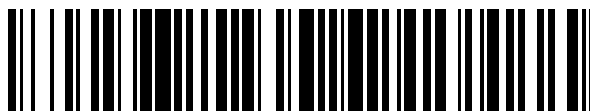


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 913**

51 Int. Cl.:
G01N 33/566 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06707378 .3**
96 Fecha de presentación: **02.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1864131**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **LIGANDO NATURAL DEL RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNAS G RCC356 Y USOS DEL MISMO.**

30 Prioridad:
03.03.2005 EP 05447046

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:
CHEMCOM S.A.
ROUTE DE LENNIK, 802
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
SALLMAN, Frédéric;
VEITHEN, Alex y
PHILIPPEAU, Magali

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 373 913 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

Ligando natural del receptor acoplado a proteínas G RCC356 y usos del mismo.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la identificación del ligando natural para el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) RCC356 y a usos del mismo.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son proteínas responsables de la transducción de una señal dentro de una célula. Los GPCR tienen habitualmente siete dominios transmembrana. Tras la unión de un ligando a un fragmento o parte extracelular de un GPCR, se transduce una señal dentro de la célula que da como resultado un cambio en un comportamiento o propiedad fisiológica o biológica de la célula. Los GPCR, junto con las proteínas G y los efectores (enzimas intracelulares y canales modulados por proteínas G), son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de segundos mensajeros intracelulares con entradas extracelulares.

15 Los genes de GPCR y los productos génicos pueden modular diversos procesos fisiológicos y son posibles agentes causantes de enfermedad. Los GPCR parecen ser de importancia crítica tanto para el sistema nervioso central como para procesos fisiológicos periféricos.

20 La superfamilia de proteínas de GPCR está representada por cinco familias: Familia I, receptores tipificados por rodopsina y el receptor beta2-adrenérgico actualmente representados por más de 200 miembros únicos; Familia II, la familia de receptores de secretina/calcitotina/hormonas paratiroideas; Familia III, la familia de receptores metabotrópicos de glutamato, Familia IV, la familia de receptores de AMPc, importantes en la quimiotaxia y el desarrollo de *D. discoideum*; y Familia V, el receptor de feromonas de apareamiento fúngico tal como STE2.

25 Las proteínas G representan una familia de proteínas heterotriméricas compuestas por subunidades α , β y γ , que se unen a nucleótidos de guanina. Estas proteínas se unen habitualmente a receptores de superficie celular (receptores que contienen siete dominios transmembrana) para la transducción de señales. De hecho, tras la unión del ligando a GPCR, se transmite un cambio conformacional a la proteína G, que provoca que la subunidad α intercambie una molécula de GDP unida por una molécula de GTP y se disocie de las subunidades $\beta\gamma$.

La forma unida a GTP de las subunidades α , β y γ funciona normalmente como un resto modulador de efector, que conduce a la producción de segundos mensajeros, tales como AMPc (por ejemplo mediante la activación de adenil ciclasa), diacilglicerol o inositol fosfatos.

30 Se conocen más de 20 tipos diferentes de subunidades α en seres humanos. Estas subunidades se asocian con un pequeño conjunto de subunidades β y γ . Los ejemplos de proteínas G de mamífero incluyen Gi, Go, Gq, Gs, G-olf y Gt. Las proteínas G se describen extensamente en Lodish *et al.*, Molecular Cell Biology (Scientific American Books Inc., Nueva York, N.Y., 1995; y también por Downes y Gautam, 1999, The G-Protein Subunit Gene Families. Genomics 62:544-552).

35 Los GPCR conocidos y no caracterizados constituyen actualmente dianas importantes para el desarrollo y la acción de fármacos. Para algunos GPCR, se ha asignado un posible papel fisiológico, sin embargo, no se ha identificado aún ningún ligando que pueda modular dicho receptor. Hay esfuerzos en marcha para identificar nuevos receptores acoplados a proteínas G que puedan usarse para seleccionar nuevos agonistas y antagonistas que tengan potencial profiláctico y propiedades terapéuticas.

40 Se han clonado hasta la fecha más de 300 GPCR. Mecánicamente, aproximadamente el 50-60% de todos los fármacos clínicamente relevantes actúan modulando las funciones de diversos GPCR (Cudermann *et al.*, J. Mol. Med., 73:51-63, 1995).

45 El sentido del olfato permite comunicaciones químicas entre organismos vivos desde invertebrados hasta mamíferos y el entorno. La percepción y discriminación de miles de odorizantes se realiza a través del olfato. Tal señalización química puede modular el comportamiento social de la mayoría de las especies animales que se basan en compuestos odorizantes para identificar a familiares o a la pareja, localizar alimento o reconocer el territorio por ejemplo. La capacidad de oler está determinada inicialmente por neuronas del epitelio olfativo, las neuronas sensoriales olfativas (OSN). En ellas, las moléculas odorizantes se unen a proteínas receptoras olfativas (RO), también conocidas como receptores de odorizantes. Estos RO son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Están codificados por la familia génica más grande. Mientras que en roedores se han identificado tantos como 1.300 genes de RO diferentes, se han identificado alrededor de 800 genes de RO en el genoma humano. Se cree que cada neurona olfativa expresa sólo un tipo de RO, formando por tanto la base celular de la discriminación de odorizantes por neuronas olfativas. Se sintetizan en el retículo endoplasmático, se transportan y finalmente se concentran en la membrana de la superficie celular de los cilios en la punta de la dendrita. De manera similar, se encuentran RO en el terminal axónico de OSN. Se supone que desempeñan un papel en el direccionamiento de axones a zonas del bulbo olfativo específicas de RO.

55

La mayoría de los mamíferos tienen un sistema olfativo secundario, el sistema vomeronasal. El órgano vomeronasal se localiza en la cavidad nasal y está compuesto parcialmente por neuronas sensoriales vomeronasales. Este sistema sería responsable de la detección de feromonas a través de la activación de receptores de feromonas. Sin embargo, no hay pruebas para afirmar que la detección de feromonas se realiza únicamente a través de neuronas sensoriales vomeronasales y que las neuronas sensoriales vomeronasales detectan feromonas sólo. Los receptores de feromonas son también proteínas 7TM, pero son completamente distintas de las superfamilia de RO. Aún cuando los receptores de feromonas son parte de la superfamilia de GPCR, no se ha identificado aún ninguna proteína G acoplada a estos receptores. Se han enumerado hasta la fecha dos familias de receptores de feromonas: las familias V1 R y V2R. Se han identificado receptores de ambas de las mismas en ratón (más de 300) mientras que sólo 5 receptores de la familia V1 R en seres humanos.

El gusto es también parte de la quimiosensibilidad. Se basa en la activación de receptores del gusto ubicados en la lengua y el paladar en seres humanos. Se expresan en células receptoras del gusto (TCR), parte de las papilas gustativas. Estas células son células epiteliales especializadas que entran en contacto con neuronas, que a su vez transmiten la información al cerebro. De ese modo, a diferencia de las OSN, las TCR no son células neuronales. Como los receptores olfativos, los receptores del gusto son parte de la superfamilia de GPCR. En la actualidad, se han identificado 2 familias: las familias T1 R y T2R. Mientras que la familia T1 R está constituida por tres receptores, concretamente T1R1, T1 R2 y T1R3, la familia T2R está constituida por 25 supuestos receptores en seres humanos. Los receptores T2R son responsables de la detección del sabor amargo y serían funcionales como monómeros. Sin embargo, se cree que los receptores T1R funcionan como dímeros. La dimerización conferiría especificidad a los receptores. Heterodímeros de T1R1/T1R3 detectan el sabor umami, mientras que heterodímeros de T1R2/T1R3 se activan por compuestos dulces. Además de estas dos familias, se cree que otras proteínas son receptores del gusto tales como TRMP5, un posible canal, mGluR4 que podría funcionar como receptor de umami, ASIC2, un receptor del sabor ácido, ENaC, un receptor del sabor salado, VN1, un receptor del sabor picante o TMP8, un receptor del sabor frío.

El olor, el gusto y las feromonas influyen de manera constante en el comportamiento personal de animales y seres humanos. Por tanto, es de gran importancia comprender los mecanismos de tales percepciones. Lo más particularmente, para determinar medios para influir en los mismos. Se sabe ya que los sistemas olfativo, del gusto y de las feromonas no siguen la norma de un ligando/un receptor. Se ha descrito en la bibliografía que varios ligandos activan los mismos receptores. Por tanto, dichos sistemas sensoriales son probablemente parte de un sistema en el que pueden activarse diferentes receptores por los mismos ligandos, y en el que un receptor puede modularse por diferentes ligandos.

RCC356, también denominado PHOR-1, se ha descrito y caracterizado previamente como un GPCR específico de próstata novedoso regulado por incremento en cáncer de próstata (documentos US6.790.631 y US2004/0248088). La secuencia de polinucleótido humana de RCC356 se muestra en la figura 1a; la secuencia de aminoácidos humana de RCC356 en la figura 1b. Dicha secuencia de aminoácidos muestra una o más secuencias distintivas de GPCR y secuencias distintivas de receptores olfativos. De ese modo, RCC356 puede considerarse como un receptor olfativo (RO). Que este RO pueda tener una función específica de la próstata no es excepcional. De hecho, se encontró que se expresan genes de OR en tejidos distintos del epitelio olfativo, lo que indica posibles papeles biológicos alternativos de esta clase de receptores quimiosensoriales. En particular, se ha mostrado previamente que se expresan también RO, distintos de RCC356, en células germinales, testículos, células β secretoras de insulina, bazo, zonas específicas del cerebro y corazón (Parmentier *et al.* 1992, *Nature*, 355: 453-455; Thomas *et al.* 1996, *Gene*, 178:1-5; Nef y Nef 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4766-4771; Blache *et al.* 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142:669-672; Drutel *et al.*, 1995, *Receptors Channels* 3:33-40; Ferrand *et al.* 1999, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:1137-1142; Raming *et al.*, 1998, *Receptors Channels* 6:141-151). Además, un receptor olfativo de rata expresado en el cerebro, conocido como RA1c (Raming *et al.*, 1998, *Receptor Channels* 6: 141), tiene una secuencia con el mayor grado de homología con PHOR-01. PHOR-1 es el 59,9% idéntico a RA1c en un solapamiento de 299 residuos. El probable homólogo humano de RA1c, HPRAAJ70, también muestra un grado de homología similar con PHOR-01. Se notifica que la proteína HPRAAJ70 es un GPCR específico de próstata (documentos U.S. 5.756.309, WO 96/39435), lo que confirma el hallazgo mencionado en el documento US 6.790.631. El documento 6.790.631 también menciona que PHOR-01 se restringe a la próstata normal, así como a cánceres de la próstata, riñón, útero, cuello uterino, estómago y recto. PHOR-01 también puede expresarse en otros cánceres. También se ha sugerido su papel en la regulación de la proliferación celular y la transformación. Por ejemplo, y tal como se muestra en el documento US6.790.631, PHOR1 puede desempeñar un papel crítico en la proliferación celular. En este contexto, el documento US6.790.631 propone usar PHOR-01 en composiciones y métodos terapéuticos y de diagnóstico útiles en la gestión de diversos cánceres que expresan PHOR-01, en particular de cánceres de próstata. Aunque se ha asignado un posible papel fisiológico a RCC356, reducción del tiempo de duplicación de células que sobreexpresan RCC356 (documento US6.790.631), hasta ahora no hay ninguna indicación de mediante qué ligando puede modularse dicho receptor.

El ácido isovalérico es un ácido orgánico de olor desagradable que forma parte de la formación de malos olores de secreciones humanas y animales, particularmente del sudor. Otro constituyente del sudor humano es el ácido 3-metil-2-hexenoico, de malos olores nauseabundos es el ácido propiónico y de malos olores de animales de compañía es el ácido hexenoico. Se describió previamente que dichos compuestos se reconocían por un subgénero

de receptores olfativos (documento US2003/0207337). Los receptores olfativos pertenecen a la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana (Buck *et al.*, Cell 65:175-87, 1991) que se conocen como receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los GPCR median la señalización transmembrana que controla muchas funciones fisiológicas, tales como la función endocrina, función exocrina, frecuencia cardíaca, lipólisis, metabolismo de hidratos de carbono, neurotransmisión, visión y recepción de sabores. Los receptores olfativos reconocen específicamente moléculas que provocan una sensación olfativa específica. Estas moléculas se denominan también "odorizantes". Los genes que codifican para los receptores olfativos son activos principalmente en neuronas olfativas (Axel, Sci. Amer. 273:154-59, 1995). Se expresan subtipos de receptores olfativos individuales en subconjuntos de células distribuidas en distintas zonas del epitelio olfativo (Breer, Semin.Cell Biol., 5:25-32, 1994). Pero, tal como se mencionó anteriormente, la expresión de RO no se limita al epitelio olfativo. Muchos laboratorios han demostrado la expresión de RO en otros tejidos incluyendo próstata, cerebro, pulmón, hígado, riñón, cuello uterino y mama.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona la materia expuesta en una cualquiera y todas las reivindicaciones 1 a 40 adjuntas a la misma. La materia de dichas reivindicaciones 1 a 40 se incorpora específicamente por el presente documento y pertenece a la divulgación, descripción y enseñanza de la presente memoria descriptiva.

La presente memoria descriptiva describe la identificación de ácido isovalérico (IVA) como un ligando natural del GPCR (receptor acoplado a proteínas G) RCC356. La memoria descriptiva abarca el uso de la interacción de polipéptidos de RCC356 y ácido isovalérico como la base de ensayos de selección para detectar agentes que modulan la actividad del receptor RCC356.

La memoria descriptiva también abarca métodos de diagnóstico y otros basados en la interacción RCC356/ácido isovalérico, así como kits para realizar métodos de selección y diagnóstico. En particular, la presente memoria descriptiva indica que el ácido isovalérico tiene una conexión con el desarrollo y/o la progresión de cáncer. Además, la presente memoria descriptiva sugiere que RCC356 puede desempeñar un papel en el reconocimiento de olores y actividades neurológicas.

La memoria descriptiva abarca un método de identificación de un agente que se une a RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico en presencia o en ausencia de un modulador candidato en condiciones que permiten la unión de dicho ácido isovalérico a dicho polipéptido de RCC356; y b) medir la unión de dicho polipéptido de RCC356 a dicho ácido isovalérico, en el que una disminución en la unión en presencia de dicho modulador candidato, en relación con la unión en ausencia del modulador candidato, identifica al modulador candidato como un agente que modula la función de RCC356.

La memoria descriptiva abarca además un método de detección en una muestra de la presencia de un agente se une a RCC356 en una muestra, comprendiendo dicho método a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico en presencia o en ausencia de dicha muestra en condiciones que permiten la unión de dicho ácido isovalérico a dicho polipéptido de RCC356; y b) medir la unión de dicho polipéptido de RCC356 a dicho ácido isovalérico, en el que una disminución en la unión en presencia de la muestra, en relación con la unión en ausencia del modulador candidato, indica la presencia, en la muestra, de un agente que modula la función de RCC356 en dicha muestra.

La memoria descriptiva abarca además un método de identificación de un agente que modula la función de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico en presencia o en ausencia de un modulador candidato, en condiciones que permiten la activación de dicho polipéptido de RCC356 por ácido isovalérico; y b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356, en el que un cambio en la actividad en presencia de dicho modulador candidato en relación con la actividad en ausencia de dicho modulador candidato identifica dicho modulador candidato como un agente que modula la función de RCC356.

La memoria descriptiva abarca además un método de identificación de un agente que modula la función de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con un modulador candidato; b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356 en presencia de dicho modulador candidato; y c) comparar la actividad medida en presencia de dicho modulador candidato con dicha actividad medida en una muestra en la que dicho polipéptido de RCC356 se pone en contacto con ácido isovalérico a su CE_{50} , en el que dicho modulador candidato se identifica como un agente que modula la función de RCC356 cuando la cantidad de la actividad medida en presencia del modulador candidato es al menos el 10% de la cantidad inducida por dicho ácido isovalérico presente a su CE_{50} . Según la memoria descriptiva, la cantidad de la actividad medida en presencia del modulador candidato puede ser el 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o incluso más de la cantidad inducida por ácido isovalérico presente a su CE_{50} . La presente memoria descriptiva indica además que, cuando es aplicable, en los métodos de la presente memoria descriptiva, se usa preferiblemente ácido isovalérico presente a su CE_{50} . Sin embargo, en los métodos de la presente memoria descriptiva, puede aplicarse ácido isovalérico a otras concentraciones a las que puede detectarse la activación de RCC356.

La memoria descriptiva abarca además un método de detección en una muestra de la presencia de un agente que

- modula la función de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico en presencia o en ausencia de dicha muestra; b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356; y c) comparar la cantidad de dicha actividad medida en una reacción que contiene RCC356 y ácido isovalérico sin dicha muestra con la cantidad de dicha actividad medida en una reacción que contiene RCC356, ácido isovalérico y dicha muestra, en el que un cambio en dicha actividad en presencia de dicha muestra en relación con la actividad en ausencia de dicha muestra indica la presencia de un agente que modula la función de RCC356 en dicha muestra.
- La memoria descriptiva abarca además un método de detección en una muestra de la presencia de un agente que modula la función de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con dicha muestra; b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356 en presencia de dicha muestra; y c) comparar dicha actividad medida en presencia de dicha muestra con dicha actividad medida en una reacción en la que dicho polipéptido de RCC356 se pone en contacto con ácido isovalérico presente a su CE_{50} , en el que se detecta un agente que modula la función de RCC356 si la cantidad de la actividad medida en presencia de dicha muestra es al menos el 10% de la cantidad inducida por ácido isovalérico presente a su CE_{50} .
- Según la presente memoria descriptiva, cuando se usan métodos de unión el ácido isovalérico puede estar marcado de manera detectable. En dichos métodos, el ácido isovalérico puede marcarse de manera detectable con un resto seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, un fluoróforo y un extintor de fluorescencia. Alternativamente, el ácido isovalérico puede marcarse de manera detectable con un resto detectable por RMN.
- En cualquiera de los métodos anteriores, la puesta en contacto puede realizarse *in vitro* en o sobre una célula que expresa dicho polipéptido de RCC356. Según la presente invención, dicha célula puede ser, pero sin limitarse a, células de riñón embrionario humano (Hek293), células de hámster chino (CHO), células de mono (COS), células olfativas primarias, células de *Xenopus*, células de insecto, levaduras o bacterias.
- En cualquiera de los métodos anteriores, la puesta en contacto puede realizarse *in vitro* en o sobre liposomas sintéticos (véase Tajib *et al.*, 2000, Nature Biotechnology 18: 649 - 654), o membranas en gemación inducidas por virus que contienen un polipéptido de RCC356 (véase el documento WO01002551.2001).
- En cualquiera de los métodos anteriores, el método puede realizarse usando una fracción de membrana de células que expresan dicho polipéptido de RCC356.
- En cualquiera de los métodos anteriores, el método puede realizarse preferiblemente sobre un chip de proteínas.
- En cualquiera de los métodos *in vitro* anteriores, la medición puede realizarse preferiblemente usando un método seleccionado de desplazamiento de marcador, resonancia de plasmón superficial, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, extinción de fluorescencia y polarización de fluorescencia.
- En cualquiera de los métodos anteriores, el agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico y una molécula orgánica pequeña incluyendo pero sin limitarse a un compuesto odorizante y una feromona.
- Según la presente memoria descriptiva, cuando se usa un ensayo funcional, la etapa de medición de una actividad de señalización del polipéptido de RCC356 puede comprender detectar un cambio en el nivel de un segundo mensajero.
- La etapa de medición de una actividad de señalización puede comprender la medición de la unión/acoplamiento o intercambio de un nucleótido de guanina, actividad adenilato ciclasa, AMPc, actividad proteína cinasa C, actividad proteína cinasa A, descomposición de fosfatidilinositol, diacilglicerol, inositol trifosfato, calcio intracelular, flujo de calcio, ácido araquidónico, actividad MAP cinasa, actividad tirosina cinasa, ensayo de melanóforos, ensayo de internalización de receptores o expresión de gen indicador. Cuando se mide la unión/acoplamiento o intercambio de proteína G, de todas las subunidades $G\alpha$ posibles se estudia preferiblemente el comportamiento de la subunidad alfa-olf de proteínas G de proteínas de unión a GTP, también G-olf. La secuencia de la subunidad G-olf humana se ha depositado anteriormente en Genebank con el número de registro L10665. Sin embargo, puede usarse y estudiarse subunidades G-olf de otras especies.
- Preferiblemente, la medición de la actividad de señalización puede comprender usar un ensayo de fluorescencia o luminiscencia. Los ensayos de fluorescencia o luminiscencia pueden comprender el uso de fluoróforos sensibles a Ca^{2+} incluyendo fluo3, Fluo4 o Fura (Molecular probes); familia Ca3-kit (Molecular Device) y aequorina. Además, dichos ensayos pueden aplicar un lector luminiscente o fluorimétrico automatizado tal como FDSS (Hamamatsu) o FLIPR (Molecular Device).
- La memoria descriptiva abarca además un método de modulación de la actividad de un polipéptido de RCC356 en una célula, comprendiendo dicho método la etapa de suministrar a dicha célula ácido isovalérico que modula la actividad de un polipéptido de RCC356, de manera que se modula la actividad de RCC356.
- En cualquiera de los métodos anteriores, el método puede ser un método de selección de alto rendimiento.

