MAGI3 y similares en la región del extremo C de la misma. Las proteínas de la familia MAGUK presentan un dominio PDZ que reconoce la última secuencia de aminoácidos del extremo C de una proteína diana en la interacción de proteínas, y se considera que, mediante la localización en la membrana celular para interactuar con una proteína de membrana como un receptor o un canal de iones, las proteínas participan en la transducción de señales desde estas proteínas de membrana para contribuir a la adhesión intercelular y similares. De forma similar, se ha reconocido la interacción entre las proteínas de la familia MAGUK y hBAI2. Mientras tanto, se ha informado de que hBAII, un homólogo de hBAI2, se une con BAP1 (proteína 1 asociada a BAI1), una de las proteínas de la familia MAGUK, a través de una secuencia parcial (QTEV: SEC ID nº 3) de la región distal de hBAII (Shiratsuchi, T. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, vol. 247, págs. 597-604). Esta secuencia (QTEV: SEC ID nº 3) está preservada en la región del extremo C de la proteína codificada por el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 y la proteína codificada por hBAI2, y existe por tanto una posibilidad de que las proteínas interactúen con una proteína con un dominio PDZ en este segmento de la secuencia.

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "interacción" se refiere, por ejemplo, a dos proteínas diferenciadas u homólogas que actúan específicamente de forma conjunta, modificándose como resultado la función de una de las proteínas o de ambas, potenciándose o decreciendo. La expresión "actuar específicamente" se refiere a la actuación más selectiva con la proteína que participa en la acción, en comparación con otras proteínas. El término "interacción", por ejemplo, incluye la unión de dos proteínas diferenciadas o la activación de una proteína provocada por la otra proteína.

45 Sobre la base de las características estructurales y las características funcionales del producto génico del ADN que

comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1, se aclaró que el producto génico es un receptor de proteína de membrana funcional. Además, puesto que presenta un dominio de transmembrana de siete dominios, se consideró que es uno de los GPCR que presenta una función que se une a la proteína G mediante la estimulación de ligandos para activar la proteína G, estimular la transducción intracelular de señales, e inducir una respuesta celular biológica.

Además, puesto que presenta dominios TSP-I, se predijo que la proteína codificada por el ADN que comprende la secuencia de bases representadas por la secuencia SEC ID nº 1 tiene una función de inhibición de la angiogénesis.

Otra forma del ADN utilizado en la presente invención es un ADN que contiene la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 o la secuencia complementaria de bases de dicha secuencia de bases.

También se describe un ADN que presenta una homología de secuencia con el ADN utilizado en la presente invención y que presenta similitud en relación con las características estructurales o la función biológica de la proteína codificada por el ADN.

Una homología de secuencia adecuada suele ser una homología de 50% o más con toda la secuencia de bases, y preferentemente es de por lo menos 70%. Más preferentemente, una homología de secuencia adecuada es superior a 70%, aún más preferentemente es de 80% o más, y todavía más preferentemente es de 90% o más.

Entre los ejemplos de características estructurales se incluyen una región de codificación de dominio de transmembrana de siete dominios y una región de codificación de dominio TSP-I. Un ADN preferido presenta una homología de secuencia en estos tipos de regiones que, preferentemente, es de por lo menos 70%, más preferentemente es superior a 70%, aún más preferentemente es de 80% o más, y todavía más preferentemente de 90% o más. Además, resulta preferido que estos dominios sean dominios que conserven una función del mismo, por ejemplo, una función que localice una proteína que incluye el dominio en una membrana o una función de inhibición de la angiogénesis.

Como ejemplo de una de las funciones biológicas de la proteína codificada por el ADN utilizado en la presente invención, puede mencionarse la función de receptor de proteína de membrana. La expresión "función de receptor de proteína de membrana" se refiere a una función que estimula la transducción intracelular de señales a través de la acción de un ligando para inducir una respuesta biológica en una célula animal mediante su expresión como proteína de membrana cuando se expresa en la célula. Por ejemplo, se puede mencionar una función equivalente al GPCR. La expresión "función equivalente al GPCR" se refiere a una función ligada a la proteína G mediante la acción de un ligando para activar la proteína G, y que estimula la transducción intracelular de señales para inducir una respuesta biológica en la célula. Tal y como se describe a continuación, se descubrió la CCK-8S (SEC ID nº 14) como uno de los ligandos del receptor de la proteína de membrana codificado por el presente ADN. En consecuencia, el ADN utilizado en la presente invención presenta preferentemente homología de secuencia con el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 y codifica una proteína que presenta una función equivalente a la de un GPCR a través de la acción de la CCK-8S (SEC ID nº 14).

Como ejemplos específicos de respuesta biológica de una célula, pueden mencionarse un cambio en el potencial de membrana celular o un cambio en la concentración de calcio intracelular. Un cambio en el potencial de membrana celular o un cambio en la concentración de calcio intracelular pueden medirse por un procedimiento conocido. Un cambio en el potencial de membrana celular se puede detectar, por ejemplo, mediante la expresión del ADN de la presente invención en un oocito de *Xenopus laevis*, la medición de la cantidad de corriente generada específicamente para el receptor de proteína de membrana en presencia y ausencia de estimulación de ligando, y la comparación las cantidades de corriente. Un cambio en la concentración intracelular de calcio se puede detectar, por ejemplo, mediante la incorporación a la célula de una sustancia fluorescente que se pueda unir a los iones de calcio, la inducción de un fenómeno fluorescente mediante luz de excitación en presencia y ausencia de estimulación de ligando, y la comparación de las cantidades de fluorescencia. Entre los ejemplos de ligando se incluye una muestra preparada a partir de una célula o un biotejido donde se reconoció la expresión del presente ADN. La preparación de la muestra se puede efectuar, por ejemplo, mediante el cultivo de las células o el tejido conforme a un procedimiento conocido, seguido de la utilización de un procedimiento por el que se obtiene el sobrenadante del cultivo mediante centrifugación u otro procedimiento similar, o un procedimiento que afecta o lisa las células o el tejido mediante un procedimiento conocido. También se puede adquirir un ligando para su uso mediante purificación a partir de estas muestras mediante un procedimiento de purificación de proteínas conocido como, por ejemplo, la cromatografía de filtración sobre gel. Los ejemplos específicos de ligandos comprenden de manera no limitativa el sobrenadante del cultivo de la línea celular HeLa que se utilizó en el presente ejemplo, y cualquier sustancia puede utilizarse como ligando siempre que pueda actuar sobre el producto génico del presente ADN expresado en una célula para inducir una respuesta biológica en la célula. Más preferentemente, la CCK-8S (SEC ID nº 14) puede resultar ejemplificativa como ligando.

Como ejemplo de función biológica diferente, es posible mencionar una función que interacciona con una proteína con actividad de guanilato-quinasa y/o una función de adhesión celular, por ejemplo, una proteína de la familia MAGUK. Los ejemplos específicos de proteínas de la familia MAGUK incluyen DLG2, DLG3, DLG4, AIP1 y MAGI3.

El ADN utilizado en la presente invención incluye un ADN que comprende una secuencia de bases con una variación que incluye una delección, sustitución, adición o inserción de uno o más, por ejemplo entre 1 y 100, preferentemente entre 1 y 30, más preferentemente entre 1 y 20, aún más preferentemente entre 1 y 10, y todavía más preferentemente entre 1 y varios nucleótidos en la secuencia de bases del ADN de arriba. Un ADN preferido es un ADN de este tipo que codifica una proteína con la función biológica descrita anteriormente. El grado de variación y la ubicación de la misma y similares no están particularmente restringidos, siempre que un ADN con la variación presente características estructurales similares a las del ADN anterior y tenga una función biológica que sea equivalente a la de la proteína codificada por el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1. Un ADN que presente este tipo de variación puede ser un ADN natural o puede ser un ADN obtenido por la introducción de una variación partiendo de un gen que exista en la naturaleza. Se conocen las técnicas para introducir una variación, por ejemplo, la mutagénesis dirigida, la recombinación homóloga genética, la extensión de cebadores, y la reacción en cadena por la polimerasa (en adelante, abreviada con las siglas PCR), pudiendo utilizarse estas técnicas de manera independiente o mediante combinaciones adecuadas de las mismas. Por ejemplo, puede introducirse una variación según un procedimiento descrito en un libro (Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory; Muramatsu S., Ed., "Labomanual Genetic Engineering", 1988, Maruzen Co., Ltd.) o mediante la modificación de estos métodos, y puede asimismo utilizarse la técnica de Ulmer (Ulmer, K. M., *Science*, 1983, vol. 219, págs. 666-671).

Como otro ejemplo del ADN utilizado en la presente invención, también es posible mencionar un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con el ADN descrito anteriormente. Las condiciones de hibridación pueden ser, por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en un libro (Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory) u otros similares. Más específicamente, la expresión "en condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, a condiciones de calentamiento a 42°C en una solución que contenga 6 x SSC, SDS al 0,5% y formamida al 50%, y lavado, a continuación, a 68°C en una solución que contenga 0,1 x SSC y SDS al 0,5%. Mientras que estas moléculas de ADN sean moléculas de ADN que se hibriden con el presente ADN, no es necesario que sean moléculas de ADN con la secuencia complementaria de la misma. Preferentemente, el ADN es un ADN que codifica una proteína con la función descrita anteriormente.

Todavía otra forma del ADN utilizado según la presente invención puede ser un fragmento de ADN que comprende una secuencia parcial de bases que está presente en una región designada del ADN descrito anteriormente. Como ejemplo preferido de este tipo de región, es posible mencionar una región que codifica un fragmento que incluye un sitio en el que actúa un ligando que es un fragmento de una proteína codificada por el presente ADN. Un fragmento de ADN que comprende una secuencia parcial de bases que está presente en una región que codifica un fragmento que incluye un sitio en el que actúa un ligando puede utilizarse en la producción de un fragmento que incluye un sitio en el que actúa el ligando. Un fragmento que incluye un sitio en el que actúa un ligando es útil para detectar una acción de un ligando con respecto a la presente proteína, por ejemplo, la unión entre la presente proteína y el ligando, o identificar un compuesto que estimula o inhibe la acción. De forma alternativa, el fragmento es útil para identificar un compuesto con la misma acción que un ligando con respecto a la presente proteína, es decir, un agonista. La unidad mínima de este tipo de fragmento de ADN comprende preferentemente cinco o más nucleótidos consecutivos en la región, más preferentemente diez o más nucleótidos, y todavía más preferentemente 20 o más nucleótidos. Estos fragmentos de ADN se pueden preparar de acuerdo con un procedimiento conocido de síntesis química mediante la designación de un fragmento con la secuencia diana según la información de la secuencia de bases del presente ADN. Como procedimiento sencillo y adecuado para preparar los fragmentos de ADN se puede utilizar un sintetizador de ADN/ARN automatizado. Los presentes fragmentos de ADN pueden utilizarse como cebadores o sustancias para detectar el presente ADN, o como cebadores para producir el presente ADN. El cebador está compuesto preferentemente de entre 15 y 30 nucleótidos, y más preferentemente de entre 20 y 25 nucleótidos. La sustancia está compuesta preferentemente de entre 8 y 50 nucleótidos, más preferentemente de entre 17 y 35 nucleótidos, y aún más preferentemente de entre 17 y 30 nucleótidos. Si la longitud de un cebador o una sustancia es mayor que la longitud adecuada, la especificidad disminuirá debido a un aumento de la hibridación falsa. Además, si la longitud es menor que la longitud adecuada, la especificidad disminuirá debido a la incidencia de desapareamientos. Cuando el presente fragmento de ADN es un fragmento de ADN complementario de una cadena codificante que codifica una proteína, puede utilizarse como un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión del presente ADN. Puesto que es conocido que, en general, un fragmento de ADN compuesto de aproximadamente 20 nucleótidos puede inhibir la expresión de un gen, el oligonucleótido antisentido está compuesto preferentemente de 15 o más nucleótidos, y más preferentemente de 20 o más nucleótidos.

El ADN utilizado en la presente invención puede obtenerse fácilmente mediante una técnica conocida de ingeniería genética (consúltese Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory; Muramatsu S., Ed., "Labomanual Genetic Engineering", 1988, Maruzen Co., Ltd.) basada en la información de secuencia con respecto a un ejemplo específico de la misma descrita según la presente invención, por ejemplo, el ADN que comprende la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1 del listado de secuencias.

Más específicamente, el ADN utilizado en la presente invención puede obtenerse mediante la preparación de una genoteca de ADNc según un procedimiento ordinario de un origen adecuado en el que se confirma la expresión del

ADN de la presente invención, y, a continuación, la selección de un clon deseado de la genoteca utilizando una sustancia o cebador adecuado que sea específico del ADN. Entre los ejemplos de orígenes de ADNc se incluyen diversas células o tejido donde la expresión del presente ADN se confirma, o células cultivadas derivadas de éstas, como, por ejemplo, células de cerebro humano o similares. El aislamiento del ARN total de estos orígenes, el aislamiento y la purificación de ARNm, la obtención de ADNc y la clonación del mismo y demás procedimientos similares pueden efectuarse según un procedimiento ordinario. También es posible utilizar una genoteca de ADNc construida a partir de polyA⁺ARN derivado de cerebro humano, cerebro fetal o hipocampo cerebral. Un procedimiento para seleccionar un clon deseado de una genoteca de ADNc tampoco se limita particularmente, y es posible utilizar un procedimiento habitual. Entre los ejemplos del mismo se incluyen un procedimiento de hibridación de placas o procedimiento de hibridación de colonias que utiliza una sustancia que se une de forma selectiva a la secuencia diana de ADN, o una combinación de estos métodos. La sustancia utilizada en este caso, aunque en general es posible utilizar un ADN o similar que haya sido sintetizado químicamente según la información asociada a la secuencia de bases del presente ADN, puede ser, preferentemente, el presente ADN o un fragmento del mismo que se haya obtenido previamente. Como sonda de este tipo también se puede utilizar un cebador codificante y cebador antisentido que se hayan concebido según la información de secuencia de bases del presente ADN.

La selección de un clon diana de una genoteca de ADNc puede efectuarse, por ejemplo, mediante la confirmación de una proteína de expresión para cada clon utilizando un sistema conocido de expresión de proteínas, utilizando la función biológica como indicador.

Además, es posible utilizar favorablemente un procedimiento de amplificación de ADN/ARN según la PCR (Ulmer, K. M., *Science*, 1983, vol. 219, págs. 666-671; Ehrlich, H. A., Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification", 1989, Stockton Press; Saiki, R. K., et al., *Science*, 1985, vol. 230, págs. 1350-1354) para obtener el ADN de la presente invención. Cuando es difícil obtener ADNc completo de una genoteca de ADNc, es posible utilizar favorablemente un procedimiento RACE (*Jikken Igaku (Experimental Medicine)*, 1994, vol. 12, nº 6, pág. 35), y especialmente el procedimiento 5'-RACE (Frohman, M. A., *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 1988, vol. 85, nº 23, págs. 8.998-9.002) o similares. Los cebadores que se vayan a utilizar para la PCR pueden diseñarse adecuadamente según la información de secuencia de bases del ADN, y obtenerse mediante síntesis según un procedimiento ordinario. El aislamiento y la purificación de fragmentos de ADN/ARN amplificados puede efectuarse según un procedimiento ordinario. Por ejemplo, el aislamiento y la purificación de fragmentos de ADN/ARN amplificados puede efectuarse mediante electroforesis en gel o procedimientos similares.

La determinación de la secuencia de bases del ADN obtenido de esta forma se puede efectuar mediante un procedimiento ordinario, por ejemplo, el procedimiento de terminación de cadena dideoxi (*Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 1977, vol. 74, págs. 5.463-5.457) o el procedimiento de Maxam-Gilbert (*Methods in Enzymology*, 1980, vol. 65, págs. 499-), o simplemente utilizando convenientemente un equipo de secuenciación o similar comercializado.

Aunque el ADN utilizado en la presente invención procede de humanos, dentro del alcance de la presente invención también se incluye el ADN de un mamífero que codifica una proteína con funciones biológicas que son equivalentes a las de una proteína codificada por el presente ADN y que también presenta una homología estructural con el presente ADN, como el ADN de ratón, caballo, oveja, vaca, perro, mono, gato, oso, rata o conejo.

El ADN utilizado en la presente invención también puede ser un ADN del lado del extremo 5' o el lado del extremo 3' al cual un gen o más de, por ejemplo, enzimas como glutatión S-transferasa (GST), β -galactosidasa, peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (ALP), o péptidos tag como His-tag, Myc-tag, HA-tag, FLAG-tag o Xpress-tag están unidos, siempre que la función del mismo, por ejemplo, la expresión de la proteína codificada por el ADN o la función de la proteína expresada, no esté inhibida. La unión de estos genes se puede efectuar mediante una técnica de ingeniería genética habitualmente utilizada, y es útil para facilitar la detección de un gen o ARNm.

(Vector)

También se utiliza un vector recombinante que contiene el ADN utilizado en la presente invención. El vector recombinante se puede obtener mediante la inserción del presente ADN en un ADN vector adecuado.

El vector recombinante que contiene el ADN puede ser cualquier tipo de vector recombinante, siempre que sea un vector recombinante en el que se incorpore el presente ADN. El ADN vector no se limita especialmente siempre que se pueda replicar dentro de un huésped, y se pueda seleccionar adecuadamente según el tipo de huésped y la finalidad del uso. Es posible extraer el ADN vector de una sustancia que exista en la naturaleza, o utilizar aquél en el que se haya eliminado una parte de un segmento de ADN que no sea un segmento necesario para la replicación. Como ejemplos habituales, se pueden mencionar los ADN vectores derivados de plásmidos, bacteriófagos o virus. Entre los ejemplos de ADN de plásmidos se incluyen los plásmidos derivados de *Escherichia coli*, los plásmidos derivados de *Bacillus subtilis*, y los plásmidos derivados de la levadura. Entre los ejemplos de ADN de bacteriófagos se incluyen los fagos λ . Entre los ejemplos de ADN vector derivado de virus se incluyen los vectores derivados de virus animales como los retrovirus, los virus de la vaccinia, los adenovirus, los papovavirus, los SV 40, los virus de la

viruela aviar, y los virus de la enfermedad de Aujeszky, o los vectores derivados de virus de insectos como el baculovirus. Otros ejemplos incluyen un ADN vector derivado de un transposón, un elemento de inserción, o un elemento de cromosoma de levadura. Alternativamente, es posible utilizar un ADN vector obtenido mediante la combinación de dos o más de estos elementos, por ejemplo, un ADN vector (cósmido, fagémido o similar) producido por la combinación de elementos genéticos de un plásmido y un bacteriófago. Además, también es posible utilizar un vector de expresión, un vector de clonación o similar de acuerdo con el objetivo.

Es necesario que se incorpore un gen al vector de forma que se ejerza la función diana del gen, y el vector debe comprender por lo menos la secuencia génica diana y un promotor. Además de estos elementos, según se desee, es posible incorporar al ADN vector una secuencia genética que contenga información relacionada con la replicación y el control, por ejemplo, una secuencia genética o una pluralidad de las mismas combinadas según un procedimiento conocido seleccionadas de entre el grupo constituido por una secuencia de unión de ribosomas, secuencia de señal terminadora, elemento cis como un potenciador, señal de corte y empalme y marcador único. Como marcador selectivo, por ejemplo, pueden mencionarse el gen dihidrofolato reductasa, el gen resistente a la ampicilina y el gen resistente a la neomicina.

Un procedimiento conocido puede aplicarse a un procedimiento para incorporar la secuencia génica de interés en el ADN vector. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento en el que la secuencia génica de interés se trate con una enzima de restricción que se escinda en un sitio específico, posteriormente se mezcle con un ADN vector tratado de forma similar y finalmente se reconecte usando una ligasa. Alternativamente, también puede obtenerse el vector recombinante deseado ligando un ligador adecuado a la secuencia génica de interés, e insertando esto a continuación en una región de clonación múltiple de un vector adecuado a tal propósito.

(Transformante)

En la presente invención también se utiliza un transformante obtenido introduciendo en un huésped el ADN vector que contiene el ADN utilizado en la presente invención. Al utilizar un vector de expresión como ADN vector, el presente ADN puede expresarse, y también puede producirse una proteína codificada por el ADN. También es posible introducir en el transformante uno o más ADN vectores que contengan un gen deseado distinto del presente ADN.

Como huésped, es posible utilizar tanto procariontes como eucariontes. Entre los ejemplos de procariontes se incluyen las bacterias pertenecientes a *Escherichia*, como *Escherichia coli*, las bacterias pertenecientes a *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, las bacterias pertenecientes a *Pseudomonas*, como *Pseudomonas putida*, y las bacterias pertenecientes a *Rhizobium*, como *Rhizobium meliloti*. Entre los ejemplos de eucariontes se incluyen levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, células de insectos como Sf9 y Sf21, y células animales como células de riñón de mono (células COS, células Vero), células de ovario de hámster chino (células CHO), células L de ratón, células GH3 de rata, células FL humanas o células EBNA 293, y oocitos *Xenopus laevis*. Preferentemente, se usan células animales.

La introducción del ADN vector en la célula huésped puede efectuarse conforme a un procedimiento conocido, por ejemplo, mediante la aplicación de un procedimiento estándar descrito en un libro (Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª Edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory). Aunque es posible mencionar el procedimiento que integra el gen en el cromosoma como un procedimiento preferido con respecto a la estabilidad del gen, es posible utilizar como procedimiento simple un sistema de replicación autónomo que utilice un gen extranuclear. Como procedimientos específicos, es posible mencionar la transfección de fosfato cálcico, la transfección mediada por DEAE dextrano, la microinyección, la transfección mediada por lípidos catiónicos, la electroporación, la transducción, la carga de raspaduras, la infección y la introducción balística.

Al utilizar una célula animal como huésped, preferentemente el vector recombinante puede experimentar una replicación autónoma dentro de la célula y también está constituido por un promotor, un sitio de empalme de ARN, un gen diana, un sitio poliadenilatado y una secuencia de terminación de transcripción. Si se desea, también es posible que contenga un origen de replicación. Como promotor, es posible utilizar el promotor SR α , el promotor SV 40, el promotor LTR, el promotor CMV y similares, y también es posible utilizar un promotor de gen precoz de citomegalovirus. Como procedimiento para introducir el vector recombinante en una célula animal se usa, preferentemente, por ejemplo, la electroporación, la técnica de fosfato cálcico, la lipofección o similares.

Al utilizar un procarionte como huésped, preferentemente el vector recombinante puede experimentar una replicación autónoma dentro de la bacteria y está asimismo constituido por un promotor, una secuencia de unión ribosómica, el gen diana y una secuencia de terminación de transcripción. También es posible que contenga un gen que regula el promotor.

Al utilizar bacterias como huésped, el promotor no se encuentra particularmente limitado y es posible utilizar cualquier promotor siempre que se pueda expresar en un huésped como *Escherichia coli*. Por ejemplo, es posible mencionar un promotor derivado de *Escherichia coli* o un fago, como el promotor trp, el promotor lac, el promotor PL o el promotor PR. Resulta asimismo posible utilizar un promotor diseñado y modificado artificialmente como el

promotor tac. El procedimiento para introducir un vector recombinante en las bacterias no se limita particularmente siempre que sea un procedimiento que introduzca el ADN en las bacterias. Sus ejemplos preferidos comprenden un procedimiento en el que se use ión calcio, electroporación o similares.

5 Al utilizar levadura como huésped, el promotor no se encuentra particularmente limitado y es posible utilizar cualquier promotor siempre que se pueda expresar en la levadura. Sus ejemplos comprenden el promotor gal1, el promotor gal10, el promotor de la proteína de choque térmico, el promotor MFα1, el promotor PHO5, el promotor PGK, el promotor GAP, el promotor ADH, y el promotor AOX1. El procedimiento para introducir un vector recombinante en la levadura no se limita particularmente siempre que sea un procedimiento que introduzca el ADN
10 en la levadura. Sus ejemplos preferidos comprenden un procedimiento que utiliza electroporación, esferoplastos, acetato de litio o similares.

Al utilizar una célula de insecto como huésped, los ejemplos preferidos de procedimientos para introducir un vector recombinante incluyen la técnica de fosfato cálcico, la lipofección y la electroporación.

15 Como ejemplo específico de transformante de la presente invención, es posible mencionar la línea celular HA-ph01207#10-6. La línea celular HA-ph01207#10-6 es una línea celular establecida mediante la transfección de la línea celular CHO-K1 con un vector que permite la expresión del ADN que comprende la secuencia de bases del ORF del ADN representado por la secuencia de bases descrita en la secuencia SEC ID nº 1 de la que se excluye un segmento que previsiblemente codifica una secuencia de señal (20 residuos de aminoácidos del extremo N de la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2), como una proteína de fusión HA-tag de extremo N. La línea celular HA-ph01207#10-6 expresa de forma estable la proteína de fusión HA-tag de extremo N. En el ejemplo 2 se describe con mayor detalle un procedimiento específico para producir esta línea celular.

25 La línea celular HA-ph01207#10-6 se depositó en el *International Patent Organism Depository* del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* de Japón el 19 de agosto de 2004 con el número de registro FERM BP-10101. La existencia de esta línea celular se confirmó experimentalmente en el *International Patent Organism Depository* el 22 de septiembre de 2004.

30 (Proteína)

También se utiliza una proteína codificada por el ADN utilizado en la presente invención.

35 Como forma específica de la proteína utilizada en la presente invención, es posible mencionar, por ejemplo, la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 del listado de secuencias. Esta proteína presenta tres dominios TSP-I y presenta asimismo un dominio GPS y un dominio 2 de la familia GPCR (dominio de transmembrana de siete dominios). Los tres dominios TSP-1 comprenden respectivamente, en la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2, la región desde la histidina (His) en la posición 297 hasta la prolina (Pro) en la posición 350, la región desde el ácido glutámico (Glu) en la posición 352 hasta la prolina (Pro) en la posición 405, y la región desde el ácido aspártico (Asp) en la posición 408 hasta la prolina (Pro) en la posición 461. Los siete dominios de transmembrana comprenden respectivamente, en la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2, la región desde la valina (Val) en la posición 870 hasta la fenilalanina (Phe) en la posición 890, la región desde la serina (Ser) en la posición 899 hasta la glicina (Gly) en la posición 919, la región desde la valina (Val) en la posición 928 hasta la leucina (Leu) en la posición 948, la región desde la arginina (Arg) en la posición 970 hasta la treonina (Thr) en la posición 990, la región desde la alanina (Ala) en la posición 1012 hasta la fenilalanina (Phe) en la posición 1032, la región desde la leucina (Leu) en la posición 1087 hasta la alanina (Ala) en la posición 1107, y la región desde la valina (Val) en la posición 1114 hasta la valina (Val) en la posición 1134.

50 Otra forma de la proteína utilizada en la presente invención es una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2.

Otra forma de proteína utilizada en la presente invención es una proteína con una homología de secuencia con la presente proteína, y con una similitud o similar con las características estructurales o la función biológica de la presente proteína.

55 Una homología de secuencia adecuada suele ser una homología del 50% o más con la secuencia completa de aminoácidos, y preferentemente es de por lo menos el 70%. Más preferentemente, la homología de secuencia es más del 70%, más preferentemente es del 80% o superior, y aún más preferentemente es del 90% o superior. Preferentemente, la homología de secuencia en un dominio de transmembrana de siete dominios o un dominio TSP-I es de por lo menos el 70%, preferentemente de más del 70%, más preferentemente de aproximadamente el 80% o superior, y aún más preferentemente es del 90% o superior, y resulta preferido que estos dominios presenten una función de la misma, por ejemplo, una función que localice una proteína que incluya el dominio en una membrana o una función de inhibición de la angiogénesis.

65 Los ejemplos de este tipo de proteína comprenden una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con

una variación que incluye una delección, sustitución, adición o inserción con uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1 a 100, preferentemente 1 a 30, más preferentemente 1 a 20, aún más preferentemente 1 a 10, y, todavía más preferentemente, entre uno y varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 y con la función biológica mencionada anteriormente. El grado de variación de los aminoácidos y las posiciones y similares de los mismos no están especialmente limitados, siempre que la proteína con la variación tenga una función homogénea con respecto a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2.

Una proteína con la variación puede ser una proteína producida de forma natural mediante, por ejemplo, una mutación o una modificación postraduccional, o puede ser una proteína obtenida mediante la introducción de una mutación basada en un gen que existe en la naturaleza. Se conocen las técnicas para introducir una variación, por ejemplo, la mutagénesis dirigida, la recombinación homóloga genética, la extensión de cebadores, y la PCR, pudiendo utilizarse estas técnicas de manera independiente o mediante combinaciones adecuadas de las mismas. Por ejemplo, puede introducirse una variación según un procedimiento descrito en un libro (Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory; Muramatsu Masami, Ed., "Labomanual Genetic Engineering", 1988, Maruzen Co., Ltd.) o mediante la modificación de estos métodos, y la técnica de Ulmer (Ulmer, K. M., *Science*, 1983, vol. 219, págs. 666-671) también puede utilizarse. Al introducir una variación, desde el punto de vista que consiste en no alterar las propiedades fundamentales (propiedades físicas, función, actividad fisiológica, actividad inmunológica o similares) de la proteína, por ejemplo, se puede suponer fácilmente la sustitución mutua entre aminoácidos homólogos (aminoácidos polares, aminoácidos no polares, aminoácidos hidrófobos, aminoácidos hidrófilos, aminoácidos cargados positivamente, aminoácidos cargados negativamente y aminoácidos aromáticos y similares).

Todavía otra forma de la proteína utilizada en la presente invención puede ser un fragmento que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que está presente en una región designada de la proteína descrita anteriormente. Como ejemplo preferido de este fragmento, es posible mencionar un fragmento que incluya un sitio en el que un ligando actúa en la presente proteína. Un fragmento que incluye un sitio en el que actúa un ligando es útil para detectar la acción del ligando con respecto a la presente proteína, por ejemplo, para detectar la unión entre la presente proteína y el ligando, o identificar un compuesto que estimula o inhibe la acción. Alternativamente, el fragmento es útil para identificar un compuesto con una acción similar que un ligando con respecto a la presente proteína, es decir, un agonista. El fragmento también puede utilizarse como un antígeno, con el fin de producir un anticuerpo frente a la proteína. Este tipo de fragmento comprende preferentemente, como unidad mínima, cinco o más aminoácidos consecutivos, más preferentemente ocho o más, aún más preferentemente doce o más, y todavía más preferentemente quince o más aminoácidos consecutivos. Estos fragmentos se pueden preparar de acuerdo con un procedimiento conocido de síntesis química mediante la designación de un fragmento con la secuencia diana según la información de la secuencia de aminoácidos de la presente proteína.

Aunque la proteína utilizada en la presente invención procede de humanos, también es posible utilizar en la presente invención una proteína procedente de mamíferos, que tenga funciones equivalentes y una homología estructural con la presente proteína, por ejemplo, una proteína derivada del ratón, del caballo, de la oveja, de la vaca, del perro, del mono, del gato, de la rata o del conejo.

Una proteína utilizada en la presente invención puede ser una proteína preparada a partir de una célula o una muestra biológica en la que un gen que codifica la presente proteína se ha expresado mediante una técnica de ingeniería genética, puede ser un producto sintético de un sistema libre de células o un producto obtenido mediante síntesis química, o una sustancia obtenida mediante la purificación de un producto obtenido de éstas. La presente proteína también puede ser una proteína que se expresa en una célula que incluye el gen que codifica la presente proteína. La célula puede ser un transformante obtenido mediante transfección con un vector que contiene el gen que codifica la presente proteína.

Un grupo carboxilo o un grupo amino constitutivo o similar de la proteína según la presente invención también puede ser modificado hasta el punto de no modificar de manera notoria la función de la misma, por ejemplo, mediante una modificación de amidación o similar. Además, es posible que la proteína sea tal que fuera etiquetada mediante la unión de una proteína distinta o una operación similar de forma directa o indirecta mediante un péptido de unión o similar, utilizando una técnica de ingeniería genética o similar, al lado del extremo N o al lado del extremo C del mismo. Resulta preferido el etiquetado que no inhibe las propiedades fundamentales de la presente proteína. Los ejemplos de la proteína o similares que se pueden unir comprenden, por ejemplo, enzimas como GST, β -galactosidasa, HRP o ALP, péptidos de etiqueta como His-tag, Myc-tag, HA-tag, FLAG-tag o Xpress-tag, sustancias fluorescentes como isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina, proteína de unión a la maltosa, fragmento Fc de inmunoglobulina y biotina. También se puede efectuar el etiquetado, pero usando un isótopo radioactivo. La sustancia utilizada para el etiquetado puede añadirse de forma individual o en combinaciones de dos o más. Mediante los análisis de la propia sustancia utilizada en el etiquetado o de la función de la misma, la presente proteína puede simplemente detectarse o purificarse o, por ejemplo, se puede detectar la interacción entre la proteína de la presente invención y otra proteína.

(Procedimiento para producir la proteína)

Para efectuar el procedimiento de la invención es útil un procedimiento para producir la proteína de la presente invención. La proteína utilizada en la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante una técnica ordinaria de ingeniería genética basada en la información de la secuencia de bases del gen que codifica la presente proteína (véase Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory; Muramatsu Masami., Ed., "Labomanual Genetic Engineering", 1988, Maruzen Co., Ltd.; Ulmer, K. M., *Science*, 1983, vol. 219, págs. 666-671; Ehrlich, H. A., Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification", 1989, Stockton Press). Por ejemplo, la proteína puede obtenerse mediante la preparación de una genoteca de ADNc según un procedimiento ordinario a partir de diversas células o tejido en el que la expresión del presente ADN está confirmada o células cultivadas derivadas de éstas, por ejemplo, cerebro humano, amplificándose el gen que codifica la presente proteína utilizando un cebador adecuado que sea específico del gen, e induciendo la expresión del gen obtenido mediante una técnica conocida de ingeniería genética.

Más específicamente, por ejemplo, la presente proteína puede producirse mediante el cultivo del transformante según la presente invención, y la posterior recuperación de la proteína de interés a partir del cultivo obtenido. El cultivo del transformante puede efectuarse según las condiciones de un cultivo conocido y el procedimiento de cultivo más adecuados a los huéspedes respectivos. El cultivo puede efectuarse utilizando la presente proteína que es expresada por el transformante o una función de la misma como indicador. De manera alternativa, el cultivo puede efectuarse utilizando la presente proteína o la cantidad de proteínas de la misma producida en el huésped o fuera del huésped como indicador, o mediante un subcultivo o cultivo discontinuo, utilizando la cantidad de transformante en el medio de cultivo como indicador.

Cuando la proteína diana se expresa en la célula del transformante o en la membrana celular, el transformante puede interrumpirse para extraerse la proteína diana. Además, cuando la proteína diana se secreta fuera del transformante, el medio de cultivo puede utilizarse tal y como está o el medio de cultivo puede utilizarse después de extraer el transformante mediante centrifugación o similar.

Según se desee, la proteína puede aislarse y/o purificarse a partir de un medio de cultivo utilizado para cultivar el transformante o a partir del transformante, mediante diversos medios de aislamiento que utilizan sus propiedades físicas o propiedades químicas. El aislamiento y/o la purificación pueden efectuarse utilizando una función de la presente proteína como indicador. Entre los ejemplos de procedimientos de aislamiento se incluyen el precipitado por sulfato amónico, la ultrafiltración, la cromatografía en gel, la cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía de afinidad, la cromatografía líquida de alto rendimiento, y la diálisis, y estos procedimientos pueden utilizarse independientemente o en combinaciones adecuadas de los mismos. Preferentemente, como procedimiento recomendado, un anticuerpo que sea específico para la proteína de interés se prepara según la información de la secuencia de aminoácidos de la presente proteína para efectuar la adsorción específica utilizando el anticuerpo, por ejemplo, cromatografía de afinidad utilizando una columna que une el anticuerpo.

Una proteína utilizada en la presente invención también puede producirse según un procedimiento ordinario de síntesis química. Por ejemplo, la síntesis de fase sólida, la síntesis de fase de solución y similares son procedimientos conocidos de síntesis química de proteínas, y es posible utilizar cualquiera de estos métodos. Estos tipos de procedimientos de síntesis de proteínas incluyen más específicamente el llamado procedimiento de elongación por etapas que une cada aminoácido de forma secuencial, uno a uno, para alargar una cadena basada en la información de secuencias de aminoácidos, y un procedimiento de condensación de fragmentos que previamente sintetiza fragmentos que comprenden varios aminoácidos y posteriormente somete los fragmentos respectivos a una reacción de acoplamiento, y la síntesis de la presente proteína puede efectuarse mediante cualquiera de estos métodos. Un procedimiento de condensación utilizado para la síntesis de proteínas descrita anteriormente también puede efectuarse según un procedimiento ordinario, y los ejemplos comprenden el procedimiento de azida, el procedimiento de anhídrido mezclado, el procedimiento DCC, procedimiento de éster activo, el procedimiento de oxidación-reducción, el procedimiento DPPA (difenilfosforil azida), el procedimiento DCC + aditivo (1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinamida, N-hidroxi-5-norbomane-2,3-dicarboxiimida y similares), y el procedimiento de Woodward. Una proteína obtenida mediante síntesis química puede purificarse adecuadamente según diversos tipos de procedimientos comunes de purificación, como los descritos anteriormente.

Una proteína utilizada en la presente invención puede fragmentarse mediante la escisión de la proteína utilizando una peptidasa adecuada y, como resultado, es posible obtener fragmentos de la proteína.

(Anticuerpo)

En la presente invención también se utiliza un anticuerpo frente a la proteína utilizada en la presente invención. El anticuerpo se produce utilizando la presente proteína como antígeno. El antígeno puede ser la presente proteína o un fragmento de la misma, y está compuesta de por lo menos ocho aminoácidos, preferentemente de por lo menos diez, más preferentemente de por lo menos doce y aún más preferentemente de quince o más aminoácidos. Con el fin de producir un anticuerpo que sea específico de la presente proteína y/o un fragmento, se utiliza preferentemente una región que comprenda una secuencia de aminoácidos característica de la presente proteína o un fragmento. La

secuencia de aminoácidos de esta región no es necesariamente homóloga o idéntica a la secuencia de la presente proteína o un fragmento de la misma, y resulta preferido un sitio que esté expuesto hacia afuera en la estructura terciaria de la misma, e incluso si la secuencia de aminoácidos del sitio de exposición no es continua en la estructura primaria, es suficiente que la secuencia de aminoácidos sea continua con respecto al sitio de exposición. El anticuerpo no está particularmente limitado siempre que pueda unirse específicamente o reconocer la presente proteína y/o un fragmento de la misma inmunológicamente. La presencia o ausencia de esta unión o reconocimiento se puede determinar mediante una reacción conocida de unión de antígeno-anticuerpo.