En cualquiera de los métodos anteriores, el agente puede ser parte de una biblioteca química o extractos orgánicos animales. Dichos extractos orgánicos animales pueden ser, pero sin limitarse a, extractos preparados a partir de cáncer de próstata, suero sanguíneo, cerebro.

5 La memoria descriptiva abarca además un agente relacionado con ácido isovalérico identificado o detectado mediante cualquiera de los métodos anteriores. Dicho agente relacionado con ácido isovalérico puede ser un agonista, un antagonista o un agonista inverso para RCC356.

La memoria descriptiva también abarca una composición que comprende un agente relacionado con ácido isovalérico identificado o detectado mediante cualquiera de los métodos anteriores.

10 Según la presente memoria descriptiva, el agente identificado o detectado mediante cualquiera de los métodos anteriores, o la composición que comprende dicho agente, puede usarse para la preparación de un medicamento. Alternativamente, estos pueden usarse para la preparación de odorizantes o antagonistas de odorizantes. Por ejemplo, puede usarse un agonista de RCC356 como repelente, un antagonista de RCC356 como desodorante.

15 Preferiblemente, la composición o el agente mencionado anteriormente puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con RCC356 o un trastorno relacionado con RCC356; en el que dicha enfermedad o trastorno se elige preferentemente del grupo que consiste en cáncer y metástasis tumoral. Según la presente memoria descriptiva, dicha enfermedad o trastorno puede elegirse del grupo que consiste en cáncer de próstata, cuello uterino, recto, estómago y riñón.

20 Preferiblemente, dicho agente o composición puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con RCC356 o un trastorno relacionado con RCC356; en el que dicha enfermedad o trastorno es preferentemente una enfermedad o trastorno del SNC. Según la presente memoria descriptiva, dicho trastorno o enfermedad del SNC puede ser epilepsia.

La presente memoria descriptiva también abarca una composición que comprende un polipéptido de RCC356 aislado y ácido isovalérico.

25 La presente memoria descriptiva también se refiere al uso de ácido isovalérico para la producción de una composición que comprende un polipéptido de RCC356 aislado y dicho ácido.

La presente memoria descriptiva se refiere además al uso de ácido isovalérico para la producción de un kit para seleccionar agentes que modulan la señalización de RCC356, para la producción de un kit para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad caracterizada por la desregulación de la señalización de RCC356, o en combinación con RCC356 para la producción de un kit para seleccionar odorizantes o antagonistas de odorizantes.

30 Además, la presente memoria descriptiva abarca el uso de ácido isovalérico como ligando para RCC356.

La presente memoria descriptiva abarca además el uso de ácido isovalérico para la preparación de un medicamento. Según la presente memoria descriptiva, dicho medicamento puede usarse para el tratamiento de una enfermedad relacionada con RCC356 o un trastorno relacionado con RCC356; en el que dicha enfermedad o trastorno se elige preferentemente del grupo que consiste en cáncer y metástasis tumoral. En particular, dicho medicamento puede usarse para el tratamiento de cáncer de próstata, cuello uterino, útero, recto, estómago y/o riñón.

35 Alternativamente, dicho medicamento puede usarse para el tratamiento de una enfermedad relacionada con RCC356 o un trastorno relacionado con RCC356, en el que dicha enfermedad o trastorno es preferentemente una enfermedad o trastorno del SNC. En particular, dicho medicamento puede usarse para el tratamiento de epilepsia.

40 La presente memoria descriptiva también se refiere a un anticuerpo que reconoce el complejo IVA/RCC356 o fragmentos del mismo.

La memoria descriptiva también se refiere al uso de fragmentos de RCC356 o anticuerpos que reconocen RCC356 o anticuerpos que reconocen el complejo IVA/RCC356, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del SNC. Dicho trastorno o enfermedad del SNC puede ser epilepsia.

45 La memoria descriptiva también se refiere al uso de fragmentos de RCC356, anticuerpos que reconocen RCC356 o anticuerpos que reconocen el complejo IVA/RCC356 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico).

Alternativamente, pueden usarse anticuerpos que reconocen el complejo IVA/RCC356 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o metástasis tumoral.

50 La memoria descriptiva abarca además un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una muestra de tejido con ácido isovalérico; b) detectar la unión de dicho ácido a dicha muestra de tejido; y c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión en relación con dicho patrón es un diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de RCC356.

5 La memoria descriptiva abarca además un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una muestra de tejido con un anticuerpo específico para ácido isovalérico o un anticuerpo específico para el complejo IVA/RCC356; b) detectar la unión de dicho anticuerpo a dicha muestra de tejido; y c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión en relación con el patrón es un diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de RCC356.

10 La memoria descriptiva abarca además un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una muestra de tejido con un anticuerpo específico para RCC356 y un anticuerpo específico para ácido isovalérico o un anticuerpo específico para el complejo IVA/RCC356; b) detectar la unión de dichos anticuerpos a dicha muestra de tejido; y c) comparar la unión detectada en la etapa (b) con un patrón, en el que una diferencia en la unión de cualquier anticuerpo o ambos, en relación con dicho patrón, es un diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de RCC356.

15 La memoria descriptiva abarca además un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356, comprendiendo dicho método: a) cuantificar el contenido en ácido isovalérico de una muestra de tejido; y b) comparar la cantidad de dicho ácido cuantificada en la etapa (a) con un patrón, en el que una diferencia en dicha cantidad de ácido isovalérico en relación con dicho patrón es un diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de RCC356.

20 La enfermedad relacionada con RCC356 o el trastorno relacionado con RCC356 diagnosticado o pronosticado usando un método según la presente memoria descriptiva puede elegirse del grupo que consiste en pero no se limita a cáncer y metástasis tumoral. En particular, dicha enfermedad o trastorno puede elegirse del grupo que consiste en pero no se limita a cáncer de próstata, cuello uterino, útero, recto, estómago y riñón.

25 Alternativamente, la enfermedad relacionada con RCC356 o el trastorno relacionado con RCC356 diagnosticado o pronosticado usando un método según la presente memoria descriptiva puede ser una enfermedad o trastorno del SNC. Por ejemplo, dicho trastorno o enfermedad del SNC puede ser epilepsia.

La presente memoria descriptiva indica además que el anticuerpo específico para el complejo IVA/RCC356 puede usarse para diagnosticar o pronosticar un trastorno o enfermedad del SNC o una disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico). Tal como se indicó anteriormente, dicho trastorno o enfermedad del SNC puede ser epilepsia.

30 La presente memoria descriptiva también abarca un método de diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico) o una enfermedad o trastorno relacionado con el SNC, comprendiendo dicho método: a) cuantificar el contenido en RCC356 de una muestra de tejido; y b) comparar la cantidad de dicho receptor cuantificado en la etapa (a) con un patrón, en el que una diferencia en dicha cantidad de RCC356 en relación con dicho patrón es un diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa o un diagnóstico o pronóstico de enfermedad o trastorno relacionado con el SNC. Según la presente memoria descriptiva, dicho trastorno o enfermedad relacionada con el SNC puede ser epilepsia. En dicho método, la cuantificación puede realizarse usando anticuerpos frente a RCC356, anticuerpos frente a IVA/RCC356 o ácido isovalérico.

35 La presente memoria descriptiva invención abarca además un método de diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico) o una enfermedad o trastorno relacionado con el SNC, comprendiendo dicho método: a) cuantificar el ARNm que codifica para RCC356 y/o verificar la exactitud de la secuencia de RCC356 en comparación con la secuencia de RCC356 de tipo natural en una muestra de tejido; y b) comparar la cantidad y/o la exactitud de dicho ácido nucleico cuantificada o determinada en la etapa (a) con un patrón, en el que una diferencia en dicha cantidad o una diferencia en la secuencia de RCC356 en relación con dicho patrón es un diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico) o un diagnóstico o pronóstico de enfermedad o trastorno relacionado con el SNC. En dicho método, dicho trastorno o enfermedad relacionada con el SNC puede ser epilepsia.

40 La presente memoria descriptiva también abarca un método de diagnóstico o pronóstico de cáncer o metástasis tumoral, comprendiendo dicho método: a) cuantificar el contenido en RCC356 de una muestra de tejido usando anticuerpos frente a IVA/RCC356; y b) comparar la cantidad de dicho receptor en la etapa a) con un patrón, en el que una diferencia en dicha cantidad de RCC356 en relación con dicho patrón es un diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa o un diagnóstico o pronóstico de cáncer o metástasis tumoral.

45 La memoria descriptiva abarca además un kit que comprende un polipéptido de RCC356 aislado, ácido isovalérico y materiales de envasado para los mismos; un polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido de RCC356, ácido isovalérico y materiales de envasado para los mismos; un kit que comprende una célula que expresa un polipéptido de RCC356 o membranas del mismo, ácido isovalérico y materiales de envasado para los mismos. Dicha célula puede estar transformada con un polinucleótido que codifica para dicho RCC356.

50 Según la presente memoria descriptiva, los kits anteriormente mencionados pueden usarse para varios fines. Por ejemplo, dicho kit puede usarse para seleccionar agentes que modulan la señalización de RCC356, para seleccionar odorizantes o agentes anti-odorizantes, o para seleccionar compuestos anticancerígenos o compuestos para tratar

una enfermedad o trastorno del SNC. Cuando se buscan compuestos anticancerígenos, se tiene como objetivo lo más particularmente el cáncer de próstata, cuello uterino, útero, recto, estómago y riñón; cuando se buscan compuestos para tratar trastornos del SNC, se tiene como objetivo lo más particularmente los tratamientos de especialmente epilepsia.

5 Además, la presente memoria descriptiva también se refiere al uso de un kit que comprende ácido isovalérico para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356.

10 Además, la presente memoria descriptiva se refiere al uso de un kit que comprende un anticuerpo frente a ácido isovalérico para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por la desregulación de la señalización de RCC356. Según la presente memoria descriptiva, dicha enfermedad o trastorno puede ser cáncer.

La presente memoria descriptiva abarca además el uso de un kit que comprende RCC356, para el diagnóstico o pronóstico de enfermedad relacionada con el SNC. Dicho kit también puede usarse para el diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico).

15 La presente memoria descriptiva también abarca el uso de un animal transgénico para RCC356 o un ortólogo del mismo para estudiar el efecto del ácido isovalérico sobre el tratamiento y/o la progresión de cáncer. El cáncer para el que se estudia la progresión y/o el tratamiento puede ser cáncer de próstata, cuello uterino, útero, recto, estómago y riñón. Con el término ortólogo quiere decirse un gen con función similar a RCC356 en una especie relacionada evolutivamente.

20 La presente memoria descriptiva también abarca el uso de un animal transgénico para RCC356 o un ortólogo del mismo para estudiar la progresión de enfermedades o trastornos del SNC y/o el tratamiento de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico). Las enfermedades o trastornos del SNC para los que se estudia la progresión y/o tratamiento pueden ser epilepsia.

25 Según la presente memoria descriptiva, puede usarse un animal transgénico que sobreproduce ácido isovalérico para estudiar la progresión de cáncer y/o el tratamiento. Puede inducirse sobreproducción en un animal a través de por ejemplo la inhibición de la degradación de IVA.

30 Alternativamente, puede usarse un animal transgénico (no humano) deficiente en RCC356 para estudiar el efecto de RCC356 sobre la progresión de disfunción olfativa (relacionada con ácido isovalérico). Además, puede usarse un animal transgénico deficiente en RCC356 para estudiar el efecto de RCC356 sobre la progresión de enfermedades o trastornos del SNC. En la presente descripción, RCC356 puede entenderse como ortólogo de RCC356 según el modelo animal elegido.

35 En todos los métodos, agentes, usos, composiciones o kits de la presente memoria mencionados anteriormente puede usarse, hacerse referencia a, aplicarse o incorporarse un equivalente de ácido isovalérico o un anticuerpo frente a dicho compuesto equivalente que se une específicamente a y activa una actividad de señalización de un polipéptido de RCC356 representado en la figura 1b. Dicho equivalente de ácido isovalérico puede elegirse del grupo que consiste en ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácidos isohexanoicos, ácido heptanoico, ácidos isoheptanoicos, ácido octanoico, ácidos isoctanoicos, ácido nonanoico, ácidos isononanoicos, ácido valproico, isovaleramida, ácido caproico, ácido oenantílico, ácido caprílico, ácido hexahidrobenzoico, ácido pelargónico y ácido 5-hexenoico. En particular, dicho equivalente puede elegirse del grupo que consiste en ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido oenantílico, ácido caprílico, ácido hexahidrobenzoico, ácido pelargónico y ácido 5-hexenoico.

40 Además, en todos los métodos, usos, composiciones o kits de la presente memoria descriptiva mencionados anteriormente el polipéptido de RCC356 puede tener una identidad de al menos el 20% o identidad superior, tal como el 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o incluso el 100% con el polipéptido representado en la figura 1b pero con actividad comparable a dicho polipéptido de RCC356. Un experto en la técnica sabe cómo evaluar dicha actividad dependiendo del ensayo usado.

45 Además, en todos los métodos, usos, composiciones o kits de la presente memoria descriptiva mencionados anteriormente el polipéptido de RCC356 puede ser una quimera o un fragmento activo del mismo.

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de RCC356" se refiere a un polipéptido que tiene dos propiedades esenciales: 1) un polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 20%, y preferiblemente una identidad de aminoácidos del 80%, 90%, 95% o superior, incluyendo del 100%, con la secuencia representada en la figura 1 b; y 2) un polipéptido de RCC356 tiene actividad de RCC356, es decir, el polipéptido se une a ácido isovalérico o un equivalente del mismo. Dicha homología puede referirse al polipéptido completo o sólo parte del polipéptido tal como el dominio CDR (dominio de unión a ligando del receptor). Según Pilpel y Lancet (Protein Science 8:969-977, 1999) el dominio CDR de un GPCR puede definirse siguiendo las indicaciones publicadas: TM3-n.º 4, TM3-n.º 8, TM3-n.º 11, TM3-n.º 12, TM3-n.º 15, TM4-n.º 11, TM4-n.º 15, TM4-n.º 19, TM4-n.º 22, TM4-n.º 23, TM4-n.º 26, TM5-n.º 3, TM5-n.º 6, TM5-n.º 7, TM5-n.º 10, TM5-n.º 11 y TM5-n.º 13, en los que TMx indica la región transmembrana de dicho receptor, y n.º indica la posición de aminoácido dentro de

dicha región. De manera óptima, un “polipéptido de RCC356” también tiene actividad de señalización de RCC356 tal como se define en el presente documento. Sin embargo, la identificación de COR de receptores de 7TM es muy arriesgada y depende del algoritmo aplicado para definir TM. Además, según Pilpel y Lancet, RCC356 tendría sólo 4 TM. Tal como se mencionó anteriormente, dicho polipéptido de RCC356 también incluye ortólogos de RCC356.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “polinucleótido de RCC356” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de RCC356 tal como se define en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “actividad de RCC356” se refiere a la unión específica de ácido isovalérico o un equivalente del mismo por un polipéptido de RCC356.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “actividad de señalización de RCC356” se refiere a la iniciación o propagación de la señalización por un polipéptido de RCC356. La actividad de señalización de RCC356 se monitoriza midiendo una etapa detectable en una cascada de señalización sometiendo a ensayo uno o más de los siguientes: estimulación del intercambio de GDP por GTP en una proteína G y lo más particularmente G-olf; alteración de la actividad adenilato ciclasa; modulación de la proteína cinasa C; modulación de la proteína cinasa A; descomposición de fosfatidilinositol (generando los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato); flujo de calcio intracelular; activación de MAP cinasas; modulación de tirosina cinasas; ensayo de internalización; modulación de un gen o actividad de gen indicador; o ensayo de melanóforos. Una etapa detectable en una cascada de señalización se considera iniciada o mediada si la actividad medible se ve alterada en un 10% o más por encima o por debajo de un nivel de referencia establecido en ausencia sustancial de ácido isovalérico en relación con cualquiera de los ensayos de actividad de RCC356 descritos en el presente documento a continuación. La actividad medible puede medirse directamente tal como en, por ejemplo, la medición de los niveles de AMPc o diacilglicerol. Alternativamente, la actividad medible puede medirse indirectamente tal como en, por ejemplo, un ensayo de gen indicador. Para la mayoría de estos ensayos están disponibles kits en el mercado.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “etapa detectable” se refiere a una etapa que puede medirse, o bien directamente, por ejemplo, mediante la medición de un segundo mensajero o la detección de una proteína modificada (por ejemplo, fosforilada), o bien indirectamente, por ejemplo, monitorizando un efecto aguas abajo de esa etapa. Por ejemplo, la activación de la adenilato ciclasa da como resultado la generación de AMPc. La actividad de la adenilato ciclasa puede medirse directamente, por ejemplo, mediante un ensayo que monitoriza la producción de AMPc en el ensayo, o indirectamente, mediante la medición de los niveles reales de AMPc y/o el flujo de calcio.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” se refiere a una población de moléculas, por ejemplo, polipéptidos o polinucleótidos, cuya composición es inferior al 50% (en peso), preferiblemente inferior al 40% y lo más preferiblemente del 2% o menos, de moléculas contaminantes de una naturaleza diferente. Cuando se aplica el término “aislado” a un polipéptido de RCC356, pretende abarcar específicamente un polipéptido de RCC356 que está asociado con o incrustado en una membrana lipídica.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “ácido isovalérico” se refiere a una molécula química conocida por un químico experto. Moléculas equivalentes a ácido isovalérico se refieren pero no se limitan a ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido oenanílico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido isocaproico, ácido isooenantílico, ácido isocaprílico, ácido isopelargónico, ácido hexahidrobenzoico, ácido 5-hexenoico, ácido valproico, isovaleramida o un derivado de los mismos. Todos dichos ácidos pueden unirse específicamente y activar una actividad de señalización de un polipéptido de RCC356. La expresión “se une específicamente” significa que el ácido isovalérico tiene una CE_{50} , CI_{50} o una K_d de 1 mM o menos. Los derivados pueden ser compuestos químicos que portan en al menos una posición una diferencia en comparación con el compuesto del que se derivan. Una fórmula general para tal “equivalente isovalérico” puede ser $(CH_3)_x-(CH_2)_y-(CH)_z-COOH$. Además, pueden injertarse en dicha fórmula general diferentes radicales que contienen diferentes funciones químicas incluyendo pero sin limitarse a amina, cetona, éster, éter y alcohol.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “compuesto candidato” y “modulador candidato” se refieren a una composición que está evaluándose para determinar su capacidad para modular la unión de ligando a un polipéptido de RCC356 o la capacidad para modular una actividad de un polipéptido de RCC356. Moduladores candidatos pueden ser compuestos naturales o sintéticos incluyendo, por ejemplo, moléculas pequeñas, compuestos contenidos en extractos de células animales, vegetales, bacterianas o fúngicas, así como medio condicionado de tales células.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “molécula pequeña” se refiere a un compuesto que tiene una masa molecular de menos de 3000 Daltons, preferiblemente menos de 2000 ó 1500, todavía más preferiblemente menos de 1000 y lo más preferiblemente menos de 600 Daltons. Una “molécula orgánica pequeña” es una molécula pequeña que comprende carbono.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cambio en la unión” o “cambio en la actividad” y las expresiones equivalentes “diferencia en la unión” o “diferencia en la actividad” se refieren a un aumento o una disminución de al menos el 10% en la unión o actividad de señalización en un ensayo dado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones que permiten la unión de ácido isovalérico a RCC356” se refiere a condiciones de, por ejemplo, temperatura, concentración salina, pH y concentración de proteínas en las que el ácido isovalérico se une a RCC356. Las condiciones de unión exactas variarán dependiendo de la naturaleza del ensayo, por ejemplo, si el ensayo usa células viables o sólo una fracción de membrana de las células. Sin embargo, debido a que RCC356 es una proteína de la superficie celular, y debido a que el ácido isovalérico normalmente interacciona con RCC356 en la superficie celular, las condiciones favorecidas incluirán generalmente sal (90 mM) y pH (de aproximadamente 7,0 a 8,0) fisiológicos. Las temperaturas para la unión pueden variar desde 4°C hasta 37°C, pero estarán preferiblemente entre temperatura ambiente y aproximadamente 37°C. La concentración de ácido isovalérico y polipéptido de RCC356 en una reacción de unión también variará, pero será preferiblemente de aproximadamente 10 µM (por ejemplo, en una reacción con ácido isovalérico trazador radiomarcado, en la que la concentración está generalmente por debajo de la K_d) a 1 mM (por ejemplo, ácido isovalérico como competidor). Como ejemplo, para un ensayo de unión usando células que expresan RCC356 y ácido isovalérico purificado, marcado la unión se realiza usando ácido isovalérico marcado 10 µM, ácido isovalérico frío 1 mM y 25.000 células a 27°C en 250 µl de un tampón de unión que consiste en HEPES 50 mM (pH 7,4), $CaCl_2$ 1 mM y BSA libre de ácidos grasos al 0,5%.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” se refiere a la fuente de moléculas que están sometidos a prueba para detectar la presencia de un agente que modula la unión a o la actividad de señalización de un polipéptido de RCC356. Una muestra puede ser una muestra medioambiental, un extracto natural de células o tejidos animales, vegetales, de levaduras o bacterianos, una muestra clínica, una muestra sintética o un medio condicionado de células recombinantes o un proceso de fermentación. Un “tejido” es un agregado de células que realizan una función particular en un organismo. El término “tejido” tal como se usa en el presente documento se refiere a material celular de una región fisiológica particular. Las células en un tejido particular pueden comprender varios tipos de células diferentes. Un ejemplo no limitativo de esto sería tejido cerebral que comprende además neuronas y células gliales, así como células endoteliales capilares y células sanguíneas, contenidas todas en una muestra o sección de tejido dado. Además de tejidos sólidos, el término “tejido” también pretende abarcar tejidos no sólidos, tal como sangre.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “fracción de membrana” se refiere a una preparación de membranas lipídicas celulares que comprende un polipéptido de RCC356. Tal como se usa la expresión en el presente documento, una “fracción de membrana” es distinta de un homogenado celular porque al menos una parte (es decir, al menos el 10%, y preferiblemente más) de los constituyentes celulares no asociados a la membrana se ha eliminado. La expresión “asociado a membrana” se refiere a los constituyentes celulares que o bien están integrados en una membrana lipídica o bien están físicamente asociados con un componente que está integrado en una membrana lipídica.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “disminución en la unión” se refiere a una disminución de al menos el 10% en la unión de ácido isovalérico u otro agonista a un polipéptido de RCC356 tal como se mide en un ensayo de unión tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “segundo mensajero” se refiere a una molécula, generada o que se hace que varíe en concentración por la activación de un receptor acoplado a proteínas G que participa en la transducción de una señal a partir de ese GPCR. Ejemplos no limitativos de segundos mensajeros incluyen AMPc, diacilglicerol, inositol trifosfatos y calcio intracelular. La expresión “cambio en el nivel de un segundo mensajero” se refiere a un aumento o disminución de al menos el 10% en el nivel detectado de un segundo mensajero dado en relación con la cantidad detectada en un ensayo realizado en ausencia de un modulador candidato.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “ensayo basado en aequorina” se refiere a un ensayo para detectar la actividad de GPCR que mide el flujo de calcio intracelular inducido por GPCR activados, en el que el flujo de calcio intracelular se mide mediante la luminiscencia de aequorina expresada en la célula.