Es posible utilizar un procedimiento conocido de producción de anticuerpos para la producción del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede obtenerse mediante la administración del antígeno a un animal de forma independiente o unido a un vehículo en presencia o ausencia de un adyuvante, y la realización de la inducción inmunológica como la respuesta humoral y/o la respuesta celular. El vehículo no se limita particularmente siempre que no exhiba en sí mismo una acción adversa frente al huésped y potencie la antigenicidad, y entre los ejemplos del mismo se incluyen la celulosa, los aminoácidos poliméricos, la albúmina y la hemocianina de lapa californiana. Entre los ejemplos de adyuvantes se incluyen el adyuvante completo de Freund (FCA), el adyuvante incompleto de Freund (FIA), Ribi (MPL), Ribi (TDM), Ribi (MPL + TDM), la vacuna de *Bordetella pertussis*, el muramil-dipéptido (MDP), el adyuvante de aluminio (ALUM), y combinaciones de éstos. De entre los animales posibles para la inmunización, resulta preferida la utilización de ratones, ratas, cabras, caballos o similares.

Es posible obtener un anticuerpo policlonal a partir del suero de un animal administrado con el antígeno mediante un procedimiento conocido de recuperación de anticuerpos. Como ejemplo preferido de procedimiento de recuperación del anticuerpo, es posible mencionar la cromatografía por inmovinoafinidad.

Un anticuerpo monoclonal se puede producir mediante la recuperación de células productoras de anticuerpos (por ejemplo, linfocitos derivados del bazo o nódulos linfáticos) de un animal administrado con el antígeno, y la introducción de un medio de transformación que utiliza las células conocidas de proliferación permanente (por ejemplo, la cepa de mieloma de la línea P3-X63-Ag8). Por ejemplo, las células productoras de anticuerpos y las células en permanente proliferación se fusionan mediante un procedimiento conocido para producir un hibridoma, el hibridoma se clona para detectar un hibridoma que produzca un anticuerpo que reconozca específicamente la proteína utilizada en la presente invención, y el anticuerpo se recupera a continuación de la solución del cultivo de dicho hibridoma.

Un anticuerpo monoclonal o policlonal así obtenido que puede reconocer y unirse a la proteína de la presente invención puede utilizarse como anticuerpo para la purificación de la presente proteína, reactivo o marcador de etiquetado. En particular, un anticuerpo que inhibe la función de la presente proteína, o un anticuerpo que se une a la presente proteína y exhibe una acción de tipo ligando para la presente proteína puede utilizarse para la regulación funcional de la presente proteína. Estos anticuerpos son útiles para esclarecer, inhibir, mejorar y/o tratar diversos tipos de enfermedades atribuibles a una anomalía en la presente proteína y la función de la misma.

(Identificación de ligandos)

También se describe un procedimiento para identificar un ligando de la proteína según la presente invención. Puesto que la presente proteína es un nuevo receptor de proteína de membrana y podría inducir una respuesta biológica celular del sobrenadante del cultivo celular HeLa al expresarse en células animales, se considera que un ligando del receptor está presente en el sobrenadante del cultivo celular HeLa.

Una característica del procedimiento de identificación de un ligando es el contacto de la sustancia que va a ser examinada (en adelante denominada "sustancia de prueba") con la proteína de la presente invención. La proteína utilizada en el procedimiento de identificación puede ser una proteína expresada en la membrana celular de una célula que incluye ADN que codifica la presente proteína. La célula puede ser un transformante obtenido mediante transfección con un vector que incluye ADN que codifica la presente proteína.

El ligando diana puede obtenerse mediante la detección de la unión entre una sustancia de prueba y la proteína mediante un procedimiento conocido de ensayo de unión. Alternativamente, en un procedimiento de identificación que utiliza células que expresan la presente proteína, el ligando diana puede obtenerse mediante la determinación de la respuesta biológica de las células que es inducida cuando la sustancia de prueba contacta con la proteína. Cuando la respuesta biológica de la célula cuando la sustancia de prueba es contactada con la proteína cambia (se estimula, tiene lugar, disminuye o desaparece) en comparación con el caso en que no se produce contacto, puede determinarse que la sustancia de prueba es un ligando o incluye un ligando. Entre los ejemplos específicos de respuesta biológica de la célula se incluye un cambio en el potencial de la membrana celular o un cambio en la concentración intracelular de calcio. La medición del potencial de la membrana celular o de la concentración intracelular de calcio se puede efectuar mediante un procedimiento conocido. Alternativamente, en un procedimiento de identificación que utilice células que expresen la presente proteína, el ligando diana puede obtenerse mediante la medición de la interacción entre la presente proteína y una proteína de la familia MAGUK que utiliza la respuesta biológica como indicador. Cuando la interacción entre la presente proteína y una proteína de la familia MAGUK en la célula cuando la sustancia de prueba se pone en contacto con la proteína cambia (se estimula o tiene lugar) en

comparación con el caso en que no se produce contacto, puede determinarse que la sustancia de prueba es un ligando o incluye un ligando. La interacción entre la presente proteína y una proteína de la familia MAGUK puede detectarse mediante un procedimiento conocido como inmunoelectrotransferencia.

5 Como sustancia de prueba que puede ser un objeto para identificar un ligando, es posible mencionar, por ejemplo, una muestra preparada a partir de una célula o un tejido donde fue observada la expresión del ADN utilizado en la presente invención. Alternativamente, diversos compuestos derivados de productos naturales o sintetizados pueden considerarse como objeto.

10 Este tipo de procedimiento de identificación es útil para determinar si un ligando está incluido o no en una muestra. El procedimiento de identificación también puede utilizarse de forma efectiva en un proceso para la purificación del ligando de una muestra determinada para contener el ligando. Por ejemplo, al fraccionar y purificar una muestra mediante cromatografía de filtración en gel o similar, es posible determinar si un ligando está incluido o no en el producto de la fracción.

15 (Ligando)

En la presente invención se descubrió, mediante el procedimiento de identificación descrito anteriormente, que CCK-8S (SEC ID nº 14) actúa como ligando del receptor de la proteína de membrana de la presente invención. De forma más específica, se observó un aumento de la concentración intracelular de calcio mediante la acción de CCK-8S (SEC ID nº 14) en la línea celular HA-ph01207#10-6 descrita anteriormente que expresaba de forma estable el ADN de la presente invención (véase el ejemplo 5). El grado de aumento de concentración intracelular de calcio en la línea celular provocado por 1 nM de CCK-8S (SEC ID nº 14) fue aproximadamente el mismo que el causado por el ionóforo de calcio A23187 como control positivo. En las células de la línea celular CHO-K1 que no expresaron el ADN de la presente invención, no se observó este tipo de aumento en la concentración intracelular de calcio causado por CCK-8S (SEC ID nº 14). Entretanto, la línea celular HA-ph01207#10-6 no reaccionó a un péptido (forma no sulfatada de CCK-8, en adelante denominada "CCK-8NS") en el que el séptimo residuo de tirosina del extremo C no estaba sulfatado aunque el péptido era un octapéptido CCK constituido por la misma secuencia de aminoácidos que CCK-8S (SEC ID nº 14). Además, la línea celular HA-ph01207#10-6 no reaccionó a un tetrapéptido (CCK-4) constituido por los residuos de aminoácidos hasta el cuarto residuo a partir del extremo C de CCK-8S (SEC ID nº 14). De forma más específica, no se observó un aumento en la concentración intracelular de calcio provocada por 1 nM de CCK-8NS o 1 nM de CCK-4. De esta forma se aclaró que la línea celular HA-ph01207#10-6 reacciona específicamente a CCK-8S (SEC ID nº 14) y funciona como receptor de la proteína de membrana. Además, puesto que la línea celular HA-ph01207#10-6 reaccionó a CCK-8S (SEC ID nº 14) pero no a CCK-8NS, se consideró que el hecho de que el séptimo residuo de tirosina del extremo C de la secuencia de aminoácidos de CCK-8S (SEC ID nº 14) esté sulfatado es importante para la acción del ligando de CCK-8S (SEC ID nº 14).

De esta forma, puesto que la baja concentración de 1 nM de CCK-8S (SEC ID nº 14) indujo una respuesta biológica de la línea celular HA-ph01207#10-6, se consideró que la CCK-8S (SEC ID nº 14) in vivo induce realmente una respuesta biológica de las células a través de la proteína codificada por el ADN utilizado en la presente invención. Es decir, se consideró que CCK-8S (SEC ID nº 14) es uno de los ligandos in vivo del receptor funcional de proteína de membrana utilizado en la presente invención del que se predijo que era un GPCR. Además, el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mostró una respuesta biológica (respuesta de ligando) incluyendo un cambio en el potencial de membrana en un oocito de *Xenopus laevis* cuando se utilizó sobrenadante del cultivo celular HeLa como fuente del ligando.

Además de CCK-8S (SEC ID nº 14), un péptido que comprenda una secuencia de aminoácidos con una sustitución de un aminoácido homólogo en la secuencia de aminoácidos de CCK-8S (SEC ID nº 14) y con una función equivalente a CCK-8S también puede utilizarse como ligando del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención. La expresión "función equivalente a CCK-8S" se refiere a una función que induce una función biológica del receptor de proteína de membrana de la presente invención, a saber, a una función que induce una respuesta biológica como un aumento de la concentración intracelular de calcio o un cambio en el potencial de membrana en una célula que expresa el receptor de la proteína de membrana utilizable en la presente invención. Puesto que el hecho de que el séptimo residuo de tirosina del extremo C de CCK-8S (SEC ID nº 14) esté sulfatado se considera importante para la acción del ligando de CCK-8S (SEC ID nº 14), el residuo sulfatado de tirosina se retiene en el ligando del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención. Una proteína con la sustitución puede ser una proteína producida de forma natural mediante, por ejemplo, una mutación o una modificación postraduccional, o puede ser una proteína obtenida mediante la introducción de una sustitución basada en un gen que existe en la naturaleza. Las técnicas para introducir una sustitución son conocidas, y pueden utilizarse los procedimientos descritos anteriormente. Desde el punto de vista que consiste en no alterar las propiedades fundamentales (propiedades físicas, funciones, actividad fisiológica, actividad inmunológica o similares) de la proteína en cuestión, se puede suponer fácilmente la sustitución mutua entre aminoácidos homólogos (aminoácidos polares, aminoácidos no polares, aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos hidrofílicos, aminoácidos cargados positivamente, aminoácidos cargados negativamente y aminoácidos aromáticos y similares). Además, la CCK-8S (SEC ID nº 14), o los péptidos que incluyen un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una sustitución de un aminoácido con un aminoácido homólogo en la secuencia de aminoácidos de CCK-8S (SEC

ID nº 14) y con una función que induce un aumento de la concentración intracelular de calcio o un cambio en un potencial celular de membrana en una célula que exprese el ADN indicado anteriormente se incluyen en el ámbito del ligando del receptor de la proteína de membrana de la presente invención. En este tipo de péptido, se retiene el residuo sulfatado de tirosina que está presente en la séptima posición del extremo C de CCK-8S.

Se han documentado dos tipos de GPCR como receptores CCK, el receptor CCK-A (también denominado "receptor CCK1") y el receptor CCK-B (también denominado "receptor CCK2"), (Herranz, R., *Medicinal Research Reviews*, 2003, vol. 23, nº 5, págs. 559-605, Review). Ambos son GPCR pertenecientes a la clase A (tipo rodopsina). En receptor CCK-A se expresa con fuerza principalmente en los órganos digestivos, y se observa su expresión en una parte del cerebro. La afinidad de ligandos del receptor CCK-A es fuerte en el orden de CCK-8S >> CCK-8NS, gastrina > CCK-4. Aunque el receptor CCK-A reacciona con fuerza a CCK-8S (SEC ID nº 14), no se observa especificidad del receptor CCK-A hacia el ligando. El receptor CCK-B se expresa ampliamente en el cerebro y en los órganos digestivos. La afinidad de ligandos del receptor CCK-B es fuerte en el orden de CCK-8S ≥ CCK-8NS, gastrina > CCK-4, lo que indica que presenta menor selectividad que el receptor CCK-A.

Se cree que el receptor de proteína de membrana de la presente invención, que presenta una distribución alta de la expresión específicamente en el cerebro en comparación con el receptor CCK-A que presenta una expresión baja en el cerebro, participa principalmente en la acción del CCK en el sistema nervioso central. Además, debido a que presenta una afinidad de ligandos distinta que la del receptor CCK-B para el que la expresión cerebral es elevada, existe una posibilidad de que el receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención muestre una actividad distinta hacia el receptor CCK-B en el cerebro. Se considera por tanto que el receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención participa como receptor CCK en funciones fisiológicas como la analgesia, la sedación, la supresión de la ingestión, la memoria y el aprendizaje, donde la implicación de CCK ya se ha postulado. Además, se ha documentado que CCK muestra diversas acciones en los órganos digestivos, y también se considera que es una sustancia de señalización que proporciona sensación de saciedad a las neuronas cerebrales. Se considera por lo tanto que CCK-8S, un elemento de la familia CCK, también actúa como sustancia de señalización que proporciona una sensación de saciedad a las neuronas cerebrales. Se considera que una disminución cuantitativa y funcional de CCK-8S provoca obesidad debido a una disminución de la sensación de saciedad. Se cree que el receptor de la proteína de membrana de la presente invención participa en este tipo de obesidad como receptor CCK. Además, se ha documentado que, cuando CCK-8S se administra a pacientes de diabetes, se estimula un aumento en las cantidades de insulina y se suprime el aumento de la cantidad de glucosa poscibal (Bo, A. et al., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2000, vol. 85, págs. 1043-1048). Existe por tanto la posibilidad de que el receptor funcional de la proteína de membrana utilizado en la presente invención esté relacionado con la diabetes. Así, un agonista o antagonista del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención puede aliviar una enfermedad o los síntomas que acompañen los problemas en este tipo de función fisiológica. Más específicamente, un agonista o antagonista del receptor de proteína de membrana de la presente invención puede utilizarse como principio activo de un fármaco contra la ansiedad, una preparación analgésica o un agente preventivo y/o terapéutico para una enfermedad provocada por diversos tipos de anomalías del sistema nervioso central. Los ejemplos específicos de este tipo de enfermedades comprenden la demencia, la enfermedad de Parkinson, el síndrome del pánico, la drogodependencia, la obesidad, la diabetes y similares.

Puesto que uno de los ligandos para el receptor de proteína de membrana de la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, CCK-8S (SEC ID nº 14), se considera que el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención participa en funciones neurológicas como la retención memorística, en la que se cree que participa CCK-8S (SEC ID nº 14). Una disminución en la cantidad y/o la función de CCK-8S (SEC ID nº 14) o la desaparición de la misma provoca la aparición de síntomas patológicos como dificultad en el uso de la memoria al nivel consciente y su traducción en acciones. Las enfermedades o los síntomas que acompañan a este tipo de problemas en la función memorística pueden aliviarse mediante un agonista del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención. Los ejemplos de este tipo de enfermedad comprenden las enfermedades acompañadas por problemas en la función neurológica como la memoria, y como ejemplos específicos es posible mencionar la demencia, la enfermedad de Alzheimer y similares.

(Procedimiento para identificar el compuesto)

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un agonista del receptor de la proteína de membrana de la presente invención. Como procedimiento de identificación de un agonista del receptor de la proteína de membrana de la presente invención es posible mencionar un método, por ejemplo, que comprende, en un sistema de pruebas que utiliza un transformante que expresaba la presente proteína, la medición de un cambio en las funciones generadas en el transformante después de ponerse en contacto con el transformante y un compuesto que se vaya a examinar (en adelante denominado "compuesto de prueba"), o en presencia del compuesto de prueba. Mediante la detección de un cambio, como la reducción, el aumento, la desaparición, o la aparición, en una función del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención en comparación con el resultado de la medida obtenido en ausencia del compuesto de prueba, es posible seleccionar un agonista del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención. Más preferentemente, se puede seleccionar un agonista mediante la medición de un cambio funcional en el receptor de la proteína de

membrana de la presente invención provocado por un ligando del receptor de la proteína de membrana, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14), y la comparación del cambio funcional. Preferentemente, el agonista es un compuesto que provoca un cambio funcional en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención que es equivalente a un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana mediante un ligando, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14). Es suficiente que un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mediante un agonista sea equivalente a un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana de la presente invención mediante un ligando, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14), y es posible que exista una diferencia cuantitativa. Es suficiente que un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mediante un agonista sea equivalente a un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana de la presente invención mediante un ligando, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14). Preferentemente, se selecciona un agonista que induce un cambio funcional igual. El cambio funcional del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención puede medirse mediante la utilización de un cambio en la respuesta biológica mediante el receptor de proteína de membrana de un transformante como indicador. Por lo tanto, como cambio funcional que es equivalente con un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mediante un ligando, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14), es posible mencionar, por ejemplo, un aumento en la concentración intracelular de calcio mediante el receptor de proteína de membrana en un transformante. La medición de un cambio en la concentración intracelular de calcio puede efectuarse utilizando un procedimiento conocido (véase el ejemplo 5). Además, como cambio funcional que es equivalente con un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mediante un ligando, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14), es posible mencionar, por ejemplo, un cambio en el potencial de membrana mediante el receptor de proteína de membrana en un transformante. La medición de un cambio en el potencial de membrana puede efectuarse utilizando un procedimiento conocido (véase el ejemplo 3). Con respecto al ligando, es posible utilizar tanto una muestra que incluya el ligando o el propio ligando que se obtuvo mediante el procedimiento de identificación de ligandos descrito anteriormente. Puesto que se considera que CCK-8S (SEC ID nº 14) es un ligando *in vivo* de la presente proteína, resulta preferido el uso de CCK-8S (SEC ID nº 14) como ligando. La CCK-8S (SEC ID nº 14) se puede producir mediante un procedimiento ordinario de síntesis química. También puede sintetizarse usando un aparato de síntesis de péptidos comercializado.

El procedimiento de identificación de un agonista del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención también puede efectuarse determinando si un compuesto obtenido mediante un procedimiento para identificar un compuesto que se une con el receptor de proteína de membrana de la presente invención induce o no un cambio funcional en el receptor de proteína de membrana de la presente invención utilizando el procedimiento de identificación descrito anteriormente.

Un procedimiento para identificar un compuesto que se une con el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención puede llevarse a cabo según un procedimiento en el que la proteína utilizada en la presente invención y un ligando de la proteína se someten a reacción en presencia y en ausencia de un compuesto de prueba para medir la unión entre la proteína y el ligando. Una proteína utilizada en el presente procedimiento de identificación puede ser una proteína que se expresó en la membrana celular de una célula que contiene ADN que codifica la presente proteína. La célula puede ser un transformante obtenido mediante transfección con un vector que contiene ADN que codifica la presente proteína. En el presente procedimiento de identificación, un compuesto que inhibe la unión entre la presente proteína y el ligando puede ser un compuesto que se une con la presente proteína o un compuesto que se une con el ligando. La medición de la unión entre la presente proteína y un ligando de la proteína puede efectuarse utilizando diversos tipos de ensayos de unión usados en un sistema farmacéutico ordinario de búsqueda. Por ejemplo, la medición de la unión puede efectuarse mediante la realización de una reacción de unión entre el ligando y la presente proteína, y ensayando después el ligando que se une a la presente proteína usando un anticuerpo antiligando. El anticuerpo antiligando que se une al ligando puede detectarse usando un anticuerpo secundario etiquetado con HRP o biotina o similares. El ligando que se une a la presente proteína también puede detectarse usando un anticuerpo antiligando etiquetado previamente con HRP o biotina o similares. Alternativamente, el ligando que se une a la presente proteína puede ensayarse mediante la realización del procedimiento de identificación descrito anteriormente usando un ligando que se etiquetó previamente con la sustancia de etiquetado deseada como ligando para su uso en la reacción de unión con la presente proteína, y la posterior detección de la sustancia de etiquetado. Cualquier sustancia que se use en un ensayo de unión ordinario se puede utilizar como la sustancia de etiquetado. Como procedimiento simple y adecuado, es posible utilizar un isótopo radioactivo. Mediante la determinación de la acción de un compuesto obtenido mediante este tipo de procedimiento de identificación con respecto a la respuesta biológica de un transformante como se describe anteriormente, es posible determinar si el compuesto induce o no un cambio funcional en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención. Si un cambio funcional en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención producido por el compuesto es equivalente con un cambio funcional producido en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mediante un ligando, por ejemplo, CCK-8S (SEC ID nº 14), puede determinarse que el compuesto es un agonista que se une al receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención e induce una respuesta biológica mediante el receptor de proteína de membrana. En contraste, cuando un cambio funcional en el receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención no es producido por el compuesto, puede determinarse que el compuesto es un antagonista que se une al receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención pero que no induce una respuesta

biológica mediante el receptor de proteína de membrana, o es un compuesto que actúa en un ligando para inhibir la unión entre el ligando y el receptor de la proteína de membrana.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula la función de una proteína según la presente invención. El procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula la función de la presente proteína puede efectuarse utilizando un sistema farmacéutico de búsqueda conocido usando por lo menos un elemento seleccionado del grupo constituido por la presente proteína, ADN, vector recombinante, transformante, o anticuerpo. Según el presente procedimiento de identificación, es posible efectuar la búsqueda de un antagonista mediante el diseño de fármacos basado en la conformación de la proteína, la búsqueda de un inhibidor o promotor de la expresión al nivel génico utilizando un sistema de síntesis de proteínas, o la búsqueda de una sustancia de reconocimiento de anticuerpos utilizando el anticuerpo.

La identificación de un compuesto que inhibe o estimula una función de una proteína utilizada en la presente invención puede efectuarse, por ejemplo, permitiendo a la proteína y al compuesto de prueba que coexistan en un sistema de prueba que puede medir la función de la presente proteína en condiciones que permiten la interacción entre la proteína y el compuesto de prueba, midiendo las funciones de los mismos, y detectando a continuación un cambio, como la disminución, el aumento, la desaparición o la aparición, en las funciones de la proteína en comparación con el resultado de medición obtenido en ausencia del compuesto de prueba. Puesto que la proteína en cuestión es un receptor de la proteína de membrana, como ejemplos de una función de la proteína es posible mencionar la unión con un ligando, la activación de un mecanismo intracelular de transducción de señales, y la inducción de la respuesta celular. Otros ejemplos específicos incluyen la unión con CCK-8S (SEC ID nº 14) o la interacción con una proteína de la familia MAGUK y similares. Una función de la proteína también puede medirse utilizando una respuesta biológica de una célula que expresa la proteína, por ejemplo, un cambio en el potencial de la membrana celular o un cambio en la concentración intracelular de calcio, como indicador. La medición de una función de la proteína también puede efectuarse mediante la detección directa de la función, o puede efectuarse, por ejemplo, mediante la introducción de una señal como indicador de la función en un sistema de prueba y la detección de la señal. Como señal, es posible utilizar un péptido de etiqueta como GST, His-tag, Myc-tag, HA-tag, FLAG-tag o Xpress-tag, o una sustancia fluorescente o similares, y puede utilizarse cualquier sustancia de etiquetado siempre que sea una sustancia que sea utilizada en un procedimiento ordinario para identificar un compuesto.

El efecto ejercido en una función de una proteína utilizada en la presente invención mediante el compuesto de prueba puede determinarse mediante la comparación de la función de la presente proteína en un caso en el que se permitió que coexistiera con el compuesto de prueba y la función de la presente proteína en un caso en el que no se permitió que coexistiera con el compuesto de prueba. Cuando la función de la presente proteína en el caso en el que se le permite coexistir con el compuesto de prueba disminuye en comparación con la función de la presente proteína en el caso en el que no se le permite coexistir con el compuesto de prueba, puede determinarse que el compuesto de prueba tiene una acción que inhibe la función de la presente proteína. En contraste, cuando la función de la presente proteína en el caso en el que se le permite coexistir con el compuesto de prueba aumenta en comparación con la función de la presente proteína en el caso en el que no se le permite coexistir con el compuesto de prueba, puede determinarse que el compuesto de prueba tiene una acción que estimula o estabiliza la función de la presente proteína.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un compuesto que estimula o inhibe la unión entre una proteína según la presente invención y un ligando de la proteína. El procedimiento de identificación puede efectuarse según un procedimiento en el que la proteína de la presente invención y un ligando de la proteína reaccionan en presencia y ausencia de un compuesto de prueba para medir la unión entre la proteína y el ligando. Otros ejemplos de procedimiento de identificación incluyen un procedimiento que mide la unión entre la proteína y el ligando de manera similar usando una célula que expresa la presente proteína o un transformante que expresó la proteína, en el lugar de la presente proteína. Según este tipo de procedimiento de identificación, es posible identificar un compuesto que inhibe la unión entre la presente proteína y un ligando de la proteína o un compuesto que estimula la unión. Un compuesto que inhibe la unión entre la presente proteína y el ligando puede ser un compuesto que se une con la presente proteína o un compuesto que se une con el ligando. Puesto que la presente proteína es un receptor de membrana de la proteína, un compuesto que inhibe la unión entre la presente proteína y el ligando de la proteína puede ser un compuesto que inhibe una función del receptor de proteína de membrana o un compuesto que estimula dicha función. Puede determinarse si el compuesto es un compuesto que inhibe una función del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención o un compuesto que estimula dicha función mediante la medición de un cambio en la función del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención causado por un ligando en presencia y ausencia del compuesto. Un compuesto que estimula la unión entre la presente proteína y el ligando puede ser un compuesto que estimula una función del receptor de la proteína de membrana utilizado en la presente invención. Es posible determinar que el compuesto es un compuesto que estimula una función del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención mediante la medición de un cambio en la función del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención causado por un ligando en la presencia y ausencia del compuesto.

Como procedimiento para medir una función de una proteína utilizada en la presente invención, es posible mencionar un procedimiento experimental que utiliza un transformante que expresaba la presente proteína que

comprende el permitir que un ligando actúe con respecto a la proteína tras ponerse en contacto con el transformante y un compuesto de prueba, o en presencia del transformante y el compuesto de prueba, y midiendo a continuación un cambio en una respuesta biológica producida en el transformante. Este tipo de procedimiento de medición puede utilizarse para efectuar un procedimiento de identificación de un compuesto que estimula o inhibe una función de la presente proteína. Como ligando al que se permite actuar en la proteína, puede utilizarse una muestra que incluye el ligando o el propio ligando que se obtuvo según el procedimiento de identificación de un ligando mencionado anteriormente. Puesto que se considera que CCK-8S (SEC ID nº 14) es un ligando *in vivo* de la presente proteína, resulta preferida la utilización de CCK-8S (SEC ID nº 14) como ligando. Mediante la detección de un cambio, como una disminución, un aumento, una desaparición, o una aparición, en la función en comparación con un resultado de medición obtenido en ausencia del compuesto de prueba, es posible seleccionar un compuesto que inhibe o estimula la función de la presente proteína. Entre los ejemplos de un cambio en una respuesta biológica producida en un transformante que expresaba la presente proteína se incluye un cambio en el potencial de la membrana celular o un cambio en la concentración intracelular de calcio y similares. Cuando un cambio en el potencial de la membrana celular del transformante es amplificado por un compuesto o un cambio como un aumento de la concentración intracelular de calcio fue producido por el compuesto, puede determinarse que el compuesto estimula la función de la presente proteína. Al contrario, cuando un cambio en el potencial de la membrana celular del transformante es reducido por un compuesto o un cambio como una disminución de la concentración intracelular de calcio fue inducido por el compuesto, puede determinarse que el compuesto inhibe la función de la presente proteína. La medición de un cambio en el potencial de la membrana celular o de un cambio en la concentración intracelular de calcio puede efectuarse utilizando un procedimiento conocido. Además, la medición de una función de la presente proteína puede efectuarse mediante la medición de la interacción con una proteína de la familia MAGUK. La medición de un cambio en la interacción con una proteína de la familia MAGUK o la medición de un cambio en la unión con una proteína G puede efectuarse utilizando un procedimiento conocido.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un compuesto que puede afectar a la interacción entre una proteína utilizada en la presente invención y una proteína de la familia MAGUK. La interacción entre la presente proteína y una proteína de la familia MAGUK puede medirse, por ejemplo, mediante la expresión de la presente proteína según una técnica de ingeniería genética y la posterior detección de la unión de la misma con una proteína de la familia MAGUK. Más específicamente, una proteína de la familia MAGUK se expresa, por ejemplo, como una proteína de fusión GST-tag según una técnica de ingeniería genética, y después se une a glutatión-sefarosa, después de lo cual la cantidad de la presente proteína que se une a ella puede cuantificarse usando un anticuerpo contra la presente proteína, por ejemplo, un anticuerpo que se etiquetó con una enzima como HRP o ALP, un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente o biotina o similares. Cuando la presente proteína se fusiona con un péptido de etiqueta y se usa, la cantidad de unión puede determinarse usando un anticuerpo anti-etiqueta. De forma natural, la presente proteína también puede etiquetarse directamente con la enzima, el isótopo radioactivo, la sustancia fluorescente, o la biotina o similares descritos anteriormente. Alternativamente, es posible utilizar un anticuerpo secundario que etiquetado con la enzima, el isótopo radioactivo, la sustancia fluorescente, o la biotina o similares descritos anteriormente. Como posible alternativa, el ADN que codifica la presente proteína y el ADN que codifica una proteína de la familia MAGUK pueden coexpresarse usando una célula adecuada, donde la interacción de las dos sustancias puede medirse mediante la detección de la unión entre las dos sustancias usando un procedimiento de purificación por afinidad (pulldown).

Un procedimiento de identificación de un compuesto que afecta la interacción entre una proteína utilizada en la presente invención y una proteína de la familia MAGUK también puede efectuarse, por ejemplo, utilizando un procedimiento de dos híbridos para introducir en una célula eucariótica o levadura o similares un plásmido que exprese la presente proteína y una proteína de unión al ADN como proteína de fusión, un plásmido que exprese una proteína de la familia MAGUK y una proteína de activación de la transcripción como proteína de fusión, y un plásmido que contenga un gen indicador como lacZ conectado a un gen promotor adecuado, y comparando la cantidad de expresión del gen indicador cuando se le permite coexistir con el compuesto de prueba y la cantidad de expresión del gen indicador en ausencia del compuesto de prueba. Cuando la cantidad de expresión del gen indicador cuando se le permite coexistir con el compuesto de prueba ha disminuido en comparación con la cantidad de expresión del gen indicador en ausencia del compuesto de prueba, puede determinarse que el compuesto de prueba tiene una acción que inhibe la unión entre la presente proteína y la proteína de la familia MAGUK. En contraste, cuando la cantidad de expresión del gen indicador cuando se le permite coexistir con el compuesto de prueba ha aumentado en comparación con la cantidad de expresión del gen indicador en ausencia del compuesto de prueba, puede determinarse que el compuesto de prueba tiene una acción que estabiliza la unión entre la presente proteína y la proteína de la familia MAGUK.

La identificación de un compuesto que afecta la interacción entre una proteína utilizada en la presente invención y una proteína de la familia MAGUK también puede efectuarse usando un sensor de resonancia de plasmón de superficie como el sistema BIACORE.

Además, la identificación de un compuesto que afecta la interacción entre una proteína utilizada en la presente invención y una proteína de la familia MAGUK puede efectuarse usando un procedimiento que aplica un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) o una transferencia de energía de fluorescencia de resonancia (FRET).

Los ejemplos específicos de una proteína de la familia MAGUK usados en el procedimiento de identificación según la presente invención comprenden DLG2, DLG3 y DLG4, o AIP1 y MAGI3. Siempre que no resulte afectada la interacción con la proteína de la presente invención, la proteína de la familia MAGUK puede ser una en la que se eliminó uno de sus segmentos o puede ser una a la que se le añadió una sustancia de etiquetado como otra proteína.

Se describe en la presente memoria un procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula la expresión de un ADN utilizado en la presente invención. El procedimiento de identificación puede efectuarse permitiendo que el ADN y el compuesto de prueba coexistan en un sistema de prueba en el que es posible medir la expresión del ADN, midiendo la expresión, y detectando después un cambio, como la disminución, el aumento, la desaparición o la aparición, en la expresión en comparación con un resultado de medición obtenido en un caso en el que no se de coexistencia del compuesto de prueba. La medición de la expresión de la proteína puede efectuarse mediante la detección directa de una proteína codificada por el ADN, o puede efectuarse, por ejemplo, mediante la introducción de una señal como indicador de la expresión en un sistema de prueba y la detección de la señal. Como señal, es posible utilizar un péptido de etiqueta como GST, His-tag, Myc-tag, HA-tag, FLAG-tag o Xpress-tag, o una sustancia fluorescente o similar.

La identificación de un compuesto que afecta la expresión del ADN utilizado en la presente invención también puede efectuarse mediante, por ejemplo, la producción de un vector en el que un gen indicador se conecta en lugar del ADN en dirección 3' de una región de un promotor de un gen que incluye el presente ADN, el contacto de una célula, por ejemplo, una célula eucariota, que contenga el vector con el compuesto de prueba, y la determinación de la presencia o ausencia, o de una modificación, en la expresión del gen indicador. Un gen que suela utilizarse en un ensayo indicador puede utilizarse como gen indicador y es posible mencionar, por ejemplo, un gen con una actividad enzimática como la luciferasa, la β -galactosidasa o la cloranfenicol acetiltransferasa. La detección de la expresión del gen indicador puede efectuarse mediante la detección de la actividad del producto génico, por ejemplo, en el caso de los genes indicadores ejemplificados anteriormente, la actividad enzimática.

La identificación de un compuesto que afecta la expresión del ADN utilizado en la presente invención también puede efectuarse contactando un transformante utilizado en la presente invención y un compuesto de prueba en un sistema de prueba que expresa una proteína que utiliza el transformante, y midiendo después la proteína expresada. Un compuesto que inhibe o estimula la expresión del presente ADN puede seleccionarse mediante la detección de un cambio, como la disminución, el aumento, la desaparición o la aparición, en la expresión en comparación con un resultado de medición obtenido en ausencia del compuesto de prueba. La detección de la presencia o ausencia, o de un cambio, en la expresión de la proteína puede efectuarse de forma sencilla y adecuada utilizando como indicador una función biológica de la proteína que se va a expresar o una respuesta biológica de una célula a través de la proteína, por ejemplo, la interacción con una proteína de la familia MAGUK, un cambio en el potencial de la membrana celular, o un cambio en la concentración intracelular de calcio que se produce cuando se permite que un ligando actúe en ella.

(Compuesto)

Los compuestos identificados de la forma descrita anteriormente pueden utilizarse como agonistas del receptor de proteína de membrana utilizado en la presente invención. Además, los compuestos obtenidos mediante los procedimientos de identificación descritos anteriormente pueden utilizarse como inhibidores, antagonistas, promotores o estabilizadores o similares de una función de la proteína utilizada en la presente invención, por ejemplo, mediante la unión con un ligando, la activación de la transducción intracelular de señales, o la inducción de una respuesta celular. Además, los compuestos también puede utilizarse como inhibidores de expresión o promotores de expresión con respecto a la proteína anterior a nivel génico. Estos compuestos pueden prepararse como medicamentos mediante la realización de más exámenes que consideren el equilibrio entre toxicidad y utilidad biológica. Además, puede anticiparse que estos compuestos producirán un efecto preventivo y/o un efecto terapéutico para diversos tipos de síntomas patológicos atribuibles a una anomalía en una función de la presente proteína y/o la expresión del ADN que codifica la proteína.

(Composición farmacéutica)

La proteína, el ADN, el vector recombinante, el transformante, el anticuerpo, el ligando y el compuesto utilizados en la presente invención son útiles como principios activos de un medicamento o composición farmacéutica que se basa en la inhibición, antagonización, o estimulación de una función y/o expresión de la presente proteína.

Se descubrió que la expresión de tejido del ADN que comprende la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 del listado de secuencias como una forma del ADN utilizado en la presente invención se encuentra específicamente elevado en todo el cerebro, por ejemplo, el polo temporal, el córtex motor, y las circunvoluciones orbitales. De acuerdo con esto, se consideró que la proteína utilizada en la presente invención, el ADN y la proteína son importantes para el mantenimiento homeostático del cerebro y de las células cerebrales. Además, la expresión de los mismos que se encuentra notablemente más elevada en comparación con el tejido normal ha sido observada en tumores como el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, y el cáncer adrenal. Se consideró por tanto que la

presente proteína, el ADN y la proteína participan en estas enfermedades tumorales.

Una proteína utilizada en la presente invención presenta un dominio TSP-I en la secuencia de aminoácidos de la misma. Puesto que se ha documentado que el dominio TSP-I es un dominio que es responsable de una función de inhibición de la angiogénesis, se consideró que la presente proteína presenta una función de inhibición de la angiogénesis. De acuerdo con esto, existe una posibilidad de que la presente proteína esté implicada en enfermedades causadas por una inhibición de la angiogénesis o enfermedades que se acompañen de inhibición de la angiogénesis. Una función o expresión de la presente proteína está preferentemente inhibida en enfermedades que pueden tratarse mediante la estimulación de la angiogénesis. Entre los ejemplos de estas enfermedades se incluye la contusión cerebral y el infarto cerebral. En este caso, la mejora, prevención y/o tratamiento de la enfermedad pueden efectuarse mediante un compuesto que presenta una función que reduce o elimina una función y/o expresión de la presente proteína.

En contraste, existe una posibilidad de que una disminución en una función y/o expresión de la presente proteína esté asociada con enfermedades provocadas por la angiogénesis o enfermedades acompañadas por angiogénesis. Los ejemplos de estas enfermedades comprenden las enfermedades tumorales de las que es conocido que se acompañan de angiogénesis. En tal caso, la mejora, prevención, y/o tratamiento pueden efectuarse utilizando la presente proteína, el ADN o un compuesto que promueva una función de la proteína y/o expresión del ADN. Más específicamente, una composición farmacéutica que comprende una dosis efectiva de la presente proteína, el ADN o un compuesto que estimula una función de la proteína y/o expresión del ADN puede utilizarse como agente de mejora, agente preventivo, y/o agente terapéutico para una enfermedad causada por angiogénesis o una enfermedad que se acompañe de angiogénesis (por ejemplo, una enfermedad tumoral). Además, un procedimiento para prevenir y/o un procedimiento para tratar tal enfermedad puede efectuarse utilizando éstos.