Tal como se usa en el presente documento, el término “unión” se refiere a la asociación física de un ligando (por ejemplo, ácido isovalérico) con un receptor (por ejemplo, RCC356). Tal como se usa el término en el presente documento, la unión es “específica” si se produce con una CE_{50} o una K_d de 100 nM o menos, generalmente en el intervalo de 100 µM a 1000 µM. Usando un ensayo funcional de odorizante las CE_{50} encontradas son habitualmente de aproximadamente 10, 100 y incluso 1 mM, dichas señales pueden considerarse específicas (véase la figura 3). La unión de odorizantes puede considerarse específica si la CE_{50} o K_d es de 1000 µM, 950 µM, 900 µM, 850 µM, 800 µM, 750 µM, 700 µM, 650 µM, 600 µM, 550 µM, 500 µM, 450 µM, 400 µM, 350 µM, 300 µM, 250 µM, 200 µM, 150 µM, 100 µM, 75 µM, 50 µM, 25 µM o 10 µM, 1 µM, 950 nM, 900 nM, 850 nM, 800 nM, 750 nM, 700 nM, 650 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 450 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM o 10 nM, 1 nM, 950 pM, 900 pM, 850 pM, 800 pM, 750 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 550 pM, 500 pM, 450 pM, 400 pM, 350 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 150 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM o 10 pM o menos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ CE_{50} ” se refiere a la concentración de un agente a la que una actividad dada, incluyendo la unión de ácido isovalérico u otro ligando y una actividad funcional de un polipéptido de RCC356, es el 50% de la máxima para la actividad de RCC356 medible usando el mismo ensayo. Dicho de manera diferente, la “ CE_{50} ” es la concentración de agente que produce el 50% de activación, cuando se fije el 100% de

- 5 activación a la cantidad de actividad que no aumenta con la adición de más agonista. Debe indicarse que la “CE50 de un equivalente de ácido isovalérico” variará con la identidad del ácido; por ejemplo, moléculas de ácido isovalérico equivalentes pueden tener valores de CE₅₀ superiores a, inferiores a iguales que el ácido isovalérico. Por tanto, cuando se usa un equivalente de ácido isovalérico, un experto en la técnica puede determinar la CE₅₀ para ese equivalente según métodos convencionales. La CE₅₀ de un equivalente de ácido isovalérico dado se mide realizando un ensayo para una actividad de una cantidad fijada de polipéptido de RCC356 en presencia de dosis del equivalente de ácido isovalérico que aumentan al menos hasta que la respuesta de RCC356 se satura o es máxima, y entonces representando gráficamente la actividad de RCC356 medida frente a la concentración del ácido usado.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “Kd” es una constante de disociación o la concentración de ligando a la que la mitad de los receptores están unidos al ligando en el equilibrio.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “CI₅₀” es la concentración de un antagonista o agonista inverso que reduce la activación máxima de un receptor RCC356 en un 50%.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “marcado de manera detectable” se refiere a la propiedad de una molécula, por ejemplo, un ácido isovalérico o un equivalente del mismo, que tiene una modificación estructural. Dicha modificación se introduce a través de la incorporación o adición de un grupo funcional. Dicho grupo funcional (marcador) puede detectarse fácilmente. Los marcadores detectables incluyen pero no se limitan a compuestos fluorescentes, compuestos isotópicos, compuestos quimioluminiscentes, marcadores de punto cuántico. Ejemplos de radioisótopos que pueden añadirse a la estructura de ácido isovalérico, o equivalentes, pueden ser ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³H. Ejemplos de radioisótopos que pueden incorporarse a la estructura de ácido isovalérico, o equivalentes, pueden ser ³H o ¹⁴C. Los diversos medios de detección incluyen pero no se limitan a medios espectroscópicos, fotoquímicos, radioquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “etiqueta de afinidad” se refiere a un marcador, unido a una molécula de interés (por ejemplo, un polipéptido de RCC356), que confiere a la molécula marcada la capacidad de unirse específicamente a un reactivo que se une al marcador. Las etiquetas de afinidad incluyen, pero no se limitan a un epítipo para un anticuerpo (conocido como “etiquetas de epítipo”), biotina, 6X His, Myc, FLAG y GST. Pueden usarse etiquetas de afinidad para la detección, así como para la purificación de las especies marcadas.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “disminución en la unión” se refiere a una disminución de al menos el 10% en la cantidad de unión detectada en un ensayo dado con un modulador conocido o del que se sospecha de RCC356 en relación con la unión detectada en un ensayo que carece de ese modulador conocido o del que se sospecha.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “administrar”, cuando se usa en referencia a un fármaco o agente, significa la adición del fármaco o agente a una mezcla de ensayo, o a una célula en cultivo. El término también se refiere a la administración del fármaco o agente a un animal. Tal administración puede ser, por ejemplo, mediante inyección (en un portador adecuado, por ejemplo agua o solución salina estéril) o mediante inhalación, o mediante una vía oral, transdérmica, rectal, vaginal u otra vía común de administración de fármacos.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “receptor acoplado a proteínas G” o “GPCR” se refiere a un polipéptido asociado a la membrana con 7 dominios transmembrana de alfa hélice. Los GPCR funcionales se asocian con un ligando o agonista y también se asocian con y activan proteínas G. RCC356 es un GPCR.
- 40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “receptor olfativo” es un GPCR con secuencia distintiva de RO tal como se define en Zozulya *et al*, Genome Biology 2001 2(6) research 0018.1-0018.12.
- Tal como se usa en el presente documento, la expresión “agente que modula la función de un polipéptido de RCC356” es una molécula que aumenta o disminuye la actividad de RCC356, incluyendo compuestos que cambian la unión de ácido isovalérico o equivalentes del mismo, y cambian las actividades de señalización aguas abajo de RCC356.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “animal transgénico” se refiere a cualquier animal, preferiblemente un mamífero no humano, ave, pez o un anfibio, en el que una o más de las células del animal contienen ácido nucleico heterólogo introducido por medio de la intervención humana, tal como mediante técnicas transgénicas bien conocidas en la técnica. El ácido nucleico se introduce en la célula, directa o indirectamente mediante introducción en un precursor de la célula, por medio de manipulación genética deliberada, tal como mediante microinyección o mediante infección con un virus recombinante. La expresión manipulación genética no incluye cruzamiento clásico, o fertilización *in vitro*, sino más bien se refiere a la introducción de una molécula de ADN recombinante. Esta molécula puede integrarse dentro de un cromosoma, o puede ser ADN de replicación extracromosómica. En los animales transgénicos típicos descritos en el presente documento, el transgén provoca que las células expresen una forma recombinante de uno de los polipéptidos del sujeto, por ejemplo formas o bien agonistas o bien antagonistas. Sin embargo, también se contemplan animales transgénicos en los que el gen recombinante es silencioso, como por ejemplo, los constructos dependientes de recombinasa FLP o CRE descritos a continuación. Además, “animal transgénico” también incluye los animales recombinantes en los que se provoca la alteración génica de uno o más genes mediante intervención humana, incluyendo tanto recombinación como
- 50
- 55

técnicas antisentido.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” es la molécula de inmunoglobulina convencional, así como fragmentos de la misma que también son específicamente reactivos con uno de los polipéptidos del sujeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos seleccionarse para
 10 determinar su utilidad de la misma manera que se describe a continuación en el presente documento para anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos $F(ab)_2$ tratando un anticuerpo con pepsina. El fragmento $F(ab)_2$ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo de la presente memoria descriptiva pretende incluir además moléculas biespecíficas, de cadena sencilla y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. En realizaciones preferidas, los anticuerpos, el anticuerpo comprende además un marcador unido al mismo y que puede detectarse (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto quimioluminiscente, enzima o cofactor enzimático).

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “compuesto anticancerígeno” se refiere a cualquier compuesto que detiene o inhibe la progresión o el desarrollo del cáncer. Tal como se mencionó anteriormente, el cáncer que puede tratarse con dicho compuesto anticancerígeno puede ser cualquier cáncer o metástasis tumoral. Además, dicho compuesto puede funcionar sobre la inhibición o detención de la proliferación celular, o sobre la supervivencia de células en proliferación, pero también puede tener un efecto sobre otras actividades celulares.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “agente anti-odorizante” se refiere a cualquier agente que detiene o inhibe la percepción de olores por un animal. Dicha percepción puede someterse a ensayo usando estudios con animales, estudios *ex vivo* o *in vitro* que simulan o son representativos de la percepción de olores *in vivo*. Ejemplos de percepciones de olores pueden ser, pero no se limitan a, aldehído, afrutado ligero, afrutado fuerte, aromático dulce, balsámico, aromático picante, tabaco, musgo del roble, cuero, animal, ámbar, a madera, conífera, herbal picante, herbáceo, verde, cítrico.

25 Con la expresión “desregulación de la actividad de RCC356” quiere decirse que la actividad de RCC356 puede no realizarse en comparación con un estado normal en el que se encuentra dicho receptor. Dicha desregulación puede resultar de un estado en el que el receptor RCC356 no se estimula correctamente por un ligando específico de RCC356 o de un estado en el que la estimulación de RCC356 se transmite de un modo diferente a las molécula de señalización en comparación con el receptor RCC356 de tipo natural.

30 Con la expresión “método de diagnóstico” quiere decirse un método mediante el cual puede detectarse una enfermedad o trastorno, en dicha situación existen ya indicaciones o signos medibles de la presencia y/o desarrollo de dicha enfermedad o trastorno en el paciente.

Con la expresión “método de pronóstico” quiere decirse un método mediante el cual se mide la posibilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno, en dicha situación no existen o apenas son visibles indicaciones o signos de la presencia y/o el desarrollo de dicha enfermedad o trastorno en el paciente.

35 Con “equivalente isovalérico” quiere decirse una molécula que tiene un efecto igual o comparable en comparación con ácido isovalérico. Se enumeran anteriormente ejemplos de dicho equivalente, pero no se limitan a dichos compuestos. La descripción proporciona suficiente información, en combinación con el conocimiento general común, de modo que un experto puede determinar si un compuesto puede considerarse como un equivalente isovalérico o no. Una fórmula general para tal “equivalente isovalérico” puede ser $(CH_3)_x(CH_2)_y(CH)_zCOOH$. Además, pueden
 40 injertarse en dicha fórmula general diferentes radicales que contienen diferentes funciones químicas incluyendo pero sin limitarse a amida, cetona, éster, éter y alcohol.

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1: Secuencias de RCC356. Se muestran la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos traducida que codifica para la región codificante de longitud completa de RCC356. Dichas secuencias se han dado a conocer anteriormente en el documento US6.790.631.

Figura 2: Resultados de la selección de 80 ligandos sometidos a prueba en RCC356 sobreexpresado en Hek293T. Los resultados se expresan como porcentaje de activación de forskolina.

Figura 3: Curvas de concentración-respuesta obtenidas tras el tratamiento de Hek293T que sobreexpresan RCC356 con diferentes agonistas del receptor.

50 Figura 4A: Registro de la variación de fluorescencia inducida tras la inyección de 250 μM de ácido isovalérico en células cargadas con fluo4-AM, un trazador de calcio, y que expresan RCC356. Se observaron las células con 20X aumentos. La escala temporal se expresa en segundos. Se inyectó ácido isovalérico 10 segundos tras comenzar el registro. B: Medición de la fluorescencia. Cada trazo en el gráfico representa la intensidad de fluorescencia medida en una célula del campo observado. La barra vertical dibujada a 10 segundos indica el tiempo de inyección.

55 Figura 5A: Registro de la variación de fluorescencia inducida tras la inyección de 250 μM de ácido butírico en células

cargadas con fluo4-AM, un trazador de calcio, y que expresan RCC356. Se observaron las células con 20X aumentos. La escala temporal se expresa en segundos. Se inyectó ácido butírico 10 segundos tras comenzar el registro. B: Medición de la fluorescencia. Cada trazo en el gráfico representa la intensidad de fluorescencia medida en una célula del campo observado. La barra vertical dibujada a 10 segundos indica el tiempo de inyección.

5 Figura 6A: Registro de la variación de fluorescencia inducida tras la inyección de 500 μ M de ácido pelargónico en células cargadas con fluo4-AM, un trazador de calcio, y que expresan RCC356. Se observaron las células con 20X aumentos. La escala temporal se expresa en segundos. Se inyectó ácido pelargónico 10 segundos tras comenzar el registro. B: Medición de la fluorescencia. Cada trazo en el gráfico representa la intensidad de fluorescencia medida en una célula del campo observado. La barra vertical dibujada a 10 segundos indica el tiempo de inyección.

10 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere al descubrimiento de que el ácido isovalérico es un ligando natural para dicho GPCR RCC356. La interacción es útil para ensayos de selección para agentes que modulan la interacción y por tanto la función de RCC356. El ligando conocido y su interacción con el receptor también proporcionan el diagnóstico de estados que implican la desregulación de dicha actividad receptora.

15 I. Ensayos para la identificación de agentes que modulan la actividad de RCC356

Pueden identificarse agentes que modulan la actividad de RCC356 de varios modos que se aprovechan de la interacción de dicho receptor con ácido isovalérico. Por ejemplo, la capacidad para reconstituir la unión de RCC356/ácido isovalérico o bien *in vitro*, en células cultivadas o bien *in vivo* proporciona una diana para la identificación de agentes que alteran esa unión. Ensayos basados en la alteración de la unión pueden identificar
20 agentes, tales como moléculas orgánicas pequeñas, a partir de bibliotecas o colecciones de tales moléculas. Alternativamente, tales ensayos pueden identificar agentes en muestras o extractos a partir de fuentes naturales, incluyendo extractos vegetales, fúngicos o bacterianos o incluso muestras de tejido humano. Pueden seleccionarse entonces moduladores de la unión RCC356/ácido isovalérico usando un ensayo de unión o un ensayo funcional que mide la señalización aguas abajo a través de dicho receptor. Tanto los ensayos de unión como los ensayos
25 funcionales se validan usando ácido isovalérico.

Otro enfoque que usa la interacción RCC356/ácido isovalérico para identificar más directamente agentes que modulan la función de RCC356 mide cambios en la señalización aguas abajo de RCC356 inducidos por agentes candidatos o moduladores candidatos. Estos ensayos funcionales pueden realizarse en fracciones de membranas celulares aisladas o en células que expresan el receptor sobre sus superficies.

30 La siguiente descripción proporciona métodos para ensayos tanto de unión como funcionales basados en la interacción de RCC356 y ácido isovalérico.

A. Polipéptidos de RCC356.

Los ensayos que usan la interacción de RCC356 y ácido isovalérico requieren una fuente de polipéptido de RCC356. La secuencia de polinucleótido y polipéptido de RCC356 humano se presentan en el presente documento en la
35 figura 1. La secuencia de polinucleótido de RCC356 humano también está disponible con el número de registro de GenBank AR581085.1, y se notificó en el documento US 6.790.631. La secuencia de polipéptido de RCC356 también se registra con los números de registro sp/Q8TCB6/oxe1-humano en la base de datos Swissprot. Las secuencias relacionadas incluyen las NM_152430, NP_689643, AY775731, AAV54110.1, AB065787, BAC06006, BK004369, DAA04767, AC090719, AL833127, A Y698056, AAU07996.

40 Un experto en la técnica puede amplificar fácilmente una secuencia de RCC356 a partir de una muestra que contiene ARNm que codifica para la proteína a través de técnicas de clonación molecular y PCR básicas usando cebadores o sondas diseñados a partir de las secuencias conocidas. Además, puesto que el gen de RO es un gen sin intrones, un experto en la técnica puede amplificar la secuencia de RCC356 a partir de ADN genómico.

45 La expresión de polipéptidos recombinantes se conoce bien en la técnica. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente vectores y secuencias de control de la expresión para la expresión de polipéptidos de RCC356 útiles según la memoria descriptiva en células eucariotas o procarriotas. RCC356 debe estar asociado con la membrana celular o detergentes como liposomas sintéticos con el fin de tener una función de señalización o unión. Se conocen bien en la técnica métodos para la preparación de fracciones de membranas celulares, por ejemplo el método notificado por Hubbard & Cohn, 1975. J. Cell Biol. 64: 461-479. Con el fin de producir membranas
50 que comprenden RCC356, sólo es necesario aplicar tales técnicas a células que expresan de manera endógena o recombinante RCC356. Alternativamente, puede integrarse RCC356 libre de membrana en preparaciones de membrana mediante dilución de la disolución con detergente del polipéptido (véase, por ejemplo, Salamon *et al.*, 1996, Biophys. J. 71:283-294).

B. Ácido isovalérico.

55 La estructura del ácido isovalérico la conoce bien un experto. Además, el experto puede deducir fácilmente ácidos

equivalentes a partir de dicha estructura y puede someter a prueba fácilmente si dichos equivalentes pueden unirse a y/o modular el receptor RCC356. Pueden aislarse ácidos isovaléricos y equivalentes de los mismos a partir de muestras naturales, o sintetizarse químicamente.

5 Los métodos que pueden usarse para cuantificar dichos ácidos pueden ser, pero sin limitarse a, a) para la extracción y purificación: extracción con disolvente, extracción con aceite, extracción con vapor, extracción con CO₂ supercrítico, cromatografía de líquidos, destilación, cromatografía de gases; b) para la cuantificación: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Un experto sabe cómo realizar dichos métodos.

10 Puede usarse ácido isovalérico o sus equivalentes en forma purificada o usarse como una composición. Las cantidades del ácido necesarias en un ensayo de unión o funcional dado según la memoria descriptiva variarán dependiendo del ensayo, pero generalmente usarán de 0,1 μ M a 100 μ M de ácido marcado y de 10 μ M a 1 mM de ácido no marcado por ensayo. Las afinidades y CE₅₀ de las moléculas de ácido isovalérico modificadas para RCC356 pueden variar en relación con las del ácido isovalérico original, y la cantidad necesaria para un ensayo dado puede ajustarse entonces en relación con los valores normales. Si es necesario para un ensayo dado, puede marcarse el ácido isovalérico mediante la incorporación o adición de marcadores radiomarcados tal como se apuntó anteriormente.

15 C. Ensayos para identificar moduladores de la actividad de RCC356

El descubrimiento de que el ácido isovalérico es un ligando del receptor RCC356 permite ensayos de selección para identificar agonistas, antagonistas y agonistas inversos de la actividad receptora. Los ensayos de selección tendrán dos enfoques generales.

20 1) Ensayos de unión de ligando, en los que se exponen células que expresan RCC356, extractos de membrana de tales células o membranas lipídicas inmovilizadas que comprenden RCC356 a un ácido isovalérico marcado y compuesto candidato. Tras la incubación, se mide la mezcla de reacción para determinar la unión específica del ácido isovalérico marcado al receptor de RCC356. Los compuestos que interfieren con o desplazan el ácido isovalérico marcado pueden ser agonistas, antagonistas o agonistas inversos de la actividad de RCC356. Pueden realizarse análisis funcionales en compuestos positivos para determinar a cuál de estas categorías se ajustan.

25 La unión de un compuesto puede clasificarse en 3 categorías principales: unión competitiva, unión no competitiva y unión acompetitiva. Un compuesto de unión competitiva se parece a un segundo compuesto (referencia) y se une al mismo sitio de unión de una molécula diana (en este caso el receptor). Tras la unión, el compuesto de unión competitiva desplaza a dicho segundo compuesto de dicha diana. Un compuesto de unión no competitiva no se une al mismo sitio de unión de la molécula diana que un segundo compuesto (referencia) pero puede interaccionar con el efecto de dicho segundo compuesto sobre dicha molécula diana. El segundo compuesto no se desplaza tras la adición del compuesto de unión no competitiva. Un compuesto de unión acompetitiva se une a la molécula diana cuando un segundo compuesto ya está unido. Unión cooperativa significa que un compuesto facilita la unión de otro compuesto que puede ser un compuesto de referencia. El efecto cooperativo se observa entonces en el análisis de la K_d de dicho otro compuesto.

35 2) Ensayos funcionales, en los que se mide una actividad de señalización de RCC356.

40 a) Para la selección de agonistas, se incuban células que expresan RCC356 o membranas preparadas a partir de las mismas con un compuesto candidato, y se mide una actividad de señalización de RCC356. Los ensayos se validan usando ácido isovalérico como agonista, y la actividad inducida por compuestos que modulan la actividad receptora se compara con la inducida por ácido isovalérico. Un agonista o agonista parcial tendrá una actividad biológica máxima que corresponde a al menos el 10% de la actividad máxima del ácido isovalérico cuando el agonista o agonista parcial está presente a 100(0) μ M o menos, y preferiblemente tendrá el 50%, 75%, 100% o más, incluyendo 2 veces, 5 veces, 10 veces o más actividad que el ácido isovalérico.

45 b) Para la selección de antagonistas o agonistas inversos, se someten a ensayo células que expresan RCC356 o membranas aisladas a partir de las mismas para determinar la actividad de señalización en presencia de ácido isovalérico con o sin un compuesto candidato. Los antagonistas o agonistas inversos reducirán el nivel de actividad receptora estimulada por ácido isovalérico en al menos el 10%, en relación con reacciones que carecen del antagonista o agonista inverso.

50 c) Para la selección de agonistas inversos, se usan células que expresan actividad de RCC356 constitutiva o membranas aisladas a partir de las mismas en un ensayo funcional que mide una actividad del receptor en presencia y en ausencia de un compuesto candidato. Agonistas inversos son aquellos compuestos que reducen la actividad constitutiva del receptor en al menos el 10%. La sobreexpresión de RCC356 puede conducir a activación constitutiva. RCC356 puede sobreexpresarse colocándolo bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, por ejemplo el promotor temprano de CMV. Alternativamente, ciertas mutaciones de dominios de aminoácidos o aminoácidos de GPCR conservados tienden a conducir a actividad constitutiva. Véase por ejemplo: Kjelsberg *et al.*, 1992, J. Biol. Chem. 267:1430; McWhinney *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. 275:2087; Ren *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:16483; Samama *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:4625; Parma *et al.*, 1993, Nature 365:649; Parma *et al.*, 1998, J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:85; y Parent *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271:7949.

Ensayos de desplazamiento y unión de ligando:

Pueden usarse polipéptidos de RCC356 expresados en una célula, o membranas aisladas que contienen polipéptidos receptores, junto con ácido isovalérico con el fin de seleccionar compuestos que inhiben la unión de ácido isovalérico a RCC356. Cuando se identifican en un ensayo que mide la unión o el desplazamiento de ácido isovalérico solo, los compuestos tendrán que someterse a pruebas funcionales para determinar si actúan como agonistas, antagonistas o agonistas inversos.

Para experimentos de desplazamiento, se incuban células que expresan un polipéptido de RCC356 (generalmente 25.000 células por ensayo o de 1 a 100 μg de extractos de membrana) en tampón de unión (por ejemplo, Hepes 50 mM pH 7,4; CaCl_2 1 mM; albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5% libre de ácidos grasos; y MgCl_2 0,5 mM) durante 1,5 horas (a, por ejemplo, 27°C) con ácido isovalérico marcado en presencia o en ausencia de concentraciones crecientes de un modulador candidato. Para validar y calibrar el ensayo, pueden realizarse reacciones de competición de control usando concentraciones crecientes de ácido isovalérico sin marcar. Tras la incubación, las células se lavan meticulosamente, y se mide el ácido isovalérico marcado, unido según sea apropiado para el marcador dado (por ejemplo, recuento por centelleo, ensayo enzimático, fluorescencia, etc.). Una disminución de al menos el 10% en la cantidad de ácido isovalérico marcado unido en presencia de modulador candidato indica desplazamiento de la unión por el modulador candidato. Se considera que los moduladores candidatos se unen específicamente en este u otros ensayos descritos en el presente documento si desplazan el 50% del ácido isovalérico marcado (dosis de ácido isovalérico por debajo de la saturación) a una concentración de 100 μM o menos (es decir, CE_{50} es 100 μM o inferior).

Alternativamente, la unión o el desplazamiento de la unión pueden monitorizarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Pueden usarse ensayos de resonancia de plasmón superficial como método cuantitativo para medir la unión entre dos moléculas mediante el cambio en la masa cerca de un sensor inmovilizado provocado por la unión o pérdida de unión de ácido isovalérico de la fase acuosa a un polipéptido de RCC356 inmovilizado en una membrana sobre el sensor. Este cambio en la masa se mide como unidades de resonancia frente al tiempo tras la inyección o eliminación del ácido isovalérico o modulador candidato y se mide usando un biosensor Biacore (Biacore AB). RCC356 puede inmovilizarse sobre un chip sensor (por ejemplo, chip CM5 de calidad para investigación; Biacore AB) en una membrana lipídica de película delgada según métodos descritos por Salamon *et al.* (Salamon *et al.*, 1996, *Biophys. J.* 71: 283-294; Salamon *et al.*, 2001, *Biophys. J.* 80: 1557-1567; Salamon *et al.*, 1999, *Trends Biochem. Sci.* 24: 213-219). Sarrio *et al.* demostraron que puede usarse SPR para detectar la unión de ligando al receptor de adenosina GPCR A(1) inmovilizado en una capa lipídica sobre el chip (Sarrio *et al.*, 2000, *Mol. Cell. Biol.* 20: 5164-5174). Un experto en la técnica puede afinar las condiciones para la unión de ácido isovalérico a RCC356 en un ensayo de SPR usando las condiciones notificadas por Sarrio *et al.* como punto de partida.

SPR puede someter a ensayo moduladores de la unión de al menos dos modos. En primer lugar, puede unirse previamente ácido isovalérico a polipéptido de RCC356 inmovilizado, seguido por inyección de modulador candidato a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. y una concentración que oscila entre 1 nM y 1000 μM , preferiblemente de aproximadamente 100 μM . Puede cuantificarse el desplazamiento del ácido isovalérico unido, lo que permite la detección de la unión de modulador. Alternativamente, puede incubarse previamente el polipéptido de RCC356 unido a la membrana y exponerse a ácido isovalérico. Una diferencia en la unión de ácido isovalérico al RCC356 expuesto a modulador en relación con aquella sobre un chip no expuesto previamente a modulador demostrará la unión. En cualquier ensayo, una disminución del 10% o más en la cantidad de ácido isovalérico unido en presencia de modulador candidato, en relación con la cantidad de ácido isovalérico unido en ausencia de modulador candidato indica que el modulador candidato inhibe la interacción de RCC356 y ácido isovalérico. El sistema Biacore puede conectarse con un sistema que identifica un modulador candidato tal como espectrometría de masas o cromatografía de gases.

Otro método de medición de la inhibición de la unión de ácido isovalérico a RCC356 usa transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno de mecánica cuántica que se produce entre un donador de fluorescencia (D) y un aceptor de fluorescencia (A) en estrecha proximidad entre sí (habitualmente < 100 Å de separación) si el espectro de emisión de D se solapa con el espectro de excitación de A. Las moléculas que van a someterse a prueba, por ejemplo, ácido isovalérico y un polipéptido de RCC356, se marcan con un par complementario de fluoróforos donadores y aceptores. Mientras que están próximos entre sí debido a la interacción RCC356:ácido isovalérico, la fluorescencia emitida tras la excitación del fluoróforo donador tendrá una longitud de onda diferente de la emitida en respuesta a la longitud de onda de excitación cuando las moléculas no están unidas, proporcionando la cuantificación de los polipéptidos unidos frente a los no unidos mediante la medición de la intensidad de emisión a cada longitud de onda. Se conocen bien en la técnica pares de donador:aceptor de fluoróforos con los que marcar las moléculas diana.

Una variación en FRET usa extinción de fluorescencia para monitorizar interacciones moleculares. Una molécula del par de interacción puede marcarse con un fluoróforo, y la otra con una molécula que extingue la fluorescencia del fluoróforo cuando se lleva a proximidad estrecha con el mismo. Un cambio en la fluorescencia tras la excitación es indicativo de un cambio en la asociación de las moléculas etiquetadas con el fluoróforo: par extintor. Generalmente, un aumento en la fluorescencia del polipéptido de RCC356 marcado es indicativo de que el ácido isovalérico que lleva el extintor se ha desplazado. Para los ensayos de extinción, un aumento del 10% o más de la intensidad de la

emisión de fluorescencia en muestras que contienen un modulador candidato, en relación con muestras sin el modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción RCC356:ácido isovalérico.

La transferencia de energía de resonancia por bioluminiscencia (BRET) es un sistema para monitorizar interacciones intermoleculares *in vivo*. El ensayo se basa en la transferencia de energía no radiante entre proteínas de fusión que contienen luciferasa de Renilla (Rluc) y por ejemplo proteína fluorescente amarilla (YPF) o proteína fluorescente verde (GFP). La señal de BRET se genera por la oxidación de un sustrato de derivado de coelenterazina. Dicho sistema puede aplicar un sustrato de derivado de coelenterazina no tóxico y permeables para las células DeepBleuC™ (DBC) y un mutante de proteína fluorescente verde (GFP) como aceptor. Cuando el donador y aceptor están en proximidad estrecha, la energía resultante de la degradación catalítica del DBC se transfiere desde Rluc hasta GFP que entonces emitirá fluorescencia a su longitud de onda característica. Este método permite una mayor distancia entre las dos moléculas sometidas a prueba y es independiente del ángulo del fluoróforo.

Además de los métodos de resonancia de plasmón superficial y FRET y BRET, la polarización de fluorescencia es útil para cuantificar la unión ácido isovalérico-receptor. El valor de polarización de fluorescencia para una molécula etiquetada de manera fluorescente depende del tiempo de correlación rotacional o velocidad de rotación. Los complejos proteicos, tales como los formados por RCC356 que se asocia con un ácido isovalérico marcado de manera fluorescente, tienen valores de polarización superiores que ácido isovalérico marcado, sin complejar. La inclusión de un inhibidor candidato de la interacción RCC356:ácido isovalérico da como resultado una disminución en la polarización de fluorescencia, en relación con una mezcla sin el inhibidor candidato, si el inhibidor candidato altera o inhibe la interacción de RCC356 con ácido isovalérico. La polarización de fluorescencia es muy adecuada para la identificación de moléculas pequeñas que alteran la formación de complejos proteicos o polipeptídicos. Una disminución del 10% o más en la polarización de fluorescencia en muestras que contienen un modulador candidato, en relación con la polarización de fluorescencia en una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción RCC356:ácido isovalérico.

Otra alternativa para monitorizar interacciones RCC356:ácido isovalérico usa un ensayo de biosensor. Se han descrito biosensores ICS por AMBRI (Instituto de Investigación de Biotecnología de Membranas Australiano, (*"Australian Membrane Biotechnology Research Institute"*); <http://www.ambri.com.au/>). En esta tecnología, la asociación de moléculas tales como RCC356 y ácido isovalérico está acoplada al cierre de canales iónicos facilitados por gramicidina en bicapas de membranas suspendidas y por tanto a un cambio medible en la admitancia (similar a la impedancia) del biosensor. Este enfoque es lineal a lo largo de seis órdenes de magnitud de cambio de impedancia y es adecuado de manera ideal para la selección a gran escala, de alto rendimiento de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Un cambio del 10% o más (aumento o disminución) en la admitancia de una muestra que contiene un modulador candidato, en relación con la admitancia de una muestra que carece del modulador candidato, indica que el modulador candidato inhibe la interacción de RCC356 y ácido isovalérico.

Es importante indicar que en ensayos de interacción ácido-proteína, es posible que un modulador de la interacción no interactúe necesariamente de manera directa con el/los dominio(s) de las proteínas que interactúan físicamente. También es posible que un modulador interactúe en una ubicación alejada del sitio de interacción ácido-proteína y provoque, por ejemplo, un cambio conformacional en el polipéptido de RCC356. No obstante, moduladores (inhibidores o agonistas) que actúan de esta manera son de interés como agentes para modular la actividad de RCC356.

Cualquiera de los ensayos de unión descritos puede usarse para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que se une a la molécula receptora RCC356, o que afecta a la unión de ácido isovalérico al receptor. Para hacer eso, el polipéptido de RCC356 se hace reaccionar con ácido isovalérico u otro ligando en presencia o en ausencia de la muestra, y se mide la unión de ligando o ácido isovalérico según sea apropiado para el ensayo de unión que está usándose. Una disminución del 10% o más en la unión de ácido isovalérico u otro ligando indica que la muestra contiene un agente que modula la unión de ligando o ácido al polipéptido receptor.

Chips de proteínas

Los métodos de la presente memoria descriptiva pueden aplicarse sobre chips de proteínas. Dicho chip de proteínas puede ser, pero no se limita a, un portaobjetos de vidrio o una membrana de nitrocelulosa. Se conocen bien en la técnica métodos basados en alineamientos para chips de proteínas.

Ensayos funcionales de la actividad receptora

i. Ensayos de unión de GTPasa/GTP:

Para GPCR tales como RCC356, una medida de la actividad receptora es la unión de GTP por membranas celulares que contienen receptores. En el método descrito por Traynor y Nahorski, 1995, *Mal. Pharmacol.* 47: 848-854, se mide esencialmente el acoplamiento de proteínas G a membranas midiendo la unión de GTP marcado. Para ensayos de unión de GTP, se incuban membranas aisladas de células que expresan el receptor en un tampón que contiene HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM y MgCl₂ 10 mM, ³⁵S-GTPγS 80 pM y GDP 3 μM. La mezcla de ensayo se incuba durante 60 minutos a 30°C, tras lo cual se separa el GTP marcado mediante filtración sobre filtros

5 GF/B. Se mide el GTP marcado, unido mediante recuento de centelleo líquido. Con el fin de someter a ensayo la modulación de la actividad de RCC356 inducida por ácido isovalérico, se mezclan membranas preparadas a partir de células que expresan un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico, y se realiza en ensayo de unión de GTP en presencia y en ausencia de un modulador candidato de la actividad de RCC356. Una disminución del 10% o más en la unión de GTP marcado tal como se mide mediante recuento de centelleo líquido en un ensayo de esta clase que contiene modulador candidato, en relación con un ensayo sin el modulador, indica que el modulador candidato inhibe la actividad de RCC356.

10 Puede realizarse un ensayo de unión de GTP similar sin ácido isovalérico para identificar compuestos que actúan como agonistas. En este caso, se usa la unión de GTP estimulada por ácido isovalérico como patrón. Un compuesto se considera un agonista si induce al menos el 50% del nivel de unión de GTP inducido por ácido isovalérico cuando el compuesto está presente a 1 mM o menos, y preferiblemente inducirá un nivel igual que o superior al inducido por ácido isovalérico.

15 Se mide la actividad GTPasa incubando las membranas que contienen un polipéptido de RCC356 con $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP. La GTPasa activa liberará el marcador como fosfato inorgánico, que se detecta mediante separación del fosfato inorgánico libre en una suspensión al 5% de carbón vegetal activado en H_3PO_4 20 mM, seguido por recuento de centelleo. Los controles incluyen ensayos usando membranas aisladas de células que no expresan RCC356 (transfectadas de manera simulada), con el fin de excluir posibles efectos no específicos del compuesto candidato.

20 Con el fin de someter a ensayo el efecto de un modulador candidato sobre la actividad GTPasa regulada por RCC356, se incuban muestras de membrana con ácido isovalérico, con y sin el modulador, seguido por el ensayo de GTPasa. Un cambio (aumento o disminución) del 10% o más en el nivel de unión de GTP o actividad GTPasa en relación con muestras sin modulador es indicativo de modulación de RCC356 por un modulador candidato.

ii. Ensayos de activación de la ruta aguas abajo:

a. Flujo de calcio - El ensayo basado en aequorina.

25 El ensayo de aequorina se aprovecha de la receptividad de la aequorina mitocondrial o citoplasmática a la liberación de calcio intracelular o flujo de calcio (entrada) inducido por la activación de GPCR (Stables *et al.*, 1997, *Anal. Biochem.* 252:115-126; Detheux *et al.*, 2000, *J. Exp. Med.*, 192 1501-1508). En resumen, se transfectan clones que expresan RCC356 para que expresen de manera conjunta apoaequorina mitocondrial o citoplasmática y $\text{G}\alpha_{16}$ o $\text{G}\alpha_{\text{olf}}$. Se incuban las células con coelenterazina H 5 μM o derivados (Molecular Probes) durante 4 horas a temperatura ambiente, se lavan en medio de cultivo DMEM-F12 y se resuspenden a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Entonces se mezclan las células con péptidos agonistas de prueba y se registra la emisión de luz por la aequorina con un luminómetro durante 30 s. Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (RLU). Los controles incluyen ensayos usando membranas aisladas de células que no expresan C356 (transfectadas de manera simulada), con el fin de excluir posibles efectos no específicos del compuesto candidato.

35 La actividad de aequorina o los niveles de calcio intracelular "cambian" si la intensidad de luz aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de RCC356 y tratadas con un modulador candidato, en relación con una muestra de células que expresan el polipéptido de C356 pero no tratadas con el modulador candidato o en relación con una muestra de células que no expresan el polipéptido de RCC356 (células transfectadas de manera simulada) pero tratadas con el modulador candidato.

40 Cuando se realiza en ausencia de ácido isovalérico, el ensayo puede usarse para identificar un agonista o agonista inverso de la actividad de RCC356. Cuando el ensayo se realiza en presencia de ácido isovalérico, éste puede usarse para someter a ensayo un antagonista.