Se ha informado de que la CCK-8S (SEC ID nº 14) que se descubrió como ligando del receptor funcional de membrana utilizado en la presente invención es esencial para la retención memorística, por ejemplo, que es difícil el uso de la memoria a un nivel consciente y su traducción en acciones en ausencia de CCK-8S (SEC ID nº 14). Se consideró, por tanto, que el receptor funcional de proteína de membrana utilizado en la presente invención participa en la función neurológica de CCK-8. Además, puesto que se informó de una relación entre el receptor CCK-B y la ansiedad, existe una posibilidad de que el receptor de funcional de proteína de membrana utilizado en la presente invención esté relacionado de forma similar con el trastorno de ansiedad. Por lo tanto, se consideró que un agonista del receptor funcional de la proteína de membrana de la presente invención y una composición farmacéutica que comprende una dosis efectiva del agonista, es efectiva para aliviar, mejorar, prevenir y/o tratar enfermedades o síntomas que acompañen problemas de funciones neurológicas como la memoria o los trastornos de ansiedad y similares. Los ejemplos específicos de enfermedades que se acompañan de problemas en las funciones neurológicas como la memoria comprenden la demencia (incluida la enfermedad de Alzheimer). Además, se ha informado de que el CCK muestra diversos tipos de acciones en los órganos digestivos, y también se considera que es una sustancia de señalización que proporciona una sensación de saciedad a las neuronas cerebrales. Por lo tanto, se consideró que el CCK-8S, elemento de la familia CCK, también actúa como sustancia de señalización que proporciona una sensación de saciedad en las neuronas cerebrales. Una disminución cuantitativa y funcional del CCK-8S se considera que provoca obesidad debido a una disminución de la sensación de saciedad. Además, se ha informado de que cuando CCK-8S se administra a pacientes de diabetes, se estimula un aumento en la cantidad de insulina y se suprime un aumento en la cantidad de glucosa poscibal (Bo, A. et al., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2000, vol. 85, págs. 1043-1048). Existe por tanto una posibilidad de que el receptor funcional de proteína de membrana utilizado en la presente invención esté relacionado con la diabetes. De acuerdo con esto, se consideró que un agonista del receptor funcional de la proteína de membrana utilizado en la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el agonista son efectivos en la mejora, prevención, y/o tratamiento de la diabetes o la obesidad. Más específicamente, un agonista del receptor funcional de la proteína de membrana utilizado en la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el agonista pueden ser usados como agentes de mejora, agentes de prevención y/o agentes terapéuticos para una enfermedad o síntomas que se acompañen de problemas en la función memorística (por ejemplo, la demencia [incluida la enfermedad de Alzheimer]), además de la diabetes y la obesidad. Además, un procedimiento para prevenir y/o un procedimiento para tratar tal enfermedad puede efectuarse utilizando éstos.

Según la presente invención, por ejemplo, mediante la utilización de la secuencia de bases de la totalidad o parte del ADN de la presente invención, es posible detectar específicamente la existencia o no existencia de una anomalía en un gen que incluye el ADN en tejido de varios tipos o individual, o detectar la existencia o no existencia de expresión del gen. Mediante la detección del ADN, es posible llevar a cabo el diagnóstico de susceptibilidad, aparición y/o pronóstico de una enfermedad atribuible al gen. La expresión "enfermedad atribuible al gen" se refiere a una enfermedad que es atribuible a una anomalía cuantitativa y/o a una anomalía funcional o similar del gen. Es conocido que la CCK-8S (SEC ID nº 14) que se descubrió como ligando del receptor de proteína de membrana de la presente invención participa en funciones neurológicas como la memoria. Por lo tanto, cuando una anomalía se produce en la transducción de señales de CCK-8S (SEC ID nº 14) que es causada por una anomalía en la función del receptor de proteína de membrana como el producto génico del gen utilizado en la presente invención debido a una anomalía cuantitativa y/o a una anomalía funcional en el gen, existe una posibilidad de que aparezca una enfermedad o los síntomas que acompañan a los problemas en una función

nerológica como la memoria. De esta forma, entre los ejemplos de una enfermedad atribuible al presente gen se incluyen enfermedades o síntomas que acompañan a problemas en una función neurológica como la memoria, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Además, la proteína utilizada en la presente invención presenta un dominio TSP-1 en la secuencia de aminoácidos de la misma. Puesto que se ha documentado que el dominio TSP-1 es un dominio que es responsable de una función de inhibición de la angiogénesis, es posible que la presente proteína esté implicada en una enfermedad atribuible a la inhibición de la angiogénesis o una enfermedad que acompañe la inhibición de la angiogénesis, o, de forma alternativa, una enfermedad atribuible a la angiogénesis o una enfermedad que se acompañe de angiogénesis. Los ejemplos de estos tipos de enfermedad comprenden las enfermedades tumorales como el tumor cerebral, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, y el cáncer adrenal, además de la contusión cerebral o el infarto cerebral.

El diagnóstico de una enfermedad mediante la detección génica puede efectuarse, por ejemplo con respecto a la muestra de ejemplo, mediante la detección de la presencia de ácidos nucleicos correspondientes al gen, la determinación de la cantidad existente de los mismos y/o la identificación de una mutación. Mediante la comparación con una muestra normal de control, es posible detectar una alteración en la existencia de ácidos nucleicos correspondientes al gen de interés y una alteración cuantitativa de los mismos. Además, mediante la comparación con un genotipo normal es posible detectar, por ejemplo, una delección e inserción mediante la medición de una alteración del tamaño con respecto a un producto de amplificación que se produjo mediante la amplificación de los ácidos nucleicos correspondientes al gen de interés mediante un procedimiento conocido. Además, puede identificarse una mutación puntual mediante la hibridación de ADN de amplificación con, por ejemplo, ADN utilizado en la presente invención que fue etiquetado. El diagnóstico descrito anteriormente puede efectuarse mediante la detección de una alteración o una mutación de esta forma. Es posible preparar una muestra de ácidos nucleicos según diversos procedimientos para facilitar la detección de una secuencia diana, por ejemplo, la desnaturalización, la digestión con enzima de restricción, la electroforesis, o la transferencia de puntos.

Un procedimiento de detección génica conocido puede utilizarse como procedimiento de detección, y entre los ejemplos del mismo se incluyen la hibridación de placas, la hibridación de colonias, la transferencia Southern, la transferencia Northern, el procedimiento NASBA y la RT-PCR. La medición a nivel celular utilizando RT-PCR *in situ* o hibridación *in situ* o similares también puede ser usada. Los procedimientos que pueden utilizarse para detectar el gen de la presente invención no se limitan a los procedimientos descritos anteriormente, y es posible utilizar cualquier procedimiento de detección génica.

Para este tipo de procedimiento de detección génica, un fragmento de ADN utilizado en la presente invención que presenta una propiedad como sonda o que presenta una propiedad como cebador es útil para efectuar la identificación del gen de interés o de un gen mutante del mismo, y/o la amplificación del mismo. La expresión "fragmento de ADN con una propiedad como sonda" se refiere a una sustancia que comprende una secuencia característica del ADN de la presente invención que puede hibridarse específicamente sólo al ADN. La expresión "sustancia con una propiedad como cebador" se refiere a una sustancia que comprende una secuencia característica del presente ADN que puede amplificar específicamente sólo el ADN. Además, al detectar un gen mutante que puede experimentar amplificación, una sonda o cebador con una secuencia de longitud predeterminada que incluye una ubicación con una mutación dentro del gen se produce y se utiliza. En general, la longitud de la secuencia de bases de la sonda o el cebador es preferentemente de 5 a 50 nucleótidos, más preferentemente de 10 a 35 nucleótidos, y más preferentemente de 15 a 30 nucleótidos. Aunque suele utilizarse como sonda una sonda etiquetada, la sonda podría no estar etiquetada, y podría detectarse de forma directa o indirecta mediante la unión específica con un ligando etiquetado. Se conocen diversos procedimientos para etiquetar una sonda y un ligando, y entre los ejemplos de los mismos se incluyen procedimientos que utilizan la traslación de mellas, el cebado aleatorio o el tratamiento de cinasa. Como sustancias adecuadas de etiquetado, es posible mencionar un isótopo radioactivo, la biotina, una sustancia fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, una enzima, un anticuerpo y similares.

La PCR resulta preferida como procedimiento de detección génica desde el punto de vista de la sensibilidad. El procedimiento de PCR no está particularmente limitado siempre que sea un procedimiento que utilice un fragmento de ADN que pueda amplificar específicamente el gen de interés como un cebador, por ejemplo, es posible mencionar un procedimiento conocido convencional como la RT-PCR, y se pueden aplicar diversos procedimientos modificados que son utilizados en la técnica.

Además de la detección de un gen, el ensayo del ADN del gen de interés y/o un gen mutante del mismo puede efectuarse mediante PCR. Como ejemplos de este tipo de procedimiento de análisis, es posible mencionar un ensayo competitivo que es similar a un procedimiento MSSA, o el PCR-SSCP que es conocido como un procedimiento de detección de mutación que utiliza variaciones en la movilidad acompañándose de cambios en la conformación del ADN monocatenario.

También es posible detectar específicamente, por ejemplo, la existencia o no existencia de una anomalía en una proteína según la presente invención y una función de la misma en un individuo o en varios tipos de tejido mediante la utilización de la proteína. Mediante la detección de una anomalía en la presente proteína o una función de la misma, es posible llevar a cabo el diagnóstico de susceptibilidad, aparición y/o pronóstico de una enfermedad atribuible al gen.

El diagnóstico de una enfermedad mediante la detección de una proteína puede efectuarse, por ejemplo con respecto a la muestra de ejemplo, mediante la detección de la presencia de la proteína, la determinación de la cantidad existente de la misma, y/o la detección de una mutación. Más específicamente, la presente proteína y/o un mutante de la misma se encuentran determinados de forma cuantitativa o cualitativa. Mediante la comparación con una muestra normal de control, es posible detectar una alteración en la existencia de la proteína de interés y una alteración cuantitativa de los mismos. En una comparación con una proteína normal, por ejemplo, una mutación de la misma puede detectarse mediante la determinación de la secuencia de aminoácidos. El diagnóstico descrito anteriormente puede efectuarse mediante la detección de este tipo de alteración o mutación. La muestra ejemplificativa no se encuentra particularmente limitada siempre que incluya la proteína de interés y/o un mutante de la misma. Por ejemplo, la muestra de prueba puede ser una muestra biológica derivada de un organismo vivo como sangre, suero, orina, tejido de biopsia o similares.

La determinación de la proteína utilizada en la presente invención y la proteína con una mutación puede efectuarse mediante el uso de la presente proteína, por ejemplo, la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2 del listado de secuencias, o una secuencia de aminoácidos con una delección, sustitución, inserción o adición de entre uno o varios hasta múltiples aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína, fragmentos de éstos, o un anticuerpo contra la proteína o un fragmento de la misma.

La determinación cuantitativa o cualitativa de la proteína puede efectuarse usando un procedimiento de ensayo o un procedimiento de detección de proteínas según una técnica habitual en el campo de la técnica. Por ejemplo, una proteína mutante puede detectarse mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, y más preferentemente, una variación en la secuencia de la proteína de interés o la existencia o no existencia de la proteína de interés puede detectarse usando un anticuerpo (un anticuerpo policlonal o monoclonal).

Más específicamente, la detección indicada anteriormente puede efectuarse para una muestra de prueba mediante la realización de un inmunoprecipitado usando un anticuerpo específico contra la proteína de interés, y efectuando el análisis de la proteína de interés mediante transferencia Western o inmunotransferencia. Además, la proteína de interés puede detectarse en una sección de tejido congelado o de parafina mediante un anticuerpo contra la proteína de interés usando una técnica inmunohistoquímica.

Como ejemplos específicos preferidos de un procedimiento que detecta la proteína de interés o un mutante de la misma, es posible mencionar el ensayo de inmunoenzimas (IEMA), el ensayo inmunoradiométrico (IRMA), el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA) incluido un procedimiento sándwich que utiliza un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo policlonal. Además, también es posible utilizar un radioinmunoensayo o un ensayo competitivo de unión y similares.

La proteína, ADN, vector recombinante, transformante y anticuerpo utilizados en la presente invención pueden ser utilizados por sí mismos como reactivos o similares. Por ejemplo, cada uno de ellos puede ser utilizado como reactivo para su uso en el procedimiento de identificación de un compuesto según la presente invención. El reactivo es útil, por ejemplo, para dilucidar una vía celular de transducción de señales en la que la presente proteína o el ADN participa, y para la investigación fundamental relativa a enfermedades y similares atribuibles a una anomalía en la proteína y/o el ADN.

Cuando éstos son reactivos, pueden incluir una sustancia como una solución tampón, una sal, un estabilizador y/o un agente antiséptico. A este respecto, es posible introducir unos medios conocidos de formulación según las propiedades respectivas en el momento de la formulación.

La presente invención se describe específicamente a partir de los ejemplos siguientes no limitativos de la misma.

Ejemplo 1

(Construcción de una genoteca de ADNc derivado de cerebro humano y aislamiento del gen)

Se construyó una genoteca de ADNc según un procedimiento ordinario utilizando ARN polyA⁺ comercializado derivado de cerebro humano, cerebro fetal e hipocampo cerebral (Clontech Inc.: nº de catálogo 6516-1, 6525-1, y 6578-1) como material de partida, y las secuencias de bases de los clones de ADNc fueron determinadas después del aislamiento de los fragmentos de ADNc mediante análisis dbEST. Más específicamente, según el procedimiento de Ohara et al. (Ohara, O. et al., *DNA Research*, 1997, vol. 4, págs. 53-59), se seleccionaron al azar unos 50.000 recombinantes de la genoteca de ADNc derivada de cerebro humano que se preparó como se describe anteriormente, y las secuencias de bases en el extremo 5' y el extremo 3' se determinaron para ADNc de unos 30.000 clones entre éstos. Además, unos 1.100 clones se seleccionaron principalmente mediante un experimento *in vitro* de traducción de la transcripción, y las secuencias de bases del ADNc de éstos se determinaron según el procedimiento de Ohara et al. Para los clones de ADNc cuya secuencia de bases completa se determinó, el ORF se predijo mediante un procedimiento de análisis genérico usando un programa de ordenador para obtener un clon de ADNc con un dominio de transmembrana de siete dominios en esta región.

El clon de ADNc identificado ph01207 es un ADN (SEC ID nº 1) con una nueva secuencia de bases con una longitud total de 4557 pb incluido un ORF que comprende 1518 residuos de aminoácidos con un segmento (20 residuos de aminoácidos del extremo N) que se predice que es una secuencia de señal. Sobre la base de una búsqueda de homología, se considera que ph01207 es una variante de corte y empalme con una región eliminada que codifica 55 residuos de aminoácidos en la región del extremo N en la secuencia de hBAI2 (número de registro del GenBank AB005298), y también con una adición de un residuo de aminoácidos en una región en el lado del extremo C (lisina en la posición 1406 en la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2) (figura 1).

Como características estructurales de la proteína codificada por ph01207, se descubrió que además de tres dominios TSP-I, la proteína presenta un dominio GPS y un dominio 2 de la familia GPCR (dominio de transmembrana de siete dominios).

Mientras, se considera que la proteína codificada por hBAI2 tiene un dominio GPS y un dominio de la familia -2 del GPCR, además de cuatro dominios TSP-I. Así se aclaró que 55 residuos de aminoácidos correspondientes a una región que incluye un dominio TSP-I en el lado de la región del extremo N de hBAI2 se borran en la proteína codificada por ph01207.

Además, en el análisis del tejido en el que se expresó el gen ph01207, se observó universalmente una expresión específicamente elevada del gen en el tejido de cerebro normal (por ejemplo, en el polo temporal, el córtex motor, las circunvoluciones orbitales y similares). Además, se observó mejora de la expresión en cáncer de ovario, cáncer de hígado, y cáncer adrenal en comparación con el tejido normal respectivo.

Ejemplo 2

(Producción de la línea celular de expresión ph01207 y expresión del ADN en la línea celular)

Usando el clon ph01207 que se identificó en el ejemplo 1, la proteína codificada por ph03207 se expresó como proteína de fusión epítipo-tag del extremo N.

En primer lugar, se construyó un vector de expresión con el gen ph01207. Usando el clon ph01207 identificado en el ejemplo 1, el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos que excluye un segmento del que se predice que es una secuencia de señal (20 residuos de aminoácido del extremo N) se clonó en pDONR201 mediante PCR y tratamiento de enzima de restricción para construir un vector de entrada ph01207. Se llevó a cabo la PCR usando oligonucleótidos que comprenden las secuencias de bases representadas por las secuencias SEC ID nº 4 a 11 en el listado de secuencias, respectivamente, como cebadores, y usando la polimerasa ADN turbo Pfu (Stratagene) como polimerasa.

Dos tipos de vector, p3xFLAG-CMV9-attR y T8HA-attR/pCINeo, se prepararon como vectores de expresión de tipo fusión epítipo-tag de extremo N. El p3xFLAG-CMV9-attR es un vector obtenido haciendo p3xFLAG-CMV9 (Sigma Inc.) compatible con el que utiliza el Gateway Vector Conversion System (Invitrogen Corp.). El T8HA-attR/pCINeo se construyó usando pCINeo (Promega Corp.), oligos sintéticos (T8SP-HA [SEQ ID nº 12] y T8SP-HA como [SEC ID nº 13]) y el Gateway Vector Conversion System según la información de la bibliografía sobre la materia (Koller, K. J., et al., *Analytical Biochemistry*, 1997, vol. 250, págs. 51-60). Ambos vectores tienen una secuencia secretora de señal (FLAG: PPTLS, HA:T8) antes del epítipo-tag (del lado del extremo N). Usando estos vectores, se construyó un vector de expresión de tipo fusión HA-tag o FLAG-tag de extremo N mediante reacción LR con el sistema de Mammalian Expression con tecnología Gateway (Invitrogen Corp.). Para cada vector de expresión construido se confirmó mediante tratamiento de enzima de restricción y análisis de secuencia que no existía delección o sustitución de bases en una región de codificación en la secuencia introducida.

Después de transfectar cada uno de los dos tipos de vector de expresión así construidos a la línea celular CHO-K1 usando FuGENE 6 (Roche), se efectuó la selección de la línea celular de expresión mediante el cultivo con un medio de cultivo que incluía G418 (medio DMEM/F12 con 400 ng/mL G418 y suero fetal bovino al 10%). Para las líneas celulares de expresión que crecieron, la selección se efectuó a continuación mediante inmunoensayo enzimático celular (EIA celular) usando anticuerpo etiquetado (POD) de peroxidasa (anticuerpo M2-POD anti-FLAG y anticuerpo anti-HA-POD: 3F10) frente a epítipo-tag. Para las líneas celulares seleccionadas, la selección se efectuó mediante análisis de fluorocitometría (FCM) usando anticuerpo primario (anticuerpo anti-FLAG M2 y anticuerpo anti-HA: clon HA-7) y anticuerpo secundario etiquetado (FITC) de isotiocianato de fluoresceína (anticuerpo IgG anti-ratón FITC), para obtener las líneas celulares de expresión.