1) Ensayo basado en Fluo3, 4, Fura2 y Calcium3 (Molecular Device).

45 Los ensayos basados en fluorescencia se aprovechan de los flujos de calcio desencadenados por la activación de receptores: o bien la entrada de calcio a través de CNG por ejemplo o bien la liberación de calcio del retículo endoplasmático. Se sabe que algunos fluoróforos incluyendo pero sin limitarse a Fluo3, Fluo4 y Fura2 (Molecular Probes) y la serie Calcium3 kit (Molecular Device) se unen a calcio. Tales complejos de fluoróforo-calcio emiten fluorescencia a longitudes de onda específicas respectivas. De ese modo, tras la activación de un receptor acoplado a proteínas G, el calcio liberado del retículo endoplasmático o que entra a través de CNG se une al fluoróforo conduciendo a emisión de fluorescencia específica. Se incuban células que sobreexpresan RCC356 durante de 30 a 50 minutos con una disolución de fluoróforo de 1 a 8 μM a 37°C. Tras lavar meticulosamente con tampón de solución salina, se vierten 50 μl del mismo tampón en cada pocillo que contiene células (6 a 1536). Entonces se inyectan los agonistas sometidos a prueba en tales células cargadas y se sigue la activación de RCC356 mediante medición de la fluorescencia.

55 Los niveles de calcio intracelular "cambian" si la intensidad de fluorescencia aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de RCC356 y tratadas con un modulador candidato, en relación con una muestra de células que expresan el polipéptido de C356 pero no tratadas con el modulador candidato o en relación con una muestra de células que no expresan el polipéptido de RCC356 (células

transfectadas de manera simulada) pero tratadas con el modulador candidato.

2) Ensayo de despolarización/polarización de membrana (fluoróforo DiBac por ejemplo).

5 El principio de este ensayo es seguir la polarización de la membrana celular. La sonda aniónica DiBAC₄(3) se reparte entre los compartimentos intra y extracelular de una manera dependiente del potencial de membrana. Con potencial de membrana creciente (despolarización), la sonda se reparte adicionalmente dentro de la célula dando como resultado un aumento de la fluorescencia. A la inversa, la hiperpolarización conduce a una disminución de la fluorescencia debido a una extrusión del tinte.

La sonda DiBAC₄(3) se excita con una longitud de onda de 488 nm, y emite a una longitud de onda de 540 nm.

10 El día del experimento, se añade la glucosa al tampón de ensayo (tampón de solución salina) hasta una concentración final de 10 mM y la sonda DiBAC₄(3) hasta una concentración final de 5 μM. Se mantiene el tampón de ensayo a 37°C. Se elimina el medio de cultivo celular y se enjuaga dos veces cada pocillo que contiene células que sobreexpresan RCC356 con 200 μl de tampón de ensayo precalentado. Se ponen 180 μl de tampón de ensayo que contiene DiBAC₄(3) y se incuban las células durante 30 min. a la temperatura apropiada. Las placas de células estarán listas para el ensayo tras esta incubación de 30 min. Se recoge el nivel de referencia durante 2 min.
15 antes de cualquier adición. Se añaden 20 μl de moduladores candidatos al pocillo apropiado y se recogen los datos durante otros 25 min.

20 La polarización de la membrana “cambia” si la intensidad de fluorescencia aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de RCC356 y tratadas con un modulador candidato, en relación con una muestra de células que expresan el polipéptido de C356 pero no tratadas con el modulador candidato o en relación con una muestra de células que no expresan el polipéptido de RCC356 (células transfectadas de manera simulada) pero tratadas con el modulador candidato.

3) Ensayo de melanóforos. El ensayo de melanóforos es un ensayo basado en color. Básicamente, las células usadas para este ensayo se derivan de la piel de la rana *Xenopus Laevis*. Estas células inmortalizadas contenían melanosomas, que son orgánulos que contienen pigmento oscuro. La activación de GPCR recombinante o endógeno que desencadena la activación de acenilato ciclasa o fosfolipasa C conduce a la dispersión de los melanosomas y al oscurecimiento de las mismas células. Alternativamente, GPCR que inhibe la adenilato ciclasa o fosfolipasa C conduce al aclaramiento de las células. De ese modo, en lugar de medir concentraciones de segundos mensajeros, puede localizarse fácilmente el acierto observando el cambio en la coloración celular. Este cambio de color puede cuantificarse fácilmente en un lector de microplacas que mide la absorbancia a 650 nM o mediante examen en un sistema de obtención de imágenes de video.
30

b. Ensayo de adenilato ciclasa:

35 Se describen ensayos para la actividad adenilato ciclasa por Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585-591. Ese ensayo es una modificación ensayo enseñado por Solomon *et al.*, 1974, Anal. Biochem. 58: 541-548. En resumen, reacciones de 100 μl contienen Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 5 mM, creatina fosfato 20 mM (sal de sodio), 10 unidades (71 μg de proteína) de creatina fosfocinasa, α-³²P-ATP 1 mM (sal de tetrasodio, 2 μCi), AMP cíclico 0,5 mM, AMP cíclico marcado con G-³H (aproximadamente 10.000 cpm), Ro20-1724 0,5 mM, etanol al 0,25% y 50-200 μg de homogenado proteico que va a someterse a prueba (es decir, homogenado de células que expresan o no expresan un polipéptido de RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato). Las mezclas de reacción se incuban generalmente a 37°C durante 6 minutos. Tras la incubación, las mezclas de reacción de desproteinizan mediante la adición de 0,9 ml de ácido tricloroacético al 6% frío. Se centrifugan los tubos a 1800 x g durante 20 minutos y se añade cada disolución de sobrenadante a una columna Dowex AG50W-X4. Se eluye la fracción de AMPc de la columna con 4 ml de imidazol-HCl 0,1 mM (pH 7,5) en un vial de recuento. Los ensayos deben realizarse por triplicado. También deben realizarse reacciones de control usando homogenado proteico de células que no expresan un polipéptido de RCC356.
40

45 Los ensayos deben realizarse usando células o extractos de células que expresan RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

50 Según la memoria descriptiva, la actividad adenilato ciclasa “cambia” si aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra tomada de células tratadas con un modulador candidato de la actividad de RCC356, en relación con una muestra similar de células no tratadas con el modulador candidato o en relación con una muestra de células que no expresan el polipéptido de RCC356 (células transfectadas de manera simulada) pero tratadas con el modulador candidato. Alternativamente, puede someterse a ensayo una disminución de la actividad en el 10% o más mediante el modulador candidato de RCC356 en una muestra tratada con un compuesto de referencia.

55 c. Ensayo de AMPc:

Se mide el AMPc intracelular usando un radioinmunoanálisis (RIA) de AMPc o proteína de unión a AMPc según

métodos ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, Horton & Baxendale, 1995. *Methods Mol. Biol.* 41: 91-105 describen un RIA para AMPc.

Varios kits para la medición del AMPc están disponibles comercialmente, tal como el ensayo homogéneo basado en polarización de fluorescencia de alta eficacia comercializado por LJI Biosystems y NEN Life Science Products. Deben realizarse reacciones de control usando extractos de células transfectadas de manera simulada para excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

Los ensayos deben realizarse usando células o extractos de células que expresan RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

El nivel de AMPc “cambia” si el nivel de AMPc detectado en células, que expresan un polipéptido de RCC356 y tratadas con un modulador candidato de la actividad de RCC356 (o en extractos de tales células), usando el ensayo basado en RIA de Horton & Baxendale, 1995, citado anteriormente, aumenta o disminuye en al menos el 10% en relación con el nivel de AMPc en células similares no tratadas con el modulador candidato.

d. Descomposición de fosfolípidos, producción de DAG producción y niveles de inositol trifosfato:

Pueden monitorizarse receptores que activan la descomposición de fosfolípidos para detectar cambios debidos a la actividad de moduladores conocidos o de los que se sospecha de RCC356 monitorizando la descomposición de fosfolípidos, y la producción resultante de los segundos mensajeros DAG y/o inositol trifosfato (IP₃). Se describen métodos de medición de cada uno de estos en *Phospholipid Signaling Protocols*, editado por Ian M. Bird. Totowa, NJ, Humana Press, 1998. Véase también Rudolph *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 11824-11831, que también describen un ensayo para determinar la descomposición de fosfatidilinositol. Los ensayos deben realizarse usando células o extractos de células que expresan RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

Según la memoria descriptiva, la descomposición de fosfatidilinositol, y los niveles de diacilglicerol y/o inositol trifosfato “cambian” si aumentan o disminuyen en al menos el 10% en una muestra de células que expresan un polipéptido de RCC356 y tratadas con un modulador candidato en presencia o en ausencia de ácido isovalérico, en relación con el nivel observado en una muestra de células que expresan un polipéptido de RCC356 que no se trata con el modulador candidato.

e. Ensayos de activación de PKC:

Los receptores tirosina cinasa de factores de crecimiento tienen a señalar mediante una ruta que implica la activación de la proteína cinasa C (PKC) que es una familia de proteínas cinasa activadas por calcio y fosfolípidos. La activación de PKC da como resultado en última instancia la transcripción de una serie de genes que codifican para factores de transcripción de protooncogenes, incluyendo c-fos, c-myc y c-jun, proteasas, inhibidores de proteasas, incluyendo colagenasa tipo I e inhibidor de activador de plasminógeno, y moléculas de adhesión, incluyendo molécula de adhesión intracelular I (ICAM I). Pueden usarse ensayos diseñados para detectar aumentos en productos génicos inducidos por PKC para monitorizar la activación de PKC y de ese modo la actividad receptora. Además, puede monitorizarse la actividad de receptores que señalan mediante PKC a través del uso de constructos génicos indicadores dirigidos por las secuencias de control de genes activados mediante la activación de PKC. Este tipo de ensayo basado en gen indicador se trata en más detalle a continuación.

Para una medida más directa de la actividad PKC, puede usarse el método de Kikkawa *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 13341. Este ensayo mide la fosforilación de un péptido sustrato de PKC, que se separa posteriormente mediante la unión a papel de fosfocelulosa. Este sistema de ensayo de PKC puede usarse para medir la actividad de cinasa purificada, o la actividad en extractos celulares brutos. La muestra de proteína cinasa C puede diluirse en HEPES 20 mM / DTT 2 mM inmediatamente antes del ensayo.

El sustrato para el ensayo es el péptido Ac-FKKSFKL-NH₂ (SEQ ID NO. 2), derivado de la proteína sustrato de proteína cinasa C rica en alanina miristoilada (MARCKS). La K_m de la enzima para este péptido es de aproximadamente 50 μM. Pueden usarse también otros péptidos selectivos de proteína cinasa C, básicos conocidos en la técnica, a una concentración de al menos 2-3 veces su K_m. Los cofactores requeridos para el ensayo incluyen calcio, magnesio, ATP, fosfatidilserina y diacilglicerol. Dependiendo de la intención del usuario, el ensayo puede realizarse para determinar la cantidad de PKC presente (condiciones activantes) o la cantidad de PKC activa presente (condiciones no activantes). Para la mayoría de los fines según la memoria descriptiva, se usarán condiciones no activantes, de manera que se mide la PKC que es activa en la muestra cuando se aísla, en vez de medir la PKC que puede activarse. Para condiciones no activantes, se omite el calcio en el ensayo a favor de EGTA.

El ensayo se realiza en una mezcla que contiene HEPES 20 mM, pH 7,4, DTT 1-2 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 100 μM, -1 μCi de γ-³²P-ATP, sustrato peptídico 100 μg/ml (-100 μM), membranas de fosfatidilserina/diacilglicerol 140 μM / 3,8 μM y calcio 100 μM (o lo más preferiblemente EGTA 500 μM). Se usan 48 μl de muestra, diluida en HEPES

20 mM, pH 7,4, DTT 2 mM en un volumen de reacción final de 80 µl. Se realizan las reacciones a 30°C durante 5-10 minutos, seguido por la adición de 25 µl de ATP 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0, que detiene las reacciones.

5 Tras detenerse la reacción, se coloca una parte (85 µl) de cada reacción sobre un filtro de fosfato de celulosa Whatman P81, seguido por lavados: cuatro veces 500 ml en ácido fosfórico al 0,4%, (5-10 min. por lavado); y un lavado final en 500 ml de EtOH al 95%, durante 2-5 min. Se mide la radiactividad unida mediante recuento de centelleo. Se determina la actividad específica (cpm/nmol) del ATP marcado colocando una muestra de la reacción sobre papel P81 y contando sin lavar. Se calculan las unidades de la actividad PKC, definida como nmol de fosfato transferido por min., tal como sigue:

La actividad, en UNIDADES (nmol/min.) es:

10
$$= \frac{\text{(cpm en el papel)} \times (105 \mu\text{l totales} / 85 \mu\text{l colocados})}{\text{(tiempo de ensayo, min.) (actividad específica de ATP cmp/nmol)}}$$

Puede realizarse un ensayo alternativo usando un kit de ensayo de proteína cinasa C comercializado por PanVera (n.º de cat. P2747).

15 Los ensayos se realizan en extractos de células que expresan un polipéptido de RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control reacciones usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

20 Según la memoria descriptiva, la actividad PKC "cambia" mediante un modulador candidato cuando las unidades de PKC medida mediante cualquier ensayo descrito anteriormente aumente o disminuye en al menos el 10%, en extractos de células que expresan RCC356 y tratadas con un modulador candidato, en relación con una reacción realizada en una muestra similar de células no tratadas con un modulador candidato.

f. Ensayos de activación de PKA

Puede someterse a ensayo la actividad PKA usando cualquiera de varios kits disponibles comercialmente, por ejemplo el kit de ensayo de PKA IMAP de Molecular Device, o el kit de ensayo de PKA ProFluor de Promega.

25 Los ensayos deben realizarse usando células o extractos de células que expresan RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

30 La actividad PKA "cambia" si el nivel de actividad aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de RCC356, tratadas con un modulador candidato en relación con la actividad cinasa de PKA en una muestra de células similares no tratadas con el modulador candidato.

g. Ensayos de cinasas:

35 La actividad MAP cinasa puede someterse a ensayo usando cualquiera de varios kits disponibles comercialmente, por ejemplo, el kit de ensayo de MAP cinasa p38 comercializado por New England Biolabs (n.º de cat. 9820) o los ensayos de MAP cinasa FlashPlate™ comercializados por Perkin-Elmer Life Sciences.

Los ensayos deben realizarse usando células o extractos de células que expresan RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

40 La actividad MAP cinasa "cambia" si el nivel de aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de RCC356, tratadas con un modulador candidato en relación con la actividad MAP cinasa en una muestra de células similares no tratadas con el modulador candidato.

45 Se conocen bien ensayos directos para determinar la actividad cinasa usando sustratos de tirosina cinasas naturales o sintéticos conocidos y fosfato marcado, que son ensayos similares para otros tipos de cinasas (por ejemplo, Ser/Thr cinasas). Pueden realizarse ensayos de cinasas tanto con cinasas purificadas como con extractos brutos preparados a partir de células que expresan un polipéptido de RCC356, tratadas con o sin ácido isovalérico, con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos. Los sustratos pueden ser o bien proteína de longitud completa o bien péptidos sintéticos que representan el sustrato. Pinna & Ruzzene (1996, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225) enumeran varios sitios de fosforilación de sustrato útiles para medir actividades cinasa. Varios péptidos sustrato de cinasas están disponibles comercialmente. Uno que es particularmente útil es el "péptido relacionado con Src", (RRLIEDAEYAARG (SEQ ID NO. 1); disponible de Sigma n.º A7433), que es un sustrato para muchas tirosina cinasas receptoras y no receptoras.

50

Debido a que el ensayo descrito a continuación requiere la unión de sustratos peptídicos a filtros, los sustratos peptídicos deben tener una carga neta positiva para facilitar la unión. Generalmente, los sustratos peptídicos deben tener al menos 2 residuos básicos y un extremo amino terminal libre. Las reacciones usan generalmente una concentración de péptido de 0,7-1,5 mM.

- 5 Los ensayos se llevan a cabo generalmente en un volumen de 25 μ l que comprende 5 μ l de 5X tampón cinasa (BSA 5 mg/ml, Tris-Cl 150 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 100 mM; dependiendo de la cinasa exacta que se somete a ensayo, puede usarse $MnCl_2$ en lugar de o además de $MgCl_2$), 5 μ l de ATP 1,0 mM (concentración final de 0,2 mM), γ - ^{32}P -ATP (100-500 cpm/pmol), 3 μ l de sustrato peptídico 10 mM (concentración final de 1,2 mM), extracto celular que contiene cinasa que va a someterse a prueba (los extractos celulares usados para ensayos de cinasas deben contener un inhibidor de fosfatasa (por ejemplo ortovanadato de sodio 0,1-1 mM)) y H_2O hasta 25 μ l. Las reacciones se realizan a 30°C, y se inician mediante la adición del extracto celular.

- 10 Las reacciones de cinasas se realizan durante de 30 segundos a aproximadamente 30 minutos, seguido por la adición de 45 μ l de ácido tricloroacético al 10% (TCA) enfriado con hielo. Se centrifugan las muestras durante 2 minutos en una microcentrífuga y se colocan 35 μ l del sobrenadante sobre círculos de filtro de fosfato de celulosa Whatman P81. Los filtros se lavan tres veces con 500 ml de ácido fosfórico al 0,5% frío, seguido por un lavado con 200 ml de acetona a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se secan los filtros y se mide el ^{32}P incorporado mediante recuento de centelleo. Se determina la actividad específica de ATP en la reacción de cinasa (por ejemplo, en cpm/ pmol) poniendo una pequeña muestra (2-5 μ l) de la reacción sobre un círculo de filtro P81 y contando directamente, sin lavar. Las cuentas por minuto obtenidas en la reacción de cinasa (menos el blanco) se dividen entonces entre la actividad específica para determinar los moles de fosfato transferidos en la reacción.

- 15 Los ensayos deben realizarse usando células o extractos de células que expresan RCC356, tratadas o no tratadas con ácido isovalérico con o sin un modulador candidato. Deben realizarse reacciones de control usando células transfectadas de manera simulada, o extractos de las mismas con el fin de excluir posibles efectos no específicos de algunos moduladores candidatos.

- 20 La actividad tirosina cinasa "cambia" si el nivel de actividad cinasa aumenta o disminuye en el 10% o más en una muestra de células, que expresan un polipéptido de RCC356, tratadas con un modulador candidato en relación con la actividad cinasa en una muestra de células similares no tratadas con el modulador candidato.

h. Indicadores transcripcionales para la activación de la ruta aguas abajo:

- 25 La señal intracelular iniciada por la unión de un agonista a un receptor, por ejemplo, RCC356, pone en movimiento una cascada de acontecimientos intracelulares, cuya consecuencia última es un cambio rápido y detectable en la transcripción y/o traducción de uno o más genes. La actividad del receptor puede monitorizarse por tanto midiendo la expresión de un gen indicador dirigido por secuencias de control sensibles a la activación de RCC356.

- 30 Tal como se usa en el presente documento "promotor" se refiere a los elementos de control de la transcripción necesarios para la regulación mediada por receptor de la expresión génica, incluyendo no sólo el promotor basal, sino también cualquier potenciador o sitio de unión de factores de transcripción necesario para la expresión regulada por receptor. Seleccionando promotores que son sensibles a las señales intracelulares que resultan de la unión de agonistas, uniendo operativamente los promotores seleccionados a genes indicadores cuya transcripción, traducción o actividad última es fácilmente detectable y medible, el ensayo indicador basado en transcripción proporciona una rápida indicación de si se activa un receptor dado.

- 35 Se conocen bien en la técnica genes indicadores tales como luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), β -lactamasa o β -galactosidasa, así como ensayos para la detección de sus productos.

- 40 Genes particularmente muy adecuados para monitorizar la actividad receptora son los genes "tempranos inmediatos", que se inducen rápidamente, en general en el plazo de minutos del contacto entre el receptor y el ligando o proteína efectora. La inducción de la transcripción de genes tempranos inmediatos no requiere la síntesis de nuevas proteínas reguladoras. Además de la rápida receptividad a la unión de ligandos, las características de genes preferidos útiles para preparar constructos indicadores incluyen: expresión baja o indetectable en células quiescentes; inducción que es transitoria e independiente de la síntesis de nuevas proteínas; la inactivación posterior de la transcripción requiere la síntesis de nuevas proteínas; y los ARNm transcritos a partir de estos genes tienen una semivida corta. Se prefiere, pero no es necesario, que un elemento de control de la transcripción tenga todas estas propiedades para que sea útil.