Como resultado del análisis FCM, se obtuvieron 8 líneas de clones expresando una proteína (proteína de fusión FLAG-tag) reconocidas por anticuerpo anti-FLAG en la membrana celular y 4 líneas de clones expresando una proteína (proteína de fusión HA-tag) reconocidas por anticuerpo anti-HA. Puesto que una señal fluorescente producida por la unión de un anticuerpo que reconoce FLAG-tag o HA-tag era claramente más fuerte para cada uno de estos clones en comparación con la línea celular huésped (CHO-K1), se aclaró que el gen de interés se expresaba en ellos. En la figura 2 se muestran resultados representativos.

Sobre la base del resultado del análisis FCM, se aclaró que el producto génico ph01207 del tipo de fusión epitop-tag del extremo N se expresa en la membrana celular.

5 Entre los clones para los que se observó expresión de la proteína de fusión HA-tag, una línea celular denominada HA-ph01207#10-6 se depositó en el International Patent Organism Depository del National Institute of Advanced
10 Industrial Science and Technology de Japón el 19 de agosto de 2004 con el número de registro FERM BP-10101. La existencia de esta línea celular se confirmó experimentalmente en el International Patent Organism Depository el 22 de septiembre de 2004. La línea celular HA-ph01207#10-6 es una línea celular que se estableció mediante la
15 transfección en la línea celular CHO-K1 un vector que expresa, como una proteína de fusión HA-tag del extremo N, el ADN compuesto de una secuencia de bases que carece de un segmento predicho para codificar una secuencia de señal (20 residuos de aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2) entre el marco de lectura abierto (ORF) del ADN compuesto de la secuencia de bases representada por la secuencia SEC ID nº 1, y expresa de forma estable la proteína de fusión HA-tag del extremo N.

Ejemplo 3

(Análisis funcional del producto génico ph01207)

20 El análisis funcional del producto génico ph01207 se efectuó mediante la determinación de la respuesta celular cuando un ligando se añadió al oocito *Xenopus laevis* que expresaba ph01207. La determinación de la respuesta celular se efectuó mediante seis individuos para cada oocito de control (oocito en el que no se introdujo el gen) y el oocito que expresaba el gen (ADNc de ph01207), mediante la medición de variaciones en el potencial de membrana del oocito cuando se añadió un ligando al mismo. El sobrenadante del cultivo de la línea celular HeLa en el que se
25 observó la expresión de ph01207 se usó como ligando. El sobrenadante del cultivo se preparó mediante el cultivo de células HeLa de un recuento de células de $1,2 \times 10^6$ en DMEM con suero fetal bovino al 10% durante dos días, después de lo cual se recuperó el sobrenadante del cultivo y se filtró con un filtro (0,45 μ m). Como ligando se usaron dos tipos de sobrenadante de cultivo con distintos lotes preparados de la misma manera (en adelante denominados muestra de ligando 1 y 2).

30 La muestra de ligando 1 o 2 se añadió al oocito que expresaba el gen ph01207 y el oocito de control para determinar las variaciones del potencial de membrana. La evaluación se efectuó usando variaciones en las formas de onda y cantidades actuales mostrando variaciones en la cantidad actual. Cuando una variación en la cantidad actual era de 0,2 μ A o más y se observaba una forma de onda de un modelo específico de GPCR, se juzgaba que se generaba una respuesta a la estimulación de ligando. La expresión "modelo específico de GPCR" se refiere al modelo de
35 forma de onda 1 representado en la figura 3. Los modelos de forma de onda 2-4 representados en la figura 3 son modelos de forma de onda producidos por elementos artificiales como la influencia de algún tipo de componente como un solvente, o un ligando de alta concentración, y por tanto se juzgó que una respuesta generada no era contraria a la estimulación de ligandos. Además, cuando se observaron los modelos mostrados en las formas de
40 onda 5 y 6, se juzgó que no se había generado una respuesta a la estimulación de ligando.

Como resultado, se observaron variaciones en la cantidad actual sólo en las células de expresión ph01207 (tabla 1 y tabla 2). Las letras «ND» en la tabla 2 indican que la cantidad actual de variación fue inferior a 0,2 μ A y no se observó una respuesta. Tal y como se muestra en la tabla 1, se observó una respuesta a la estimulación de ligandos en las seis muestras de las líneas celulares de expresión ph01207. En contraste, no se produjo una respuesta completamente al ligando en las células de control (tabla 2). Se consideró por tanto que la respuesta de las células de expresión ph01207 producida por la estimulación de ligandos es una respuesta específica al receptor expresado. Se obtuvo un resultado similar al usar cualquiera de las muestras de ligando 1 y 2.

50

Tabla 1

Muestra de ligando	Oocito de expresión de pb01207								
	Tasa de respuesta	Forma de onda representativa	Cantidad media de la variación actual \pm S.D.	Cantidad de la variación actual (μ A)					
				1	2	3	4	5	6
1	6/6	GPCR	1,21 \pm 0,54	1,33	1,81	1,30	0,50	0,63	1,70
2	6/6	GPCR	0,48 \pm 0,24	0,66	0,24	0,29	0,58	0,82	0,27

Tabla 2

Muestra de ligando	Oocito de control								
	Tasa de respuesta	Forma de onda representativa	Cantidad media de la variación actual \pm S.D.	Cantidad de la variación actual (μ A)					
				1	2	3	4	5	6
1	0/6	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0/6	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND

5 Tal y como se describe anteriormente, como se produjo una respuesta celular a la estimulación de ligandos mediante la expresión del gen ph01207, se consideró que el producto génico ph01207 es un GPCR con una función que activa el sistema intracelular de transducción de señales en respuesta a un ligando.

Ejemplo 4

10 (Análisis de la interacción de proteínas del producto génico ph01207)

Se examinó el análisis de la interacción de proteínas del producto génico ph01207 usando el sistema de dos híbridos de levadura.

15 Sobre la base de la información de secuencia de ph01207 y la información de secuencia de hBAI2, el cebo se estableció respectivamente en la región del extremo N (4 sitios) y en la región del extremo C (2 sitios) del producto génico ph01207, y la región del extremo N (región que carece de 55 residuos de aminoácidos en ph01207) y la región del extremo C (región con una inserción de un residuo de aminoácido en ph01207) del producto génico de hBAJ2, y el examen se efectuó para una genoteca de ADNc (derivada del cerebro, hipocampo, cáncer de mama y

20 cáncer de próstata, corazón y músculo esquelético) que se seleccionó según un informe (bibliografía 1 no relacionada con patentes) con respecto a la distribución de la expresión de hBAI2.

Al usar el cebo designado en la región del extremo C del producto génico ph01207 (con una inserción de un residuo de aminoácido correspondiente a la posición 1406 en la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEC ID nº 2) o la región del extremo C del producto génico hBAI2 (sin inserción del residuo de aminoácido), las proteínas de la familia MAGUK DLG2, DLG3, DLG4, AIP1, MAGI3 y similares se obtuvieron como presa. Además, HOMER2, Citron, SYNE-1, KIF5A y KIFAP3 se obtuvieron como presa que es específica del producto génico hBAI2.

25

Aunque sólo se obtuvo BAT1 (transcrito 3 asociado a HLA-B) como presa para el cebo diseñado en la región del extremo N (habiéndose eliminado 55 residuos de aminoácidos) del producto génico ph01207, se obtuvieron KCNN2 (intermediario de potasio/canal de activación de calcio de pequeña conductancia, subfamilia N, elemento 2) y similares para el cebo diseñado en la región del extremo N (sin delección de los residuos de aminoácidos) del producto génico hBAI2.

30

35 Se descubrió así que, con la excepción de las proteínas de la familia MAGUK, existe una diferencia en las proteínas de interacción detectadas por el sistema de dos híbridos de levadura para el producto génico ph01207 y el producto génico hBAI2.

El producto génico ph01207 y el producto génico hBAI2 interactúan con las proteínas de la familia MAGUK en sus respectivas regiones del extremo C. Las proteínas de la familia MAGUK están presentes en el citoplasma y se unen con proteínas de membrana como receptores o canales iónicos que están presentes en la membrana celular para participar en la transducción de señales de estas proteínas de membrana. Se consideró, por tanto, que el producto génico ph01207 y el producto génico hBAI2 son receptores funcionales de proteína de membrana que participan en la transducción intracelular de señales a través de las proteínas de la familia MAGUK.

40

45

Ejemplo 5

(Determinación del cambio en la concentración intracelular de calcio en la línea celular de expresión de ph01207 causada por CCK 8)

50

Los cambios en las concentraciones intracelulares de calcio (Ca^{2+}) provocados por CCK-8S (SEC ID nº 14), CCK-8NS y CCK-4 se determinaron usando las líneas celulares de expresión de ph01207 preparadas en el ejemplo 2. Las líneas celulares preparadas en el ejemplo 2 son 8 líneas en las que la proteína codificada por ph01207 se expresa como una proteína de fusión FLAG-tag y 4 líneas en las que la proteína codificada por ph01207 se expresa como proteína de fusión HA-tag. Entre éstas, en este ejemplo se utilizó la línea celular HA-ph01207#10-6 como línea obtenida mediante clonación celular de una línea celular que expresa de forma estable la proteína codificada por ph01207 como una proteína de fusión HA-tag. Aunque CCK-8NS es un octapéptido CCK constituido por la misma secuencia de aminoácidos que CCK-8S (SEC ID nº 14), el séptimo residuo de tirosina del extremo C del mismo no está sulfatado. CCK-4 es un tetrapéptido constituido por residuos de aminoácidos del extremo C al cuarto residuo de aminoácidos de CCK-8S (SEC ID nº 14).

55

60

Un procedimiento específico para medir un cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} en la línea celular HA-ph01207#10-6 producida por CCK-8S (SEC ID nº 14) y los resultados del mismo se describen a continuación. La línea celular HA-ph01207#10-6 se sembró en placas de 96 pocillos (placas con una superficie de muro negro y una base transparente) a un recuento de células de $2 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ de medio/pocillo y se cultivó a 37°C en presencia de CO_2 al 5%. Como medio se usó DMEM/F12 (Gibco) con suero fetal bovino al 10% (Moregate BioTech). Al día siguiente, se extrajeron $50 \mu\text{l}$ de medio de cada pocillo, y $50 \mu\text{l}$ de tampón de carga se añadieron en cada pocillo y se permitió que reaccionara a temperatura ambiente durante 1,5 h. El tampón de carga se preparó mediante la disolución del componente A del kit de ensayo FLIPR Calcium 3 (Molecular Devices Corp.) con una solución en la que se añadió $0,1 \text{ mL}$ de 500 mM de probenecid (Sigma) a $9,9 \text{ mL}$ de componente B. Tras la reacción, las variaciones a temporales en la intensidad de la fluorescencia al añadir CCK-8S (Peptide Institute, Osaka, Japón) se midieron para cada pocillo usando FLEXstation (Molecular Devices Corp.). La medición también se efectuó de forma similar para CCK-8NS (Peptide Institute, Osaka, Japón) y CCK-4 (Peptide Institute). Para CCK-8S (SEC ID nº 14), $0,52 \text{ mg}$ del mismo se disolvieron con $4,5 \text{ mL}$ de NaHCO_3 al 1% (Wako) para preparar una solución de concentración de $0,1 \text{ mM}$. Para CCK-8NS, tras disolver $0,53 \text{ mg}$ del mismo con $0,50 \text{ mL}$ de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), $4,50 \text{ mL}$ de agua redestilada se añadieron para preparar una solución de concentración de $0,1 \text{ mM}$. Para CCK-4, tras disolver $0,54 \text{ mg}$ del mismo con $0,46 \text{ mL}$ de DMSO, $4,09 \text{ mL}$ de agua re-distilada se añadieron para preparar una solución de concentración de $0,2 \text{ mM}$. CCK-8S (SEC ID nº 14), CCK-8NS y CCK-4 se diluyeron con solución salina tamponada de fosfato (PBS) para preparar una solución de 5 nM , y la medición se efectuó después de añadir $25 \mu\text{L}$ (concentración final de 1 nM) de cada uno. Como control positivo que induce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , se usó A23187 (Calbiochem, CA) a una concentración final de $10 \mu\text{M}$. Como control negativo, se usó la línea celular CHO-K1 que se usó como huésped en la producción de la línea celular HA-ph01207#10-6. Puesto que el vector de expresión ph01207 no se transfirió a la línea celular CHO-K1, el producto génico ph01207 no se expresó en ella.

Los resultados mostraron que la concentración intracelular de Ca^{2+} de la línea celular HA-ph01207#10-6 que se estimuló mediante CCK-8S (SEC ID nº 14) (figura 4-A) aumentó en comparación con la línea celular HA-ph01207#10-6 que no se estimuló (figura 4-E). Sin embargo, un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} de la línea celular HA-ph01207#10-6 no se observó en las células estimuladas por CCK-8NS o CCK-4 (figura 4-B y figura 4-C). Además, se observó un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} de la línea celular HA-ph01207#10-6 estimulada por A23187 (figura 4-D).

El nivel de aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} de la línea celular HA-ph01207#10-6 estimulada por 1 nM de CCK-8S (SEC ID nº 14) (figura 4-A) fue aproximadamente igual al nivel de aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} producida por A23187 que se usó como control positivo (figura 4-D).

En contraste, la línea celular CHO-K1 no mostró aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} al ser estimulada con CCK-8S (SEC ID nº 14), CCK-8NS o CCK-4 (figura 4-A, figura 4-B y figura 4-C). Sin embargo, se observó un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} de las células CHO-K1 al ser estimuladas con A23187 (figura 4-D).

A partir de estos resultados, se aclaró que la línea celular HA-ph01207#10-6 responde específicamente a CCK-8S (SEC ID nº 14). También se aclaró que la proteína codificada por ph01207 que se expresó en la línea celular HA-ph01207#10-6 participa en el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en la línea celular causada por CCK-8S (SEC ID nº 14). Se consideró por tanto que CCK-8S (SEC ID nº 14) es un ligando del producto génico ph01207.

La línea celular HA-ph01207#10-6 también exhibió una respuesta biológica lo suficientemente elevada a 1 nM de CCK-8S (SEC ID nº 14). Puesto que CCK-8S (SEC ID nº 14) a una baja concentración de 1 nM indujo una respuesta biológica en la línea celular HA-ph01207#10-6, se consideró que CCK-8 realmente induce una respuesta biológica celular a través de la proteína codificada por ph01207 in vivo. Es decir, se consideró que CCK-8S (SEC ID nº 14) es uno de los ligandos in vivo de ph01207 del que se predice que es un GPCR.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, puede proporcionarse una proteína derivada de un nuevo receptor funcional de proteína de membrana que presenta un dominio de transmembrana de siete dominios que se considera un GPCR, y un ADN que codifica la proteína. La presente proteína se expresa en la membrana celular cuando es expresada por una célula, y activa la transducción intracelular de señales mediante la estimulación de ligandos para inducir una respuesta celular.

La presente invención permite dilucidar los sistemas de transducción de señales y funciones celulares en los que participa la presente proteína y la regulación de la misma, además del diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades atribuibles a una anomalía en la presente proteína y/o el ADN (por ejemplo, la contusión cerebral o el tumor cerebral) o la enfermedad tumoral.

Además, se descubrió CCK-SS (SEC ID nº 14) como ligando in vivo de un receptor funcional de proteína de membrana según la presente invención. El CCK-8S es un péptido bioactivo que participa en funciones neurológicas

como la memoria. Por lo tanto, mediante el uso de un agonista del receptor funcional de proteína de membrana según la presente invención es posible llevar a cabo la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad acompañada de un trastorno de una función neurológica como la memoria, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

5 De esta forma, la presente invención es una sustancia útil que puede contribuir en una amplia gama de ámbitos desde la ciencia básica hasta el desarrollo farmacéutico.

TEXTO LIBRE DE TABLA DE SECUENCIAS

- 10 SEC ID nº 1: ADN que codifica un nuevo receptor funcional de proteína de membrana
 SEC ID nº 2: proteína codificada por el ADN constituida por la secuencia de bases de la secuencia SEC ID nº 1
 SEC ID nº 2: (297) : (350) dominio TSP-I
 SEC ID nº 2: (352) : (405) dominio TSP-I
 15 SEC ID nº 2: (408) : (461) dominio TSP-I
 SEC ID nº 2: (870) : (890) dominio de transmembrana
 SEC ID nº 2: (899) : (919) dominio de transmembrana
 SEC ID nº 2: (928) : (948) dominio de transmembrana
 SEC ID nº 2: (970) : (990) dominio de transmembrana
 20 SEC ID nº 2: (1012) : (1032) dominio de transmembrana
 SEC ID nº 2: (1087) : (1107) dominio de transmembrana
 SEC ID nº 2: (1114) : (1134) dominio de transmembrana
 SEC ID nº 3: secuencia parcial de aminoácidos presentada en cada región del extremo C de un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la secuencia SEC ID nº 2, hBAI1 y hBAI2
 25 SEC ID nº 4: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 5: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 6: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 7: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 8: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 30 SEC ID nº 9: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 10: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 11: oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 SEC ID nº 12: oligonucleótido sintetizado
 SEC ID nº 13: oligonucleótido sintetizado
 35 SEC ID nº 14: CCK-8S
 SEC ID nº 14: (2) (2) sulfatado

Listado de secuencias

- 40 <110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION
 <120> Gen que codifica el receptor acoplado a la proteína G y su producto génico
 45 <130> GP04-1020PCT
 <150> JP P2003-389624
 <151> 2003-11-19
 50 <150> JP P2004-130371
 <151> 2004-04-26
 <150> JP P2004-304780
 <151> 2004-10-19
 55 <160> 14
 <170> PatentIn versión 3.1
 60 <210> 1
 <211> 4557
 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 65 <220>
 <221> misc_feature

<223> ADN que codifica un nuevo receptor de proteína de membrana funcional

<400> 1

	atgaccccag cctgtcccct cttactgtct gtgattctgt ccttgcgcct gggcaccgcc	60
	ttcgaccccg cccccagtgc ctgctctgcc ctggcctcgg gtgtgctcta cggggccttc	120
	tcgctgcagg acctctttcc taccatcgcc tcgggctgct cctggaccct ggagaacct	180
	gaccccacca agtactccct ctacctgcgc ticaaccgcc aggagcaggt gtgcgcacac	240
	tttgcccccc gcctgtctgcc cctggaccac tacctggtca actttacctg cctgcggcct	300
	agccccgagg aggcgggtgg ccaggcggag tcagaggtgg ggcggccaga agaggaggag	360
	gcagaggcgg cagcggggtt ggagctgtgc agcggctcag gccctttac cttcctgcac	420
	ttcgacaaga acttcgtgca gctgtgcctg tcggctgagc cctccgaggc cccgcgcctg	480
	ctggcgcccg ctgccctagc cttccgcttt gtcgaggtct tgctcatcaa caacaacaac	540
	tctagccaat tcacctgtgg tgtgctctgc cgctggagtg aggagtgtgg cgcgcctgcc	600
	ggcagggcct gcgctttgc tcagccaggc tcagctgcc ctggagaggc gggggccggc	660
5	tccaccacca ccacatctcc aggcctctct gctgcccaca ccctgtccaa tgcctgtgtg	720
	ccggggggcc cagccccacc tgctgaggcc gatttgcact cggggagcag caatgatctg	780
	ttcacaaccg agatgagata tggtagggag ccggaagagg aaccgaaagt gaaaaccag	840
	tggccgaggt ctgcagatga gcctgggcta tacatggcgc agacagtga cggcgtgtgg	900
	gaggagtggg ggtcctggag cctgtgctcc cgcagctgcg ggcgggggtc ccggagccgg	960
	atgcggacct gcgtgcccc ccagcacgcg ggcaaggcct gcgagggtcc tgagctgcag	1020
	actaagctct gcagtatggc tgcctgcccc gtggaaggcc agtggttaga atggggtccc	1080
	tggggcccat gctccacgtc ctgtgccaat gggacccaac agcgcagccg gaagtgcagc	1140
	gtggcgggcc cagcctgggc cacatgcacg ggtgccctca ctgacaccg ggagtgcagc	1200
	aacctcgagt gcccggccac tgatagcaag tggggccat ggaatgcgtg gagcctgtgc	1260
	tctaagacgt gtgacacagg ctggcagcgc cgcttccgca tgtgccaggc cacgggcacg	1320
	cagggtacc cctgcgaggg caccggagag gaggatgaagc cttgtagtga gaagaggtgt	1380
	ccagccttcc atgagatgtg cagggatgag tacgtgatgc tgatgacgtg gaagaaggca	1440
	gctgtggcg agatcatcta caacaagtgc cccccgaatg cctcagggtc tgccagccgc	1500
	cgctgtctcc tcagtgccca aggcgtggcg tactgggggc tgcccagctt tgctcgtgc	1560

atctccatg agtaccgcta cctgtatctg tcaacttaggg agcacctggc caaggggag 1620
cgcatgctgg caggcgaggg catgtgcag gtggtgcgca gcctgcagga gctactggcc 1680
cggcgcacct actatagtgg ggacctgctc ttctctgtgg acattctgag gaatgtcact 1740
gacaccttta agagggccac ctacgtgcc tcggctgatg atgtgcagcg cttcttcag 1800
gtggtgagct tcatggtgga tgcgaaaaac aaggagaagt gggacgatgc tcagcaggtg 1860
tcccctggct ctgtgcacct gctccgtgc gtggaggact tcattcacct ggtggcgat 1920
gctctcaagg cottocagag ctctctgatt gtcacagata atctagtgat cagcattcag 1980
cgagagcccg tctcagctgt gtccagtgc atcacgttc ccatgcgggg ccgcccggggc 2040
atgaaggact gggtcggca ctcagaggac cgcctcttc tgcceaagga ggtgctcagc 2100
ctctctccc cagggaaagg agccacatct ggggcagcag gcagccctgg cagggggagg 2160
ggcccaggaa cggtgccctc tggcccagc cactcccacc agcgcctcct cccagcagac 2220
cctgatgagt cctcctactt tgtgatcgt gctgtactct accgaccct tggcctcacc 2280
ctgcccctc ccaggccccc gctggccgtc acatcccggg tgatgacagt gactgtgcgc 2340
ccccctacc agcctccagc tgagcccctc atcactgtgg agctctccta catcatcaat 2400
gggaccacgg atccccattg cggcagctgg gactactcca gagcagatgc cagctcagga 2460
gactgggaca ctgaaaattg ccagaccctg gagaccagc cagctcacac ccgctgccag 2520
tgccagcacc tgtccacctt tctgtacta gccagccgc ccaaggacct gaccctggag 2580
ctggcgggct ccccctcgtt ccccctgtg atcggctgtg cagtgtcgtg catggcgtg 2640
ctcacctgc tcgcatcta tgcgccttt tggaggttca taaaatctga acgctccacc 2700
atcttctga acttctgcct gtccatcttg gcaccaaca tctgatcct cgtgggccag 2760
tcccgggtc tgagcaaggg cgtgtgcacc atgacggctg ccttctgca cttctcttt 2820
ctctctcct tttgtgggt gcttaccgag gcctggcagt cctacctggc tgcattggg 2880
cggatgcgca cccgcctcgt tcgcaagcgc ttcctctgcc tgggctgggg tctgcctgcc 2940
ctggtggtgg ccgtgtctgt tggctttacc cgaacgaaag gatacgtac atccagctac 3000
tctgtctct ccttgaggg cggcctgctc tacgcctttg tggccctgc agccgtcatt 3060
gtcctggtga acatgctcat cggaatcaco gtctcaaca agctcatggc acgtgatggc 3120
atctccgaca aatccaagaa gcagagggcc gggtcggagc ggtgccctg ggccagcctg 3180

ctcctcccct gctcagcgtg tggagcggtc cccagccccc tgctcagctc agcctcggcc 3240
 aggaacgcca tggcctcact ctggagctcc tgcgtggtgc tggccctgct ggcgctcacc 3300
 tggatgtctg ccgtcctggc tatgacagac cgccgttccg tcctcttcca ggcctcttt 3360
 gctgtcttca actccgcgca gggctttgto atcactgotg tgcactgctt cctgcgcccga 3420
 gaggtccagg atgtggtgaa gtgccagatg ggggtgtgcc gggctgatga gagcgaagac 3480
 tcccctgact cgtgtaagaa cgggcagctg cagatcctgt cagactttga aaaggatgtg 3540
 gatctggctt gtcaaacagt gctgttcaag gaggtcaaca cttgcaacc gtccaccatc 3600
 acgggcacac tatcccgcct gtcccctggat gaggatgagg agcccaagtc ctgctcctg 3660
 ggcctgagg gcagcctcag ctctcacca ctgctggga atatcctggt gcccatggca 3720
 gcctcaccag ggctggggga gcctcggccc ccacaggagg ccaaccctgt ttacatgtgt 3780
 ggggagggtg gcctgcggca gctggacctc acatggctgc ggcccactga gccaggctct 3840
 gaggagact acatggtgct gcccggcggg actttgagcc tgcagcctgg cgggtgggggt 3900
 ggaggtggtg aggatgcccc caggggccgg cgggagggga cccccggcg agctgccaag 3960
 acagtggccc aactgaagg ctaccccagc ttcctgtccg tggaccactc ggcctgggg 4020
 ctgggcccctg cctatggatc tctccagaat ccctatgga tgaacttcca accgccaccg 4080
 ccgacacca gcgcccgcca agtgcccag ccaggggagc gcagccggac catgcctcgc 4140
 accgtgcccg gctctaccat gaagatgggc tccctggagc gaaagaaatt acggtattca 4200
 gacctggact ttgagaaggt gatgcacacc cggaaacggc attcagaact ctaccacgag 4260
 ctcaaccaga agttccacac tttcgacgc taccgagcc agtccacggc caagaggag 4320
 aagcgggtgga gtgtgtcctc ggggtgggca gccgagcggg gcgtgtgcac cgataagccc 4380
 agccctgggg agcggcccag cttgtccaa catcggcgcc atcagagctg gagcacctc 4440
 aaatctatga cactgggctc gctgcccc aagccccgag aacggctgac tctgcaccgg 4500
 gcagcagcct gggagcccac agaaccaccg gatggtgact tccagacaga ggtgtga 4557

5 <210> 2
 <211> 1518
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Proteína que es codificada por el ADN que presenta una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1
 <220>

- <221> DOMINIO
- <222> (297).. (350)
- <223> dominio de TSP-I

- 5 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (352).. (405)
- <223> dominio de TSP-I

- 10 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (408) .. (461)
- <223> dominio de TSP-I

- 15 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (870).. (890)
- <223> dominio de transmembrana

- 20 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (899) .. (919)
- <223> dominio de transmembrana

- 25 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (928)..(948)
- <223> dominio de transmembrana

- 30 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (970)..(990)
- <223> dominio de transmembrana

- 35 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (1012).. (1032)
- <223> dominio de transmembrana

- 40 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (1087) .. (1107)
- <223> dominio de transmembrana

- 45 <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (1114).. (1134)
- <223> dominio de transmembrana

- 50 <400> 2

Met Thr Pro Ala Cys Pro Leu Leu Ser Val Ile Leu Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Ala Phe Asp Pro Ala Pro Ser Ala Cys Ser Ala Leu Ala
 20 25 30
 Ser Gly Val Leu Tyr Gly Ala Phe Ser Leu Gln Asp Leu Phe Pro Thr
 35 40 45

Ile Ala Ser Gly Cys Ser Trp Thr Leu Glu Asn Pro Asp Pro Thr Lys
 50 55 60

Tyr Ser Leu Tyr Leu Arg Phe Asn Arg Gln Glu Gln Val Cys Ala His
 65 70 75 80

Phe Ala Pro Arg Leu Leu Pro Leu Asp His Tyr Leu Val Asn Phe Thr
 85 90 95

Cys Leu Arg Pro Ser Pro Glu Glu Ala Val Ala Gln Ala Glu Ser Glu
 100 105 110

Val Gly Arg Pro Glu Glu Glu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Gly Leu Glu
 115 120 125

Leu Cys Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Phe Leu His Phe Asp Lys Asn
 130 135 140

Phe Val Gln Leu Cys Leu Ser Ala Glu Pro Ser Glu Ala Pro Arg Leu
 145 150 155 160

Leu Ala Pro Ala Ala Leu Ala Phe Arg Phe Val Glu Val Leu Leu Ile
 165 170 175

Asn Asn Asn Asn Ser Ser Gln Phe Thr Cys Gly Val Leu Cys Arg Trp
 180 185 190

Ser Glu Glu Cys Gly Arg Ala Ala Gly Arg Ala Cys Gly Phe Ala Gln
 195 200 205

Pro Gly Cys Ser Cys Pro Gly Glu Ala Gly Ala Gly Ser Thr Thr Thr
 210 215 220

Thr Ser Pro Gly Pro Pro Ala Ala His Thr Leu Ser Asn Ala Leu Val
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Glu Ala Asp Leu His Ser Gly Ser
 245 250 255

Ser Asn Asp Leu Phe Thr Thr Glu Met Arg Tyr Gly Glu Glu Pro Glu
 260 265 270

Glu Glu Pro Lys Val Lys Thr Gln Trp Pro Arg Ser Ala Asp Glu Pro
 275 280 285

Gly Leu Tyr Met Ala Gln Thr Val His Gly Val Trp Glu Glu Trp Gly
 290 295 300

Ser Trp Ser Leu Cys Ser Arg Ser Cys Gly Arg Gly Ser Arg Ser Arg
 305 310 315 320

Met Arg Thr Cys Val Pro Pro Gln His Gly Gly Lys Ala Cys Glu Gly
 325 330 335
 Pro Glu Leu Gln Thr Lys Leu Cys Ser Met Ala Ala Cys Pro Val Glu
 340 345 350

Gly Gln Trp Leu Glu Trp Gly Pro Trp Gly Pro Cys Ser Thr Ser Cys
 355 360 365

Ala Asn Gly Thr Gln Gln Arg Ser Arg Lys Cys Ser Val Ala Gly Pro
 370 375 380

Ala Trp Ala Thr Cys Thr Gly Ala Leu Thr Asp Thr Arg Glu Cys Ser
 385 390 395 400

Asn Leu Glu Cys Pro Ala Thr Asp Ser Lys Trp Gly Pro Trp Asn Ala
 405 410 415

Trp Ser Leu Cys Ser Lys Thr Cys Asp Thr Gly Trp Gln Arg Arg Phe
 420 425 430

Arg Met Cys Gln Ala Thr Gly Thr Gln Gly Tyr Pro Cys Glu Gly Thr
 435 440 445

Gly Glu Glu Val Lys Pro Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Phe His
 450 455 460

Glu Met Cys Arg Asp Glu Tyr Val Met Leu Met Thr Trp Lys Lys Ala
 465 470 475 480

Ala Ala Gly Glu Ile Ile Tyr Asn Lys Cys Pro Pro Asn Ala Ser Gly

485 490 495

Ser Ala Ser Arg Arg Cys Leu Leu Ser Ala Gln Gly Val Ala Tyr Trp
 500 505 510

Gly Leu Pro Ser Phe Ala Arg Cys Ile Ser His Glu Tyr Arg Tyr Leu
 515 520 525

Tyr Leu Ser Leu Arg Glu His Leu Ala Lys Gly Gln Arg Met Leu Ala
 530 535 540

Gly Glu Gly Met Ser Gln Val Val Arg Ser Leu Gln Glu Leu Leu Ala
 545 550 555 560

Arg Arg Thr Tyr Tyr Ser Gly Asp Leu Leu Phe Ser Val Asp Ile Leu
 565 570 575

Arg Asn Val Thr Asp Thr Phe Lys Arg Ala Thr Tyr Val Pro Ser Ala
 580 585 590

Asp Asp Val Gln Arg Phe Phe Gln Val Val Ser Phe Met Val Asp Ala
 595 600 605

Glu Asn Lys Glu Lys Trp Asp Asp Ala Gln Gln Val Ser Pro Gly Ser
 610 615 620

Val His Leu Leu Arg Val Val Glu Asp Phe Ile His Leu Val Gly Asp
 625 630 635 640
 Ala Leu Lys Ala Phe Gln Ser Ser Leu Ile Val Thr Asp Asn Leu Val
 645 650 655

Ile Ser Ile Gln Arg Glu Pro Val Ser Ala Val Ser Ser Asp Ile Thr
 660 665 670

Phe Pro Met Arg Gly Arg Arg Gly Met Lys Asp Trp Val Arg His Ser
 675 680 685

Glu Asp Arg Leu Phe Leu Pro Lys Glu Val Leu Ser Leu Ser Ser Pro
 690 695 700

Gly Lys Pro Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Ser Pro Gly Arg Gly Arg
 705 710 715 720

Gly Pro Gly Thr Val Pro Pro Gly Pro Gly His Ser His Gln Arg Leu
 725 730 735

Leu Pro Ala Asp Pro Asp Glu Ser Ser Tyr Phe Val Ile Gly Ala Val
 740 745 750

Leu Tyr Arg Thr Leu Gly Leu Ile Leu Pro Pro Pro Arg Pro Pro Leu
 755 760 765

Ala Val Thr Ser Arg Val Met Thr Val Thr Val Arg Pro Pro Thr Gln
 770 775 780

Pro Pro Ala Glu Pro Leu Ile Thr Val Glu Leu Ser Tyr Ile Ile Asn
 785 790 795 800

Gly Thr Thr Asp Pro His Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Ser Arg Ala Asp
 805 810 815

Ala Ser Ser Gly Asp Trp Asp Thr Glu Asn Cys Gln Thr Leu Glu Thr
 820 825 830

Gln Ala Ala His Thr Arg Cys Gln Cys Gln His Leu Ser Thr Phe Ala
 835 840 845

Val Leu Ala Gln Pro Pro Lys Asp Leu Thr Leu Glu Leu Ala Gly Ser
 850 855 860

Pro Ser Val Pro Leu Val Ile Gly Cys Ala Val Ser Cys Met Ala Leu
 865 870 875 880

Leu Thr Leu Leu Ala Ile Tyr Ala Ala Phe Trp Arg Phe Ile Lys Ser
 885 890 895

Glu Arg Ser Ile Ile Leu Leu Asn Phe Cys Leu Ser Ile Leu Ala Ser
 900 905 910

Asn Ile Leu Ile Leu Val Gly Gln Ser Arg Val Leu Ser Lys Gly Val
 915 920 925

Cys Thr Met Thr Ala Ala Phe Leu His Phe Phe Phe Leu Ser Ser Phe
 930 935 940
 Cys Trp Val Leu Thr Glu Ala Trp Gln Ser Tyr Leu Ala Val Ile Gly
 945 950 955 960

Arg Met Arg Thr Arg Leu Val Arg Lys Arg Phe Leu Cys Leu Gly Trp
 965 970 975

Gly Leu Pro Ala Leu Val Val Ala Val Ser Val Gly Phe Thr Arg Thr
 980 985 990

Lys Gly Tyr Gly Thr Ser Ser Tyr Cys Trp Leu Ser Leu Glu Gly G
 995 1000 1005

Leu Leu Tyr Ala Phe Val Gly Pro Ala Ala Val Ile Val Leu Val
 1010 1015 1020

Asn Met Leu Ile Gly Ile Ile Val Phe Asn Lys Leu Met Ala Arg
 1025 1030 1035

Asp Gly Ile Ser Asp Lys Ser Lys Lys Gln Arg Ala Gly Ser Glu
 1040 1045 1050

Arg Cys Pro Trp Ala Ser Leu Leu Leu Pro Cys Ser Ala Cys Gly
 1055 1060 1065

Ala Val Pro Ser Pro Leu Leu Ser Ser Ala Ser Ala Arg Asn Ala
 1070 1075 1080

Met Ala Ser Leu Trp Ser Ser Cys Val Val Leu Pro Leu Leu Ala
 1085 1090 1095

Leu Thr Trp Met Ser Ala Val Leu Ala Met Thr Asp Arg Arg Ser
 1100 1105 1110

Val Leu Phe Gln Ala Leu Phe Ala Val Phe Asn Ser Ala Gln Gly
 1115 1120 1125

Phe Val Ile Thr Ala Val His Cys Phe Leu Arg Arg Glu Val Gln
 1130 1135 1140

Asp Val Val Lys Cys Gln Met Gly Val Cys Arg Ala Asp Glu Ser
 1145 1150 1155

Glu Asp Ser Pro Asp Ser Cys Lys Asn Gly Gln Leu Gln Ile Leu
 1160 1165 1170

Ser Asp Phe Glu Lys Asp Val Asp Leu Ala Cys Gln Thr Val Leu
 1175 1180 1185

Phe Lys Glu Val Asn Thr Cys Asn Pro Ser Thr Ile Thr Gly Thr
 1190 1195 1200

Leu Ser Arg Leu Ser Leu Asp Glu Asp Glu Glu Pro Lys Ser Cys
 1205 1210 1215

Leu Val Gly Pro Glu Gly Ser Leu Ser Phe Ser Pro Leu Pro Gly
 1220 1225 1230

Asn Ile Leu Val Pro Met Ala Ala Ser Pro Gly Leu Gly Glu Pro
 1235 1240 1245

Pro Pro Pro Gln Glu Ala Asn Pro Val Tyr Met Cys Gly Glu Gly
 1250 1255 1260

Gly Leu Arg Gln Leu Asp Leu Thr Trp Leu Arg Pro Thr Glu Pro
 1265 1270 1275

Gly Ser Glu Gly Asp Tyr Met Val Leu Pro Arg Arg Thr Leu Ser
 1280 1285 1290

Leu Gln Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asp Ala Pro Arg
 1295 1300 1305

Ala Arg Pro Glu Gly Thr Pro Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Ala
 1310 1315 1320