- 45 Un ejemplo de un gen que es sensible a varios estímulos diferentes es el protooncogén c-fos. El gen c-fos se activa de una manera independiente de la síntesis de proteínas mediante factores de crecimiento, hormonas, agentes específicos de diferenciación, estrés y otros inductores conocidos de proteínas de superficie celular. La inducción de la expresión de c-fos es extremadamente rápida, produciéndose a menudo en el plazo de minutos de la estimulación del receptor. Esta característica hace que las regiones reguladoras de c-fos sean particularmente atractivas para su uso como indicador de la activación de receptores.

Los elementos reguladores de c-fos incluyen (véase, Verma *et al.*, 1987, Cell 51: 513-514): una caja TATA que se requiere para la iniciación de la transcripción; dos elementos en el sentido de 5' para la transcripción basal y un potenciador, que incluye un elemento con simetría de díada y que se requiere para la inducción por éster de forbol, acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), suero, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y PMA.

5 El elemento potenciador transcripcional de c-fos de 20 pb ubicado entre -317 y -298 pb en el sentido de 5' del sitio de caperuza del ARNm de c-fos es esencial para la inducción por suero en células NIH 3T3 privadas de suero. Uno de los dos elementos en el sentido de 5' está ubicado en de -63 a -57 y se parece a la secuencia consenso para la regulación por AMPc.

10 El factor de transcripción CREB (proteína de unión a elemento sensible a AMP cíclico) es, tal como implica el nombre, sensible a los niveles de AMPc intracelular. Por tanto, la activación de un receptor que señaliza mediante la modulación de los niveles de AMPc puede monitorizarse midiendo o bien la unión del factor de transcripción, o la expresión de un gen indicador unido a un elemento de unión a CREB (denominado el CRE, elemento de respuesta a AMPc). La secuencia de ADN del CRE es TGACGTCA. Se describen constructos indicadores sensibles a la actividad de unión a CREB en la patente estadounidense n.º 5.919.649.

15 Otros promotores y elementos de control de la transcripción, además de los elementos de c-fos y los constructos sensibles a CREB, incluyen el promotor del gen del péptido intestinal vasoactivo (VIP) (sensible a AMPc; Fink *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:6662-6666); el promotor del gen de somatostatina (sensible a AMPc; Montminy *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 8,3:6682-6686); el promotor de proencefalina (sensible a AMPc, agonistas nicotínicos y ésteres de forbol; Comb *et al.*, 1986, Nature 323:353-356); el promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxi-cinasa (PEPCK) (sensible a AMPc; Short *et al.*, 1986, J. Biol. Chem. 261:9721-9726).

20 Los ejemplos adicionales de elementos de control de la transcripción que son sensibles a cambios en la actividad de GPCR incluyen, pero no se limitan a los sensibles al factor de transcripción AP-1 y los sensibles a la actividad de NF-κB. El sitio de unión a AP-1 consenso es el palíndromo TGA(C/G)TCA (Lee *et al.*, 1987, Nature 325: 368-372; Lee *et al.*, 1987, Cell 49: 741-752). El sitio de AP-1 también es responsable de la mediación de la inducción por promotores tumorales tales como el éster de forbol β-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), y por tanto se denominan también algunas veces TRE, para elemento de respuesta a TPA. AP-1 activa numerosos genes que están implicados en la respuesta temprana de células a estímulos de crecimiento. Los ejemplos de genes sensibles a AP-1 incluyen, pero no se limitan a los genes para Fos y Jun (cuyas proteínas tienen por sí mismas actividad de AP-1), antígenos relacionados con Fos (Fra) 1 y 2, IκBα, ornitina descarboxilasa y anexinas I y II.

30 El elemento de unión a NF-κB tiene la secuencia consenso GGGGACTTTC (SEQ ID NO. 3). Se ha identificado un gran número de genes como sensibles a NF-κB, y sus elementos de control pueden unirse a un gen indicador para monitorizar la actividad de GPCR. Una pequeña muestra de los genes sensibles a NF-κB incluye los que codifican para IL-1β (Hiscott *et al.*, 1993, Mol. Cell. Biol. 13: 6231-6240), TNF-α (Shakhov *et al.*, 1990, J. Exp. Med. 171: 35-47), CCR5 (Liu *et al.*, 1998, AIDS Res. Hum. Retroviruses 14: 1509-1519), P-selectina (Pan & McEver, 1995, J. Biol. Chem. 270: 23077-23083), ligando Fas (Matsui *et al.*, 1998, J. Immunol. 161: 3469-3473), GM-CSF (Schreck & Baeuerle, 1990, Mol. Cell. Biol. 10: 1281-1286) y IκBκ (Haskill *et al.*, 1991, Cell 65: 1281-1289). También se conocen en la técnica vectores que codifican para indicadores sensibles a NF-κB o un experto en la técnica puede prepararlos fácilmente usando, por ejemplo, elementos NF-κB sintéticos y un promotor mínimo, o usando las secuencias sensibles a NF-κB de un gen que se sabe que se somete a regulación por NF-κB. Además, están disponibles comercialmente constructos indicadores sensibles a NF-κB de, por ejemplo, CLONTECH.

Un constructo de promotor dado debe someterse a prueba exponiendo células que expresan RCC356, transfectadas con el constructo, a ácido isovalérico. Un aumento de al menos dos veces en la expresión de indicador en respuesta a ácido isovalérico indica que el indicador es un testigo de la actividad de RCC356.

45 Con el fin someter a ensayo la actividad de RCC356 con un constructo de indicador transcripcional sensible a ácido isovalérico, se transfectan de manera estable células que expresan de manera estable polipéptido de RCC356 con el constructo de indicador. Para seleccionar agonistas, se exponen células sin tratar a moduladores candidatos, o se exponen a ácido isovalérico, y se mide la expresión del indicador. Los cultivos tratados con ácido isovalérico sirven como patrón para el nivel de transcripción inducido por un agonista conocido. Un aumento de al menos el 10% en la expresión del indicador en presencia de un modulador candidato en comparación con la expresión del indicador en ausencia de cualquier modulador indica que el candidato es un modulador de la actividad de RCC356. Un agonista inducirá al menos tanto, y preferiblemente la misma cantidad o más de expresión de indicador que el ácido isovalérico. Los agonistas parciales pueden activar el receptor menos en comparación con ácido isovalérico. Este enfoque puede usarse también para seleccionar agonistas inversos cuando las células expresan un polipéptido de RCC356 a niveles tales que hay una actividad basal elevada del indicador en ausencia de ácido isovalérico u otros agonistas. Una disminución en la actividad del indicador del 10% o más en presencia de un modulador candidato, en relación con su ausencia, indica que el compuesto es un agonista inverso.

Para seleccionar antagonistas, las células que expresan RCC356 y que portan el constructo indicador se exponen a ácido isovalérico (u otro agonista) en presencia y ausencia de modulador candidato. Una disminución del 10% o más en la expresión del indicador en presencia de modulador candidato, en relación con la ausencia del modulador

candidato, indica que el candidato es un antagonista de la actividad de RCC356.

Los controles para los ensayos de transcripción incluyen células que no expresan RCC356 pero que portan el constructo indicador, así como células con un constructo indicador sin promotor. Los compuestos que se identifican como moduladores de la transcripción regulados por RCC356 también deben analizarse para determinar si afectan a la transcripción dirigida por otras secuencias reguladoras y por otros receptores, con el fin de determinar la especificidad y el espectro de su actividad.

El ensayo de indicador transcripcional, y la mayoría de los ensayos basados en células, son muy adecuados para seleccionar bibliotecas químicas de compuestos químicos para determinar los que modulan la actividad de RCC356. Las bibliotecas pueden ser, por ejemplo, bibliotecas de fuentes naturales, por ejemplo, plantas, animales, bacterias, etc., o pueden ser bibliotecas que comprenden equivalentes aleatorios o sistemáticos de ácido isovalérico.

i. Internalización de receptores

Cualquiera de los ensayos de actividad receptora, incluyendo flujo de calcio, polarización de membranas, ensayo de melanóforos, la unión de GTP, GTPasa, adenilato ciclasa, AMPc, descomposición de fosfolípidos, diacilglicerol, inositol trifosfato, PKC, PKA, cinasa, internalización de receptores y ensayos de indicador transcripcional, puede usarse para determinar la presencia de un agente en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, que afecta a la actividad de la molécula receptora RCC356. Para hacer eso, el polipéptido de RCC356 se somete a ensayo para determinar la actividad en presencia y en ausencia de la muestra o un extracto de la muestra. Un aumento en la actividad de RCC356 en presencia de la muestra o el extracto en relación con la ausencia de la muestra indica que la muestra contiene un agonista de la actividad receptora. Una disminución en la actividad receptora en presencia de ácido isovalérico u otro agonista y la muestra, en relación con la actividad receptora en presencia de ácido isovalérico solo, indica que la muestra contiene un antagonista de la actividad de RCC356. Si se desea, las muestras pueden fraccionarse entonces y someterse a prueba adicionalmente para aislar o purificar el agonista o antagonista. La cantidad de aumento o disminución en la actividad medida necesaria para que se diga que una muestra contiene un modulador depende del tipo de ensayo usado. Generalmente, un cambio del 10% o más (aumento o disminución) en relación con un ensayo realizado en ausencia de una muestra indica la presencia de un modulador en la muestra. Una excepción es el ensayo de indicador transcripcional, en el que es necesario un aumento de al menos dos veces o una disminución del 10% en la señal para que se diga que contiene un modulador. Se prefiere que un agonista estimula al menos el 50%, y preferiblemente el 75% o el 100% o más, por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces o más la activación de receptores que el ácido isovalérico.

Otros ensayos funcionales incluyen, por ejemplo, ensayos de biosensor o microfisiómetro (véase Hafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15: 149-158).

II. Ensayos de diagnóstico basados en la interacción de RCC356 y ácido isovalérico:

El ácido isovalérico es un ácido orgánico de olor desagradable que participa de la formación de malos olores de secreciones humanas y animales, particularmente del sudor. Puesto que se encontró que dicho ácido y otros odorizantes modulaban el receptor RCC356, la presente memoria descriptiva sugiere que RCC356 tiene también probablemente una función olfativa. La presente memoria descriptiva sugiere por tanto que el reconocimiento de olores, en particular mediado por ácido isovalérico, y ácidos equivalentes del mismo, puede modularse a través de la modulación de RCC356. Por tanto, pueden usarse ligandos que reconocen RCC356 tales como ácido isovalérico para influir al menos en la percepción de olores relacionada con ácido isovalérico. Basándose en dicho hallazgo, pueden establecerse ensayos de diagnóstico para determinar si están presentes receptores RCC356 que funcionan mal en un sujeto, lo que conduce a una privación del reconocimiento de olores.

La señalización a través de GPCR es decisiva en la patología de un gran número de enfermedades y trastornos. RCC356 se expresa en muchos tejidos incluyendo la próstata y se ha mostrado que actúa como indicador de la progresión del cáncer de tales tejidos (documento US 6.790.631). Dicho cáncer puede ser cáncer de próstata, cuello uterino, útero, recto, estómago y riñón. Por tanto, además de su papel en el olfato, RCC356 tiene lo más probablemente un papel que desempeñar en el proceso del cáncer. La progresión y/o el tratamiento de dichos cánceres pueden estudiarse usando los métodos de la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, pueden establecerse ensayos descritos en la presente memoria descriptiva usando ácido isovalérico, equivalentes de ácido isovalérico o anticuerpos frente a ácido isovalérico.

Hay algunas pruebas de que RCC356 se expresa en el cerebro (BBRC 2003, Vanti *et al.* 305: 67-71). Sin embargo, su papel en enfermedades o trastornos del SNC no se ha revelado aún. Además, se ha sugerido previamente que el ácido isovalérico podría estar implicado en el tratamiento de la epilepsia (Epilepsia, 2004 45:1338-43). De hecho, el extracto de valeriana y lo más particularmente raíces de valeriana en polvo se conocen bien como anticonvulsivo. Además, se ha mostrado que el ácido isovalérico era un constituyente de tal polvo. Puede suponerse por tanto que el ácido isovalérico puede tener propiedades anticonvulsivas. Basándose en los hallazgos de la presente invención de que el ácido isovalérico es un ligando natural de RCC356, la presente memoria descriptiva sugiere que RCC356 podría considerarse como una diana para tratar trastornos del SNC, en particular epilepsia. Sin embargo, la presente memoria descriptiva no excluye que dichos receptores puedan estar también implicados en migraña, vómitos,

5 trastornos psicóticos y neurológicos, incluyendo ansiedad, esquizofrenia, depresión maníaca, depresión, delirio, demencia y retardo mental grave, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson, y discinesias, tales como tales como enfermedad de Huntington o síndrome de Gilles de la Tourett y otras enfermedades relacionadas. La provisión de ácido isovalérico como ligando para RCC356 puede ayudar a dilucidar dicho papel. Además, la presente memoria descriptiva se refiere al uso de kits que comprenden reactivos para cuantificar RCC356 o estudia RCC356 para diagnosticar enfermedades relacionadas con el SNC, en particular epilepsia.

10 La interacción de RCC356 con ácido isovalérico puede usarse como la base de ensayos para el diagnóstico o la monitorización de enfermedades, trastornos o procesos que implican la señalización de RCC356. Los ensayos de diagnóstico para trastornos o enfermedades relacionadas con RCC356 pueden tener varias formas diferentes.

15 En primer lugar, los ensayos de diagnóstico pueden cuantificar el ácido isovalérico en una muestra de tejido. En segundo lugar, los ensayos pueden evaluar la diferencia en la unión de ácido isovalérico sobre RCC356 en una muestra de tejido. En tercer lugar, puede determinarse la presencia de ácido isovalérico (cuantitativa o cualitativa) en una muestra usando un anticuerpo específico que reconoce ácido isovalérico o el complejo ácido isovalérico / RCC356. El uso de este anticuerpo puede combinarse con el uso de un anticuerpo que reconoce RCC356 específicamente. Dichos métodos pueden usarse para diagnosticar enfermedades o trastornos del SNC y progresión del cáncer y tratamientos de los mismos.

20 Además, la presente memoria descriptiva sugiere por primera vez que RCC356 puede desempeñar un papel en la percepción de olores y trastornos del SNC. Los ensayos para diagnosticar o monitorizar la disfunción olfativa o trastornos del SNC pueden tomar varias formas.

25 En primer lugar, pueden aplicarse anticuerpos frente a RCC356, frente a ácido isovalérico o ácidos relacionados, o frente al complejo ácido isovalérico / RCC356 en ensayos de unión para medir el contenido del polipéptido de RCC356 en tejidos. En segundo lugar, pueden determinarse los niveles de ARNm de RCC356 que indican el nivel de expresión del gen de RCC356. Finalmente, puede amplificarse el ARNm o ADN genómico que codifica para RCC356 y comprobarse las variaciones de secuencia en comparación con el gen o mensajero de RCC356 de tipo natural. La presencia de variaciones puede indicar la presencia o predestinación de disfunciones olfativas o trastornos del SNC.

30 Según el presente método, dicho polipéptido de RCC356 puede ser un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 20% o identidad superior, tal como el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o incluso el 100% con el polipéptido representado en la figura 1b. Alternativamente, dicho polipéptido de RCC356 puede ser un fragmento del polipéptido de longitud completa de dicha secuencia, en el que el fragmento conserva al menos el 50% de la actividad de unión y el nivel de activación de la señalización inducidos por ácido isovalérico. Según la presente memoria descriptiva, dicho polipéptido de RCC356 puede comprender una o más adiciones, inserciones, deleciones o sustituciones en relación con la secuencia de tipo natural siempre que tenga propiedades de unión similares hacia ácido isovalérico. Dicho polipéptido de RCC356 puede ser un polipéptido de RCC356 truncado; dicho polipéptido de RCC356 puede comprender secuencias adicionales que forman una proteína de fusión de RCC356, en la que dichas secuencias adicionales pueden elegirse del grupo que consiste en secuencias de glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), fosfatasa alcalina, tiorredoxina, proteína fluorescente verde (GFP), etiquetas de histidina (por ejemplo, 6X o más His) o etiquetas de afinidad (por ejemplo, etiqueta Myc, etiqueta FLAG).

A. Ensayos para cuantificar ácidos orgánicos pequeños

45 Los métodos que pueden usarse para cuantificar dichos ácidos pueden ser, pero sin limitarse a, a) para la extracción y purificación: extracción con disolvente, extracción con aceite, extracción con vapor, extracción con CO2 supercrítico, cromatografía de líquidos, destilación, cromatografía de gases; b) para la cuantificación: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Un experto sabe cómo realizar dichos métodos.

B. Ensayos que miden la cantidad o variación de RCC356

50 Los niveles de RCC356 pueden medirse y compararse con patrones con el fin de determinar si está presente en una muestra un nivel anómalo de dicho receptor, es decir, más o menos que en un tejido patrón, cualquiera de los cuales indica una probable desregulación de la señalización de RCC356. Se miden los niveles de polipéptido, por ejemplo, mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos para el polipéptido. Una muestra de un individuo que se sospecha que padece una enfermedad o trastorno caracterizado por actividad de RCC356 se pone en contacto con un anticuerpo para RCC356, y se mide la unión del anticuerpo tal como se conoce en la técnica (por ejemplo, mediante medición de la actividad de una enzima conjugada con un anticuerpo secundario).

55 Otro enfoque para la medición de los niveles de polipéptido de RCC356 usa análisis de citometría de flujo de células de un tejido afectado. Se conocen bien en la técnica métodos de citometría de flujo, incluyendo el marcaje fluorescente de anticuerpos específicos para RCC356. Otros enfoques incluyen radioinmunoanálisis o ELISA. También se conocen bien en la técnica métodos para cada uno de estos.

La cantidad de unión detectada se compara con la unión en una muestra de tejido similar de un individuo sano, o de un sitio en el individuo afectado que no está afectado de ese modo. Un aumento del 10% o más en relación con el patrón es un diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de RCC356.

5 La expresión de RCC356 también puede medirse determinando la cantidad de ARNm que codifica para dicho polipéptido en una muestra de tejido. El ARNm puede cuantificarse mediante PCR cuantitativa o semicuantitativa. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de amplificación "cuantitativa", y se dan a conocer secuencias de cebadores para la amplificación de RCC356 en el presente documento (documento US 6.790.631). Un método común de PCR cuantitativa implica amplificar conjuntamente de manera simultánea una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un patrón interno que puede usarse para calibrar la reacción de PCR. Se proporcionan protocolos detallados para PCR cuantitativa en 'PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications', Innis *et al.*, Academic Press, Inc. N.Y., (1990). Un aumento del 10% o más en la cantidad de ARNm que codifica para RCC356 en una muestra, en relación con la cantidad expresada en una muestra de tejido similar de un individuo sano o en una muestra de tejido de una ubicación no afectada en un individuo afectado es un diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356.

C. Ensayos cualitativos

20 Pueden usarse para diagnóstico ensayos que evalúan si el polipéptido de RCC356 o el ARNm que codifica para el mismo son o no de tipo natural. Con el fin de diagnosticar disfunción olfativa o enfermedades o trastornos del SNC caracterizados por desregulación de RCC356 de esta manera, se usa ARN aislado de una muestra como molde para la amplificación por PCR de RCC356. Las secuencias amplificadas se secuencian entonces directamente usando métodos convencionales, o se clonan en primer lugar en un vector, seguido por secuenciación. Una diferencia en la secuencia que cambia uno o más aminoácidos codificados en relación con la secuencia de RCC356 de tipo natural puede ser un diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por desregulación de la señalización de RCC356. Puede ser útil cuando se identifica un cambio en la secuencia codificante en una muestra, para expresar el ligando o receptor variante y comparar su actividad con la de RCC356 de tipo natural. Entre otros beneficios, este enfoque puede proporcionar mutantes novedosos, incluyendo mutantes nulos y activos de manera constitutiva.

30 Además de métodos de secuenciación convencionales, las secuencias amplificadas pueden someterse a ensayo para detectar la presencia de mutaciones específicas usando, por ejemplo, la hibridación de balizas moleculares que discriminan entre secuencias variantes y de tipo natural. Se conocen bien en la técnica ensayos de hibridación que discriminan basándose en cambios de tan sólo un nucleótido. Alternativamente, puede realizarse cualquiera de varios ensayos de "minisequenciación", incluyendo los descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.888.819, 6.004.744 y 6.013.431. Estos ensayos y otros conocidos en la técnica pueden determinar la presencia, en una muestra dada, de un ácido nucleico con un polimorfismo conocido.

35 Si se desea, pueden usarse métodos basados en alineamientos o microalineamientos para analizar la expresión o la presencia de mutación, en secuencias de RCC356. Se conocen bien en la técnica métodos basados en alineamientos para la minisequenciación y para la cuantificación de la expresión de ácidos nucleicos.

D. Ensayos funcionales

40 El diagnóstico de disfunción olfativa relacionada con ácido isovalérico o un trastorno o enfermedad del SNC puede realizarse también usando ensayos funcionales. Para hacer esto, se usan membranas celulares o extractos celulares preparados a partir de una muestra de tejido en un ensayo de la actividad de RCC356 tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, ensayos de unión de ligando, ensayos de flujo de calcio, ensayos de polarización de membrana, ensayo de melanóforos, ensayo de unión de GTP, ensayo de GTPasa, ensayo de adenilato ciclasa, ensayo de AMPc, descomposición de fosfolípidos, ensayos de diacilglicerol o inositol trifosfato, ensayos de activación de PKC o PKA, ensayo de cinasa o ensayo de internalización de receptores). La actividad detectada se compara con la de una muestra patrón tomada de un individuo sano o de un sitio no afectado en el individuo afectado. Como alternativa, puede aplicarse una muestra o extracto de una muestra a células que expresan RCC356, seguido por medición de la actividad de señalización de RCC356 en relación con una muestra patrón. Una diferencia del 10% o más en la actividad medida en cualquiera de estos ensayos, en relación con la actividad del patrón, es un diagnóstico de disfunción olfativa relacionada con ácido isovalérico o un trastorno o enfermedad del SNC.

Modulación de la actividad de RCC356 expresada en una célula según la memoria descriptiva

55 El descubrimiento de ácido isovalérico como ligando de RCC356 proporciona métodos de modulación de la actividad de un polipéptido de RCC356 expresado en una célula. La actividad de RCC356 se modula en una célula administrando a esa célula un agente que modula la función del polipéptido de RCC356. Esta modulación puede realizarse en células cultivadas como parte de un ensayo para la identificación de agentes moduladores adicionales o, por ejemplo, en un animal, incluyendo un ser humano. Los agentes incluyen ácido isovalérico y ácidos equivalentes del mismo.

Un agente puede administrarse a una célula añadiéndolo al medio de cultivo. La cantidad que va a administrarse variará con la identidad del agente y con el fin para el que se administra. Por ejemplo, en un ensayo de cultivo para identificar antagonistas de la actividad de RCC356, se añadirá preferiblemente una cantidad de ácido isovalérico que activa a la mitad de la máxima los receptores (por ejemplo, aproximadamente CE_{50}), preferiblemente sin superar la dosis requerida para la saturación de los receptores. Esta dosis puede determinarse valorando la cantidad de ácido isovalérico para determinar el punto en el que la adición adicional de ácido isovalérico no tiene ningún efecto adicional sobre la actividad de RCC356.

Cuando se administra un modulador de la actividad de RCC356 como medicamento a un animal para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, un experto en la técnica puede ajustar la cantidad administrada basándose en el desenlace deseado. Se logra un tratamiento satisfactorio cuando uno o más aspectos medibles de la patología (por ejemplo, crecimiento de células tumorales, acumulación de células inflamatorias, percepción olfativa y actividades del SNC) cambian en al menos el 10% en relación con el valor para ese aspecto antes del tratamiento.

Moduladores candidatos útiles según la memoria descriptiva

Pueden seleccionarse moduladores candidatos a partir de grandes bibliotecas de compuestos naturales o sintéticos. Se usan actualmente numerosos medios para la síntesis al azar y dirigida de diversas clases de compuestos. Están disponibles comercialmente bibliotecas de compuestos sintéticos de varias compañías incluyendo, por ejemplo, Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, RU), Corngenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), y Microsource (New Milford, CT). Está disponible una biblioteca química poco común de Aldrich (Milwaukee, WI). Están disponibles y pueden prepararse bibliotecas combinatorias de moléculas orgánicas pequeñas. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales de, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o pueden producirse fácilmente por métodos bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, se modifican fácilmente bibliotecas naturales y producidas de manera sintética a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

Tal como se indicó previamente en el presente documento, los moduladores candidatos pueden ser variantes o equivalentes de ácido isovalérico. Por tanto, puede usarse una biblioteca de compuestos relacionados con ácido isovalérico. Tal como se muestra mediante los resultados de la presente invención (figura 3), el ácido isovalérico (estructura iso) y el ácido valérico (estructura lineal) conducen a CE_{50} similares, también se han sometido a prueba cadenas de desde 4 hasta 9 carbonos, todas las cuales desencadenan la activación de RCC356. Por tanto, la presente memoria descriptiva sugiere que pueden prepararse variantes (o equivalentes) de IVA que conducen a compuestos con actividad comparable a IVA para RCC356. En particular, la presente memoria descriptiva sugiere una posible variación jugando con la longitud de la cadena alifática, desde 2 carbonos hasta 12 carbonos por ejemplo, jugando con la estructura iso frente a lineal, jugando también con la longitud de cada cadena de radical de la versión iso, jugando con el grupo funcional tanto en la forma iso como en la lineal de la molécula (es decir, carboxílico, aldehído, alcohol, éster, éter...), jugando con la posición de este grupo funcional tanto en la estructura iso como en la lineal.

Anticuerpos útiles según la memoria descriptiva

La memoria descriptiva se refiere al uso terapéutico de anticuerpos frente a RCC356 y ácido isovalérico y complejo ácido isovalérico/RCC356. Pueden prepararse anticuerpos usando protocolos convencionales conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, hámster, cabra, oveja o conejo, o un ave tal como un pollo puede inmunizarse con una forma inmunogénica del péptido de RCC356 (por ejemplo, un polipéptido de RCC356 o un fragmento antigénico que puede provocar una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión tal como se describió anteriormente en el presente documento) o ácido isovalérico, o complejo ácido isovalérico/RCC356. Se preparan inmunógenos para generar anticuerpos mezclando los compuestos (por ejemplo, polipéptidos recombinantes aislados o péptidos sintéticos) con adyuvantes. Alternativamente, se preparan péptidos o polipéptidos de RCC356 como proteínas de fusión con proteínas inmunogénicas más grandes. Los polipéptidos también pueden unirse covalentemente a otras proteínas inmunogénicas más grandes, tales como hemocianina de lapa californiana. El ácido isovalérico puede hacerse más inmunogénico uniendo químicamente dichos péptidos a dicho ácido. Alternativamente, pueden usarse vectores virales o de plásmido que codifican para RCC356, o un fragmento de estas proteínas, para expresar los polipéptidos y generar una respuesta inmunitaria en un animal tal como se describe en Costagliola *et al.*, 2000, *J. Clin. Invest.* 105:803-811. Con el fin de generar anticuerpos, los inmunógenos se administran normalmente por vía intradérmica, por vía subcutánea o por vía intramuscular a animales experimentales tales como conejos, ovejas y ratones. Además de los anticuerpos tratados anteriormente, pueden prepararse derivados de anticuerpos modificados por ingeniería genética, tales como anticuerpos de cadena sencilla. Tales anticuerpos modificados por ingeniería genética podrían mantenerse como una biblioteca de presentación en fago. Por tanto, podría aislarse un anticuerpo modificado por ingeniería genética que reconoce RCC356, ácido isovalérico y/o complejo ácido isovalérico/RCC356 de esa biblioteca usando ensayos de unión incluyendo la tecnología Biacore.

El progreso de la inmunización puede monitorizarse mediante la detección de los títulos de anticuerpos en plasma o suero. También pueden usarse ELISA, citometría de flujo u otros inmunoensayos convencionales con el

inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Las preparaciones de anticuerpos pueden ser simplemente suero de un animal inmunizado, o si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales del suero mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando inmunógeno inmovilizado.

- 5 Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recogerse esplenocitos que producen anticuerpos de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos de fusión celular somática convencionales con células inmortalizadas tales como células de mieloma para producir células de hibridoma. Tales técnicas se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (originalmente desarrollada por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar *et al.*, (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. págs. 77-96). Pueden seleccionarse inmuoquímicamente células de hibridoma para detectar la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un ácido isovalérico o y ácido equivalente o polipéptido o péptido de RCC356 o complejo ácido isovalérico/RCC356, y aislarse anticuerpos monoclonales de los medio de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.
- 10
- 15 La producción de un anticuerpo específico para RCC356 se ha descrito en el documento US 6.790.631. Pueden prepararse fácilmente anticuerpos dirigidos contra ácido isovalérico usando uno de los métodos de la técnica anterior mencionados anteriormente.

Animales transgénicos útiles según la memoria descriptiva

- 20 Animales transgénicos que expresan RCC356 o variantes del mismo son útiles para estudiar la señalización a través de RCC356, así como para el estudio de fármacos o agentes que modulan la actividad de RCC356. Un animal transgénico es un animal no humano que contiene al menos un gen foráneo, denominado transgén, que es parte de su material genético. Preferiblemente, el transgén está contenido en la línea germinal del animal de manera que puede transmitirse a la descendencia del animal. Pueden usarse varias técnicas para introducir el transgén en el material genético de un animal, incluyendo, pero sin limitarse a, microinyección del transgén en pronúcleos de óvulos fertilizados y manipulación de células madre embrionarias (patente estadounidense n.º 4.873.191 de Wagner y Hoppe; Palmiter y Brinster, 1986, *Ann. Rev. Genet.*, 20:465-499; solicitud de patente francesa 2593827 publicada el 7 de agosto de 1987). Los animales transgénicos portan el transgén en todas sus células o pueden ser genéticamente un mosaico.
- 25

- 30 Según el método de transgénesis convencional, se inyectan copias adicionales de genes normales o modificados en el pronúcleo masculino del cigoto y se integran en el ADN genómico del ratón receptor. El transgén se transmite de manera mendeliana en cepas transgénicas establecidas. Los transgenes pueden expresarse de manera constitutiva o pueden ser específicos de tejido o incluso sensibles a un fármaco exógeno, por ejemplo, tetraciclina. Un animal transgénico que expresa un transgén puede cruzarse con un segundo animal transgénico que expresa un segundo transgén de manera que su descendencia portará y expresará ambos transgenes.

35 Animales deficientes

- Pueden usarse animales que llevan una delección homocigota en las secuencias cromosómicas que codifican para RCC356 o variantes para estudiar la función del receptor. De particular interés es si una desactivación en genes responsables de la producción y/o el catabolismo de ácido isovalérico tales como IVDH_{asa} tiene un fenotipo distinto, en particular de cáncer o trastornos del SNC, lo que puede indicar si el ácido isovalérico es el único ligando que se une a RCC356 o si es un miembro de una familia. De particular interés adicional es la identificación del papel específico de RCC356/ácido isovalérico en procesos patológicos y/o fisiológicos específicos.
- 40

i. Animales deficientes convencionales

- Los animales deficientes son animales no humanos y se producen mediante el método de crear delecciones génicas con recombinación homóloga. Esta técnica se basa en el desarrollo de células madre embrionarias (ES) que se derivan de embriones, se mantienen en cultivo y tienen la capacidad de participar en el desarrollo de cada tejido en los animales cuando se introducen en un blastocisto huésped. Se produce un animal deficiente dirigiendo la recombinación homóloga a un gen diana específico en las células ES, produciendo de ese modo un alelo nulo del gen. La tecnología para preparar animales deficientes está bien descrita (véase, por ejemplo, Huszar *et al.*, 1997, *Cell*, 88:131; y Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997, *Nature*, 390:165). Un experto en la técnica puede generar un animal deficiente en RCC356 homocigoto o un animal con una desactivación en uno o más genes responsables de la producción y/o catabolismo de ácido isovalérico (por ejemplo, un ratón).
- 45
- 50

ii. Desactivación específica de tejido

- El método de recombinación homóloga dirigida se ha mejorado mediante el desarrollo de un sistema para la recombinación específica de sitio basado en la recombinasa específica de sitio del bacteriófago P1 Cre. Se usa la ADN recombinasa específica de sitio Cre-loxP del bacteriófago P1 en ensayos de ratones transgénicos con el fin de crear desactivaciones génicas restringidas a tejidos definidos o fases de desarrollo. La delección genética restringida regionalmente, en contraposición a la desactivación génica global, tiene la ventaja de que puede atribuirse un
- 55

fenotipo a un tejido/célula particular (Marth, 1996, Clin. Invest. 97: 1999). En el sistema Cre-loxP, se modifica por ingeniería genética una cepa de ratón transgénico de manera que sitios loxP flanquean uno o más exones del gen de interés. Los homocigotos para este denominado "gen *floxed*" se cruzan con un segundo ratón transgénico que expresa el gen de Cre bajo el control de un promotor transcripcional del tipo de tejido/célula. La proteína Cre corta entonces el ADN entre las secuencias de reconocimiento loxP y elimina eficazmente la función del gen diana (Sauer, 1998, Methods, 14:381). Hay ahora muchos ejemplos *in vivo* de este método, por ejemplo, la inactivación inducible de genes específicos de tejido mamario (Wagner *et al.*, 1997, Nucleic Acid Res., 25:4323). Un experto en la técnica puede generar por tanto un animal deficiente específico de tejido en el que genes relacionados con ácido isovalérico o RCC356 tal como se mencionó anteriormente se eliminan de manera homocigota en un tipo de célula o tejido elegido.

Kits útiles según la memoria descriptiva

La memoria descriptiva proporciona kits útiles para seleccionar moduladores de la actividad de RCC356, así como kits útiles para el diagnóstico de enfermedades o trastornos caracterizados por desregulación de la señalización de RCC356. Los kits útiles según la memoria descriptiva pueden incluir un polipéptido de RCC356 aislado (incluyendo un polipéptido de RCC356 asociado a células o a la membrana, por ejemplo, en membranas aisladas, células que expresan RCC356, o sobre un chip de SPR) y un ácido isovalérico aislado. Cuando se incluyen células, dicha célula puede estar transformada con un polinucleótido que codifica para dicho RCC356. El kit según la memoria descriptiva puede contener un polinucleótido que codifica para un polipéptido de RCC356 y ácido isovalérico. Todos los kits según la memoria descriptiva comprenderán los artículos establecidos o combinaciones de artículos y materiales de envasado para los mismos. Los kits también pueden incluir instrucciones para su uso.

Según el presente kit, dicho ácido isovalérico puede ser un agente relacionado con ácido isovalérico que tiene una capacidad de unión y/o modulación del receptor RCC356 similar al ácido isovalérico. Dichos agentes relacionados pueden ser por ejemplo ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácidos isoheptanoicos, ácido heptanoico, ácidos isoheptanoicos, ácido octanoico, ácidos iso-octanoicos, ácido nonanoico, ácidos isononanoicos, ácido valproico, isovaleramida, ácido caproico, ácido oenantílico, ácido caprílico, ácido hexahidrobenzoico, ácido pelagónico y ácido 5-hexenoico.

Según la presente memoria descriptiva, dicho polipéptido de RCC356 puede ser un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 20% o identidad superior, tal como el 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o incluso el 100% con el polipéptido representado en la figura 1b; y que se une específicamente al ácido isovalérico o ácidos equivalentes. Alternativamente, dicho polipéptido de RCC356 puede ser un fragmento del polipéptido de longitud completa tal como se muestra en la figura 1b, en el que el fragmento conserva al menos el 50% de la actividad de unión y el nivel de activación de la señalización cuando se usa ácido isovalérico. Según la presente memoria descriptiva, dicho polipéptido de RCC356 puede comprender una o más adiciones, inserciones, deleciones o sustituciones en relación con la secuencia representada en la figura 1b. Dicho polipéptido de RCC356 puede ser un polipéptido de RCC356 truncado; dicho polipéptido de RCC356 puede comprender secuencias adicionales que forman una proteína de fusión de RCC356, en el que dichas secuencias adicionales pueden elegirse del grupo que consiste en secuencias de glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), fosfatasa alcalina, tioredoxina, proteína fluorescente verde (GFP), etiquetas de histidina (por ejemplo, 6X o más His) o etiquetas de afinidad (por ejemplo, etiqueta Myc, etiqueta FLAG).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Selección de 80 odorizantes sobre RCC356

Se hicieron crecer células Hek293 en MEM complementado con FBS descomplementado a 37°C bajo un 5% de CO₂ y un 90% de humedad. Dos días antes de la selección, se sembraron en placa las células sobre placas de 96 pocillos (placas recubiertas con PDL, Becton-Dickinson). El día después, se transfectaron las células con un plásmido que codifica para el polipéptido de RCC356 junto con 2 plásmidos que codifican para luciferasa de luciérnaga y luciferasa de Renilla respectivamente. La transcripción de luciérnaga estaba dirigida por un promotor mínimo que incluía el elemento de respuesta a CREB (CRE), mientras que la luciferasa de Renilla estaba dirigida por el promotor de CMV, un promotor constitutivo fuerte. Se realizó la transfección usando el reactivo lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se dejaron las células transfectadas en condiciones de cultivo convencionales durante otras 24 horas, y entonces se procesaron para el ensayo funcional.

Se disolvieron odorizantes como disoluciones 1 M en DMSO. Entonces se sembraron en placa sobre placas de 96 pocillos como disoluciones 200 μ M en HBSS (Cambrex). El DMSO representaba de ese modo menos del 1% (v/v) de las disoluciones de odorizantes. Se incluyeron controles positivos tales como forskolina en las placas de odorizantes. La forskolina activa la producción de AMPc que a su vez, a través de unión al factor de transcripción CREB desencadena la producción de luciferasa de luciérnaga, el gen indicador del sistema. De ese modo, la actividad luciferasa detectada en cada pocillo pudo expresarse como un porcentaje de respuesta de forskolina, permitiendo la normalización de la misma.

Se realizó el ensayo funcional usando el kit de ensayo de luciferasa Dual-Glo según instrucciones del fabricante

(Promega).

La figura 2 muestra los resultados obtenidos tras dos selecciones independientes de 80 odorizantes en Hek293 que sobreexpresan polipéptido de RCC356. Muchos odorizantes parecían conducir a la activación de RCC356 incluyendo ácidos isovalérico, valérico, propiónico, hexanoico, heptanoico, caprílico y pelargónico. Entre estos posibles aciertos, sólo los ácidos isovalérico y valérico se encuentran en ambas selecciones.

Ejemplo 2: Análisis de concentración-respuesta de 7 odorizantes en células Hek293 que sobreexpresan polipéptido de RCC356.

Para validar adicionalmente los aciertos encontrados durante las selecciones de 80 odorizantes en células Hek293 que sobreexpresan RCC356, se han realizado análisis de concentración-respuesta.

Se hicieron crecer células Hek293 en MEM complementado con FBS descomplementado a 37°C bajo un 5% de CO₂ y un 90% de humedad. Dos días antes de la selección, se sembraron en placa las células sobre placas de 96 pocillos (placas recubiertas con PDL, Becton-Dickinson). El día después, se transfectaron las células con un plásmido que codifica para el polipéptido de RCC356 junto con 2 plásmidos que codifican para luciferasa de luciérnaga y luciferasa de Renilla respectivamente. La transcripción de luciérnaga estaba dirigida por un promotor mínimo que incluía el elemento de respuesta a CREB (CRE), mientras que la luciferasa de Renilla estaba dirigida por el promotor de CMV, un promotor constitutivo fuerte. Se realizó la transfección usando el reactivo lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se dejaron las células transfectadas en condiciones de cultivo convencionales durante otras 24 horas, y entonces se procesaron para el ensayo función al.

En primer lugar, se disolvieron odorizantes sometidos a prueba (ácido isovalérico, valérico, propiónico, hexanoico, heptanoico, caprílico y pelargónico) como disoluciones 1 M en DMSO. Entonces se sembraron en placa sobre placas de 96 pocillos a diferentes concentraciones que oscilaban entre 0,1 µM y 1 mM en HBSS (Cambrex). El DMSO representaba de ese modo menos del 1% (v/v) de las disoluciones de odorizantes. Se incluyeron controles positivos tales como forskolina en las placas de odorizantes. La forskolina activa la producción de AMPc que a su vez, a través de unión al factor de transcripción CREB desencadena la producción de luciferasa de luciérnaga, el gen indicador del sistema. De ese modo, la actividad luciferasa detectada en cada pocillo pudo expresarse como un porcentaje de respuesta de forskolina, permitiendo la normalización de la misma.

Se realizó el ensayo funcional usando el kit de ensayo de luciferasa Dual-Glo según instrucciones del fabricante (Promega).