His Thr Glu Gly Tyr Pro Ser Phe Leu Ser Val Asp His Ser Gly
 1325 1330 1335

Leu Gly Leu Gly Pro Ala Tyr Gly Ser Leu Gln Asn Pro Tyr Gly
 1340 1345 1350

Met Thr Phe Gln Pro Pro Pro Pro Thr Pro Ser Ala Arg Gln Val
 1355 1360 1365

Pro Glu Pro Gly Glu Arg Ser Arg Thr Met Pro Arg Thr Val Pro
 1370 1375 1380

Gly Ser Thr Met Lys Met Gly Ser Leu Glu Arg Lys Lys Leu Arg
 1385 1390 1395

Tyr Ser Asp Leu Asp Phe Glu Lys Val Met His Thr Arg Lys Arg
 1400 1405 1410

His Ser Glu Leu Tyr His Glu Leu Asn Gln Lys Phe His Thr Phe
 1415 1420 1425

Asp Arg Tyr Arg Ser Gln Ser Thr Ala Lys Arg Glu Lys Arg Trp
 1430 1435 1440

Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Ala Glu Arg Ser Val Cys Thr Asp
 1445 1450 1455

Lys Pro Ser Pro Gly Glu Arg Pro Ser Leu Ser Gln His Arg Arg
 1460 1465 1470

His Gln Ser Trp Ser Thr Phe Lys Ser Met Thr Leu Gly Ser Leu
 1475 1480 1485

Pro Pro Lys Pro Arg Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ala Ala Ala
 1490 1495 1500

Trp Glu Pro Thr Glu Pro Pro Asp Gly Asp Phe Gln Thr Glu Val
 1505 1510 1515

5 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (4)
 <223> Secuencia de aminoácidos parcial que se encuentra en cada región C-terminal del péptido constituida por la
 secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, BAI1 humano y BAI2 humano

15 <400> 3
 Gln Thr Glu Val
 1

20 <210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 <400> 4
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggc 28

30 <210> 5
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 <400> 5

40 ggggaccact ttgtacaaga aagctggg 28

45 <210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador
 <400> 6
 aaaaagcagg ctggatgacc ccagcctgtc c 31

5	<210> 7 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador	
10	<400> 7 agaaagctgg gtgcactcac acctctgtct gg	32
15	<210> 8 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador	
	<400> 8 tacaaaaaag caggcttcga ccccgcccc agtgcc	36
25	<210> 9 <211> 33 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador	
	<400> 9 ggggtcgaag cctgctttt tgtacaaagt tgg	33
40	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador	
	<400> 10 tcgcgtaac gctagcatgg atctc	25
50	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido concebido para su utilización como cebador	
	<400> 11 gtaacatcag agatttgag acac	24
65	<210> 12 <211> 125 <212> ADN <213> Artificial	

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula una función de una proteína, codificada por el ADN que se selecciona de entre el grupo siguiente:

(i) un ADN constituido por una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 del listado de secuencias o una cadena complementaria del mismo;

(ii) un ADN que presenta una homología de por lo menos 70% con la secuencia de bases del ADN de (i) y que codifica una proteína que presenta una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o una función que genera un cambio en un potencial de membrana celular, o una cadena complementaria del mismo;

(iii) un ADN que comprende una secuencia de bases del ADN de (i) pero del que se han eliminado o sustituido uno a cien nucleótidos, o al que se le han añadido uno a cien nucleótidos, y que codifica una proteína que presenta una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o una función que genera un cambio en un potencial de membrana, o una cadena complementaria del mismo; y

(iv) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con el ADN de (i) y que codifica una proteína que presenta una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o una función que genera un cambio en un potencial de membrana celular, o una cadena complementaria del mismo;

que comprende la inducción de la función de la proteína por el ligando de dicha proteína que es:

(1) la forma sulfatada del octapéptido de colecistoquinina de la SEC ID nº 14 (CCK-8S), o

(2) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de CCK-8S pero uno de cuyos aminoácidos se ha sustituido con un aminoácido homólogo excepto un residuo sulfatado de tirosina en la séptima posición del extremo C del péptido, y que presenta una función que induce un aumento de una concentración de calcio intracelular o un cambio en un potencial de membrana celular en una célula que expresa el ADN,

y en el que el procedimiento comprende utilizar por lo menos un elemento de entre el grupo constituido por ADN, un vector recombinante que contiene el ADN, un transformante que se introdujo con el vector recombinante, la línea celular HA-ph01207#10-6 depositada con el número de registro FERM BP-10101, una proteína codificada por el ADN, y un anticuerpo que reconoce inmunológicamente dicha proteína;

y, determinar si el compuesto de prueba inhibe o estimula la función de dicha proteína inducida por dicho ligando, en el que dicha función de dicha proteína es una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o en el que dicha función de dicha proteína es una función que genera un cambio en un potencial de membrana.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende

(a) permitir que dicho transformante o dicha línea celular y un compuesto de prueba coexistan en condiciones que permitan la interacción del transformante o la línea celular con el compuesto de prueba,

(b) introducir un sistema que mide dicha función de dicha proteína que se expresa en una membrana celular del transformante o la línea celular, y

(c) determinar si el compuesto de prueba inhibe o estimula, o no, la función de la proteína mediante la detección de la existencia o no existencia de, o una modificación en, la función de la proteína.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha función de dicha proteína es una función que aumenta una concentración de calcio intracelular y en el que el procedimiento comprende

(a) permitir que dicho transformante o dicha línea celular y un compuesto de prueba coexistan en condiciones que permitan la interacción del transformante o la línea celular con el compuesto de prueba,

(b) medir una concentración de calcio intracelular del transformante o la línea celular, y

(c) determinar si el compuesto de prueba inhibe o estimula, o no, la función de la proteína mediante la detección de un cambio en la concentración de calcio intracelular del transformante o la línea celular.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha función de dicha proteína es una función que genera un cambio en un potencial de membrana y en el que el procedimiento comprende

(a) permitir que dicho transformante o dicha línea celular y un compuesto de prueba coexistan en unas condiciones que permitan la interacción del transformante o la línea celular con el compuesto de prueba, promotor 5,

promotor PGK, GAP pro del transformante o la línea celular, y

(b) medir un potencial de membrana del transformante o la línea celular, y

5 (c) determinar si el compuesto de prueba inhibe o estimula, o no, la función de la proteína mediante la detección de un cambio en el potencial de membrana del transformante o la línea celular.

5. Procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe o estimula la unión de una proteína, codificada por el ADN que se selecciona de entre el grupo siguiente:

10 (i) un ADN constituido por una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 del listado de secuencias o una cadena complementaria del mismo;

15 (ii) un ADN que presenta una homología de por lo menos 70% con la secuencia de bases del ADN de (i) y que codifica una proteína que presenta una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o una función que genera un cambio en un potencial de membrana celular, o una cadena complementaria del mismo;

(iii) un ADN que comprende una secuencia de bases del ADN de (i) pero del que se han eliminado o sustituido uno a cien nucleótidos, o al que se han añadido uno a cien nucleótidos, y que codifica una proteína que presenta una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o una función que genera un cambio en un potencial celular de membrana, o una cadena complementaria del mismo; y

20 (iv) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con el ADN de (i) y que codifica una proteína que presenta una función que aumenta una concentración de calcio intracelular o una función que genera un cambio en un potencial de membrana celular, o una cadena complementaria del mismo;

a un ligando de dicha proteína en el que el ligando es:

30 (1) una forma sulfatada del octapéptido de colecistoquinina de la SEC ID nº 14, o

(2) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de CCK-8S pero uno de cuyos aminoácidos es sustituido con un aminoácido homólogo a excepción de un residuo sulfatado de tirosina en la séptima posición del extremo C del péptido, y que presenta una función que induce un aumento de una concentración de calcio intracelular o un cambio en un potencial de membrana celular en una célula que expresa el ADN;

35 y en el que dicha proteína y dicho ligando de la proteína se someten a reacción en presencia o ausencia del compuesto para medir la unión entre la proteína y el ligando.

40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la proteína se expresa en una célula que contiene ADN que codifica la proteína o en un transformante como la línea celular HA-ph01207#10-6 depositada con el número de registro FERM BP-10101.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la unión se mide mediante la medición de un cambio en el potencial de membrana celular o un cambio en la concentración de calcio intracelular causada por dicho ligando en presencia y ausencia del compuesto.

Figura 1

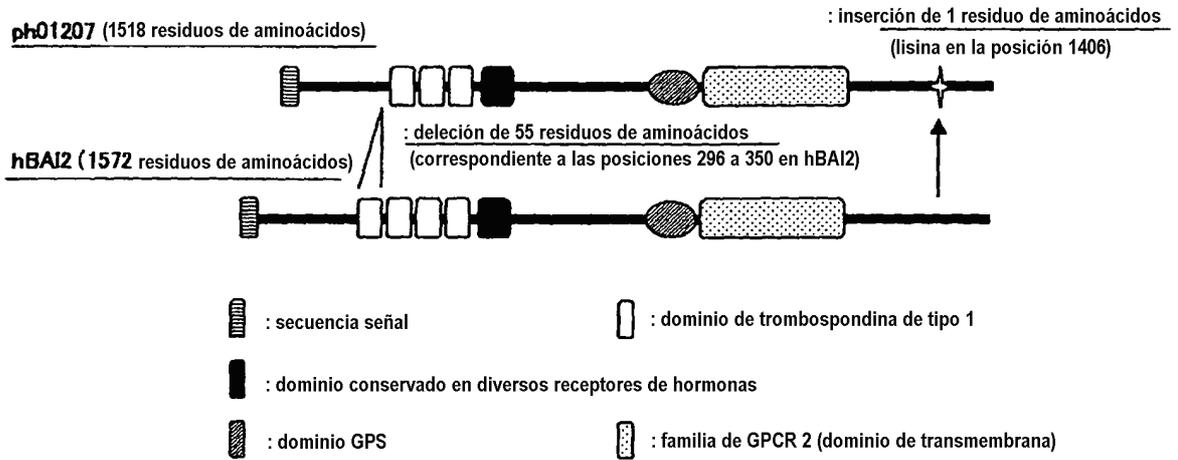


Figura 2

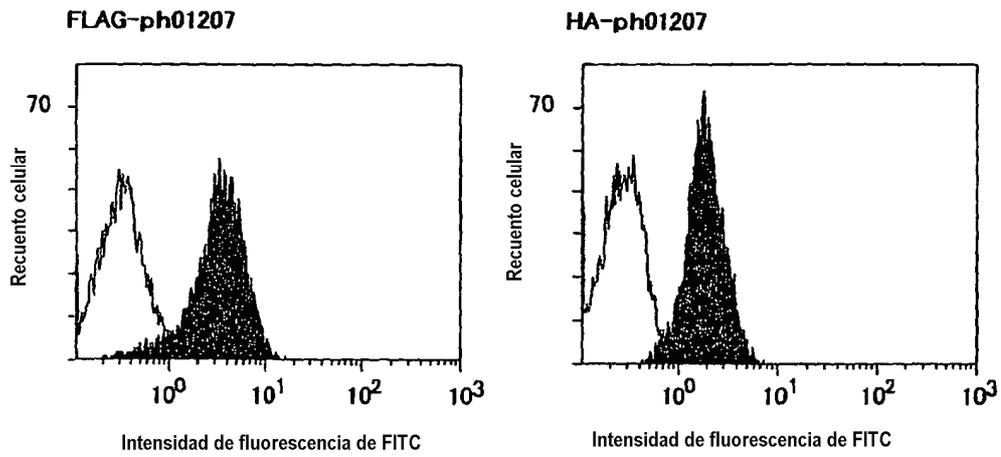


Figura 3

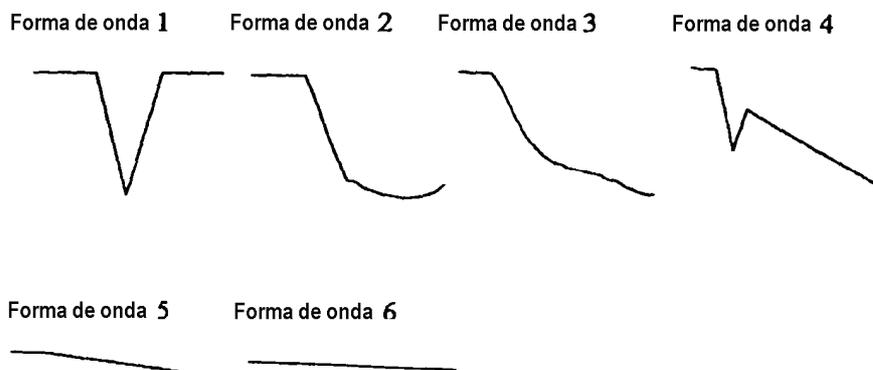


Figura 4-A

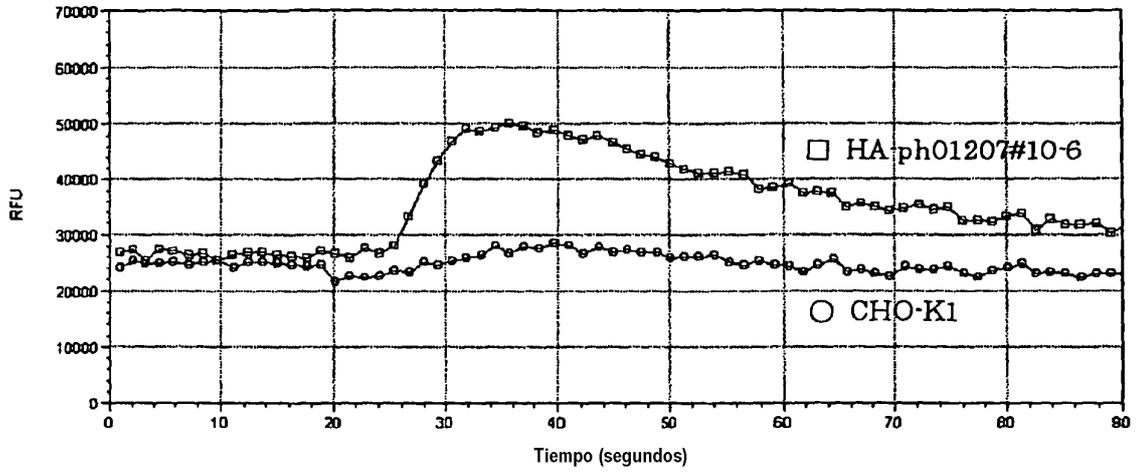


Figura 4-B

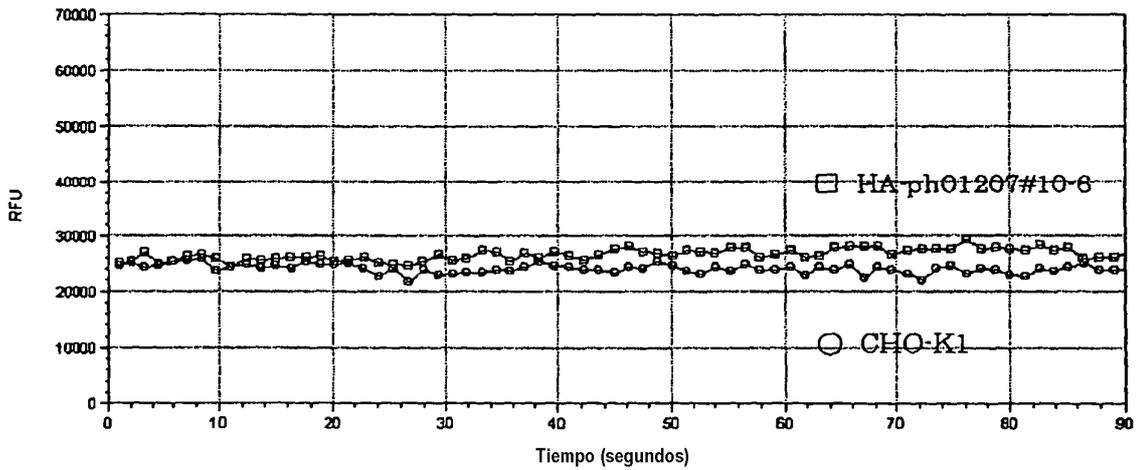


Figura 4-C

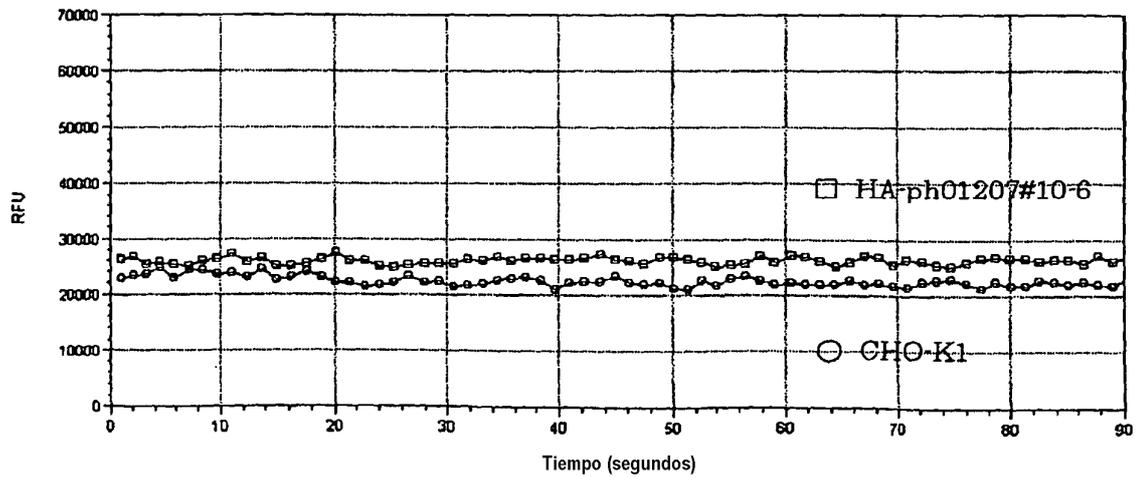


Figura 4-D

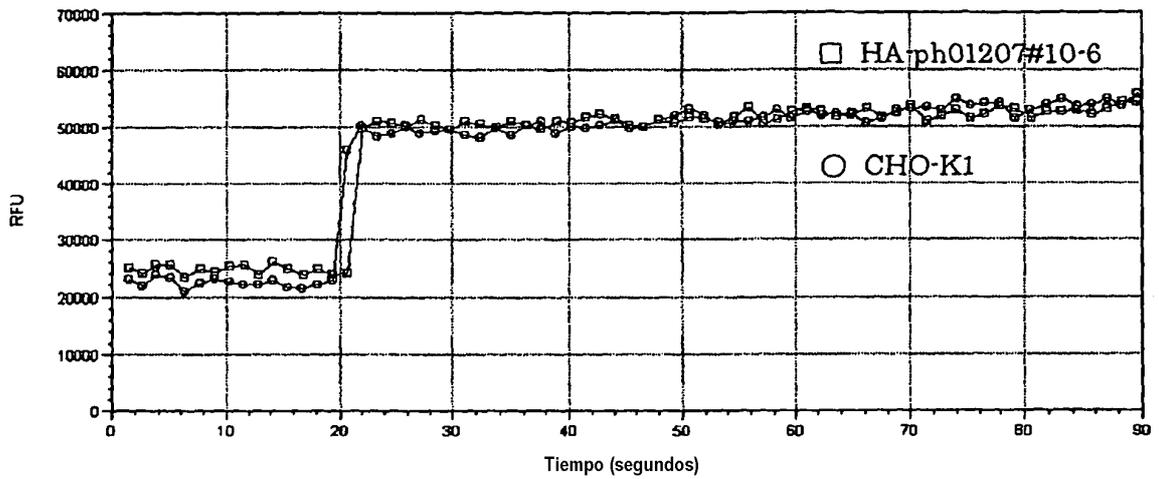


Figura 4-E