La figura 3A muestra la eficacia de los diferentes ligandos identificados sobre la activación de RCC356. La figura 3B-D muestra los resultados del análisis de concentración-respuesta realizado con ácidos cítrico, isovalérico, valérico, caproico, oenantílico, caprílico, pelargónico, hexahidrobenczoico y 5-hexenoico en células Hek293 que sobreexpresan RCC356. Cada uno de los aciertos sometidos a prueba se confirma que es un ligando de RCC356. Entre los odorizantes sometidos a prueba, el ácido isovalérico es el ligando más eficaz del polipéptido de RCC356. El ácido isovalérico desencadena la activación de RCC356 con una CE50 de 25 µM. Los ácidos valérico, caproico, oenantílico, caprílico, pelargónico, hexahidrobenczoico y 5-hexenoico conducen a activación de RCC356 también, con CE50 de 97 µM, 91 µM, 260 µM, 329 µM, 643 µM, 104 µM y 485 µM, respectivamente.

Ejemplo 3: Ensayos de obtención de imágenes de calcio de células individuales realizados en células Hek 293 que sobreexpresan polipéptido de RCC356.

Para el ensayo de obtención de imágenes de calcio de células individuales, se sembraron en placa las células en placas de 96 pocillos 48 h antes del experimento y se transfectaron con ADNc de receptores olfativos 20 h antes del ensayo de obtención de imágenes de calcio, usando lipofectamine (Invitrogen Inc.) según el protocolo del fabricante. Tras una incubación de una hora a 37°C en un tampón de solución salina que contenía Fluo4-AM 4 µg/ml (Molecular Probe), se enjuagaron las células dos veces con tampón de solución salina libre de Fluo4-AM. Se añadieron a cada pocillo 50 µl de tampón de solución salina. Se registró la movilización de calcio con 20X aumentos en un microscopio Axiovert 200 Mot de Zeiss equipado para la detección de la fluorescencia. Se tomó una imagen del mismo campo cada segundo durante 60 segundos. Se inyectaron 50 µl del ligando concentrado dos veces solubilizado en el tampón de solución salina 10 segundos tras iniciar el registro. Los ligandos sometidos a prueba fueron ácido isovalérico (figura 4), ácido butírico (figura 5) y ácido pelargónico (figura 6).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ChemCom S.A.

<120> Ligando natural del receptor acoplado a proteínas G RCC356 y usos del mismo

<130> CHEMC-003-PCT

<150> EP 05447046.3

<151> 03-03-2005

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sustrato para proteína tirosina cinasa

10 <400> 1

Arg Arg Leu Ile Glu Asp Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Gly
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido derivado de MARCKS

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (1)..(1)

<223> x = Ac

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

25 <223> X = NH2

<400> 2

Xaa Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Xaa
1 5

<210> 3

<211> 11

ES 2 373 913 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ggggactttc c 11

5 <210> 4

<211> 957

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

atgatggtgg atccaatgg caatgaatcc agtgctacat acttcatcct aataggcctc      60
cctggtttag aagaggctca gttctggttg gccttcccat tgtgctccct ctaccttatt      120
gctgtgctag gtaacttgac aatcatctac attgtgcgga ctgagcacag cctgcatgag      180
cccatgtata tatttctttg catgctttca ggcattgaca tcctcatctc cacctcatcc      240
atgcccaaaa tgctggccat cttctggttc aattccacta ccatccagtt tgatgcttgt      300
ctgctacaga tgtttgccat ccactcctta tctggcatgg aatccacagt gctgctggcc      360
atggcttttg accgctatgt ggccatctgt caccactgac gccatgccac agtacttacg      420
ttgcctcgtg tcacaaaaat tgggtgtggct gctgtggtgc ggggggctgc actgatggca      480
ccccttcctg tcttcatcaa gcagctgccc ttctgcccgt ccaatatect ttcccattcc      540
tactgcctac accaagatgt catgaagctg gcctgtgatg atatccgggt caatgtcgtc      600
tatggcctta tcgtcatcat ctccgccatt ggcctggact cacttctcat ctcttctca      660
tatctgctta ttcttaagac tgtgttgggc ttgacacgtg aagcccaggc caaggcattt      720
ggcacttgcg tctctcatgt gtgtgctgtg ttcatattct atgtaccttt cattggattg      780
tccatggtgc atcgctttag caagcggcgt gactctccgc tgcccgtcat cttggccaat      840
atctatctgc tggttcctcc tgtgctcaac ccaattgtct atggagtgaa gacaaaggag      900
attcgacagc gcatccttcg acttttccat gtggccacac acgcttcaga gccctag      957

```

10

<210> 5

<211> 318

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 5

ES 2 373 913 T3

Met Met Val Asp Pro Asn Gly Asn Glu Ser Ser Ala Thr Tyr Phe Ile
 1 5 10 15
 Leu Ile Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Ala Gln Phe Trp Leu Ala Phe
 20 25 30
 Pro Leu Cys Ser Leu Tyr Leu Ile Ala Val Leu Gly Asn Leu Thr Ile
 35 40 45
 Ile Tyr Ile Val Arg Thr Glu His Ser Leu His Glu Pro Met Tyr Ile
 50 55 60
 Phe Leu Cys Met Leu Ser Gly Ile Asp Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ser
 65 70 75 80
 Met Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp Phe Asn Ser Thr Thr Ile Gln
 85 90 95
 Phe Asp Ala Cys Leu Leu Gln Met Phe Ala Ile His Ser Leu Ser Gly
 100 105 110

Met Glu Ser Thr Val Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala
 115 120 125

Ile Cys His Pro Leu Arg His Ala Thr Val Leu Thr Leu Pro Arg Val
 130 135 140

Thr Lys Ile Gly Val Ala Ala Val Val Arg Gly Ala Ala Leu Met Ala
 145 150 155 160

Pro Leu Pro Val Phe Ile Lys Gln Leu Pro Phe Cys Arg Ser Asn Ile
 165 170 175

Leu Ser His Ser Tyr Cys Leu His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Cys
 180 185 190

Asp Asp Ile Arg Val Asn Val Val Tyr Gly Leu Ile Val Ile Ile Ser
 195 200 205

Ala Ile Gly Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Ile
 210 215 220

Leu Lys Thr Val Leu Gly Leu Thr Arg Glu Ala Gln Ala Lys Ala Phe
 225 230 235 240

Gly Thr Cys Val Ser His Val Cys Ala Val Phe Ile Phe Tyr Val Pro
 245 250 255

Phe Ile Gly Leu Ser Met Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg Asp Ser
 260 265 270

Pro Leu Pro Val Ile Leu Ala Asn Ile Tyr Leu Leu Val Pro Pro Val
 275 280 285

Leu Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Glu Ile Arg Gln Arg
 290 295 300

Ile Leu Arg Leu Phe His Val Ala Thr His Ala Ser Glu Pro
 305 310 315

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de identificación de un agente que se une a RCC356 o para detectar la presencia de tal agente en dicha muestra, comprendiendo dicho método:
 - 5 a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico en presencia o en ausencia de un modulador candidato o de dicha muestra en condiciones que permiten la unión de dicho ácido isovalérico a dicho polipéptido de RCC356; y
 - 10 b) medir la unión de dicho polipéptido de RCC356 a dicho ácido isovalérico, en el que una disminución en la unión en presencia de dicho modulador candidato o dicha muestra, en relación con la unión en ausencia de dicho modulador candidato o dicha muestra, identifica dicho modulador candidato como un agente que se une a RCC356 o indica la presencia de tal agente en dicha muestra,

y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
2. Método *in vitro* de identificación de un agente que modula la función de RCC356 o para detectar la presencia de tal agente en una muestra, comprendiendo dicho método:
 - 15 a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con ácido isovalérico en presencia o en ausencia de un modulador candidato o de dicha muestra, en condiciones que permiten la activación de dicho polipéptido de RCC356 por ácido isovalérico, y
 - 20 b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356, en el que un cambio en la actividad en presencia de dicho modulador candidato o dicha muestra en relación con la actividad en ausencia de dicho modulador candidato o dicha muestra identifica dicho modulador candidato como un agente que modula la función de RCC356 o indica la presencia de tal agente en dicha muestra,

y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
3. Método *in vitro* de identificación de un agente que modula la función de RCC356 o para detectar la presencia de tal agente en una muestra, comprendiendo dicho método:
 - 25 a) poner en contacto un polipéptido de RCC356 con un modulador candidato o con dicha muestra;
 - b) medir una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356 en presencia de dicho modulador candidato o dicha muestra; y
 - 30 c) comparar dicha actividad medida en presencia de dicho modulador candidato o dicha muestra con la actividad medida en una reacción en la que dicho polipéptido de RCC356 se pone en contacto con ácido isovalérico a su CE_{50} , en el que dicho modulador candidato se identifica como un agente que modula la función de RCC356 cuando la cantidad de dicha actividad medida en presencia de dicho modulador candidato es al menos el 10% de la cantidad inducida por dicho ácido isovalérico presente a su CE_{50} , o en el que dicho agente se detecta en dicha muestra si la cantidad de dicha actividad medida en presencia de dicha muestra es al menos el 10% de la cantidad inducida por dicho ácido isovalérico presente a su CE_{50} ,

35 y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ácido isovalérico está marcado de manera detectable.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho ácido está marcado de manera detectable con un resto seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, un fluoróforo, un extintor de fluorescencia y un resto detectable por RMN.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha puesta en contacto se realiza en o sobre una célula que expresa dicho polipéptido de RCC356.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha puesta en contacto se realiza en o sobre liposomas sintéticos.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha puesta en contacto se realiza en o sobre membranas en gemación inducidas por virus que contienen dicho polipéptido de RCC356.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, realizándose dicho método usando una fracción de membrana de células que expresan dicho polipéptido de RCC356.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, realizándose dicho método sobre un chip de

proteínas.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha medición se realiza usando un método seleccionado de desplazamiento de marcador, resonancia de plasmón superficial, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, extinción de fluorescencia y polarización de fluorescencia.
- 5 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico y una molécula orgánica pequeña incluyendo pero sin limitarse a un compuesto odorizante y una feromona.
- 10 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 6 a 12, en el que dicha etapa de medición de una actividad de señalización de dicho polipéptido de RCC356 comprende detectar un cambio en el nivel de un segundo mensajero.
- 15 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 6 a 13, en el que la etapa de medición de una actividad de señalización comprende la medición de la unión/acoplamiento o intercambio de un nucleótido de guanina, actividad adenilato ciclasa, AMPc, actividad proteína cinasa C, actividad proteína cinasa A, descomposición de fosfatidilinositol, diacilglicerol, inositol trifosfato, calcio intracelular, flujo de calcio, ácido araquidónico, actividad MAP cinasa, actividad tirosina cinasa, cambio de la coloración celular debido a melanosomas, internalización de receptores o expresión de gen indicador.
- 20 15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha actividad de señalización se mide usando un ensayo de fluorescencia o luminiscencia, un ensayo de melanóforos o un ensayo de internalización de receptores.
- 25 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, siendo dicho método un método de selección de alto rendimiento.
- 30 17. Método según cualquier reivindicación 1 a 16, en el que dicho agente es parte de una biblioteca química o extractos orgánicos animales.
- 35 18. Método *in vitro* de modulación de la actividad de un polipéptido de RCC356 en una célula, comprendiendo dicho método la etapa de suministrar a dicha célula ácido isovalérico que modula la actividad de un polipéptido de RCC356, de manera que se modula la actividad de RCC356, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 40 19. Composición que comprende un polipéptido de RCC356 aislado y ácido isovalérico, y en la que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 45 20. Uso de ácido isovalérico y un polipéptido de RCC356 aislado para la producción de una composición que comprende dicho polipéptido de RCC356 aislado y dicho ácido isovalérico, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 50 21. Uso de ácido isovalérico y un polipéptido de RCC356 aislado para la producción de un kit para seleccionar agentes que modulan la señalización de RCC356, para la producción de un kit para el diagnóstico o pronóstico de cáncer o metástasis tumoral, o para la producción de un kit para seleccionar odorizantes o antagonistas de odorizantes, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
22. Uso de ácido isovalérico como ligando para un polipéptido de RCC356 aislado, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
23. Método *in vitro* de diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa relacionada con ácido isovalérico, comprendiendo dicho método:
 - a) cuantificar el contenido en RCC356 de una muestra de tejido, en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico, o cuantificar el ARNm que codifica para dicho RCC356 y/o verificar la exactitud de la secuencia de RCC356 en comparación con la secuencia de RCC356 de tipo natural en una muestra de tejido; y
 - b) comparar la cantidad de dicho receptor cuantificada en la etapa (a) con un patrón, o comparar la cantidad y/o la exactitud de dicho ácido nucleico cuantificada o determinada en la etapa (a) con un patrón, en el que una diferencia en dicha cantidad de RCC356 o una diferencia en la secuencia de RCC356 en relación con dicho patrón es un diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa.

24. Método según la reivindicación 23, en el que la cuantificación se realiza usando anticuerpos frente a RCC356, o ácido isovalérico.
- 5 25. Kit que comprende un polipéptido de RCC356 aislado, ácido isovalérico y materiales de envasado para los mismos, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
26. Kit que comprende un polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido de RCC356, ácido isovalérico y materiales de envasado para los mismos, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 10 27. Kit que comprende una célula que expresa un polipéptido de RCC356 o membranas del mismo, ácido isovalérico y materiales de envasado para los mismos, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 15 28. Kit según la reivindicación 27, en el que dicha célula está transformada con un polinucleótido que codifica para dicho RCC356.
29. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, para seleccionar agentes que modulan actividad de señalización de RCC356.
30. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, para seleccionar odorizantes o agentes anti-odorizantes.
- 20 31. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, para seleccionar compuestos anticancerígenos.
32. Uso de un kit según la reivindicación 31, en el que dicho cáncer se elige del grupo que consiste en cáncer de próstata, de cuello uterino, de útero, de recto, de estómago y de riñón.
- 25 33. Uso de un kit que comprende RCC356, para el diagnóstico o pronóstico de disfunción olfativa relacionada con ácido isovalérico, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 30 34. Uso de un animal transgénico no humano para RCC356 para estudiar el efecto del ácido isovalérico sobre el tratamiento y/o la progresión del cáncer, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 35 35. Uso según la reivindicación 34, en el que se estudia la progresión y/o el tratamiento de cáncer de próstata, de cuello uterino, de útero, de recto, de estómago y de riñón.
36. Uso de un animal transgénico no humano para RCC356 para estudiar la progresión y/o el tratamiento de disfunción olfativa relacionada con ácido isovalérico, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 40 37. Uso de un animal deficiente en RCC356 no humano para estudiar el efecto de RCC356 sobre la progresión de disfunción olfativa relacionada con ácido isovalérico, y en el que dicho polipéptido de RCC356 tiene una identidad de aminoácidos del 80% o más con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 y puede unirse a ácido isovalérico.
- 45 38. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, 23 ó 24, uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 y 29 a 37, composición según la reivindicación 19 o kit según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en los que se usa un equivalente de ácido isovalérico, eligiéndose dicho equivalente del grupo que consiste en ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácidos isohexanoicos, ácido heptanoico, ácidos isoheptanoicos, ácido octanoico, ácidos isooctanoicos, ácido nonanoico, ácidos isononanoicos, ácido valproico, ácido hexahidrobenczoico y ácido 5-hexenoico.
- 50 39. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, 23 ó 24, uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 y 29 a 37, composición según la reivindicación 19 o kit según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en los que se usa un equivalente de ácido isovalérico, eligiéndose dicho equivalente del grupo que consiste en ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido oenantílico, ácido caprílico, ácido hexahidrobenczoico, ácido pelargónico y ácido 5-hexenoico.
40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, 23 ó 24, uso según cualquiera de las

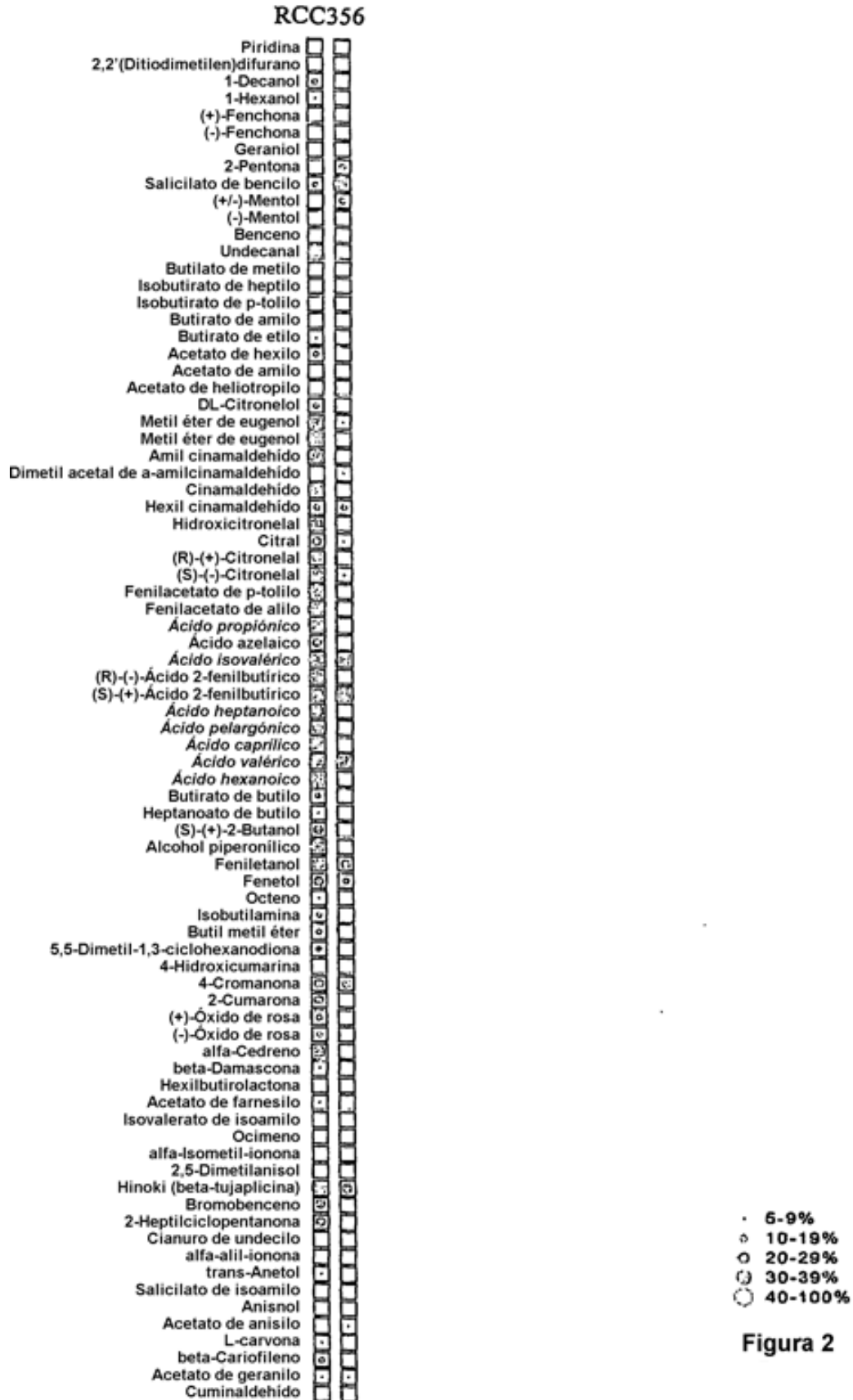
reivindicaciones 20 a 22 y 29 a 37, composición según la reivindicación 19 o kit según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, o método, uso, composición o kit según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 39, en los que el polipéptido de RCC356 es una quimera o un fragmento activo del mismo que puede unirse a ácido isovalérico.

SEQ ID NO. 4 y 5

ATGATGGTGGATCCCAATGGCAATGAATCCAGTGCTACATACTTCATCCTAATAGGCCTCCC
TGGTTTAGAAGAGGCTCAGTTCTGGTTGGCCTTCCCATTGTGCTCCCTCTACCTTATTGCTG
TGCTAGGTAACCTTGACAATCATCTACATTGTGCGGACTGAGCACAGCCTGCATGAGCCCATG
TATATATTTCTTTGCATGCTTTCAGGCATTGACATCCTCATCTCCACCTCATCCATGCCAAA
ATGCTGGCCATCTTCTGGTTCAATTCCACTACCATCCAGTTTGATGCTTGTCTGCTACAGATG
TTTGCCATCCACTCCTTATCTGGCATGGAATCCACAGTGCTGCTGGCCATGGCTTTTGACCG
CTATGTGGCCATCTGTCACCCACTGCGCCATGCCACAGTACTTACGTTGCCTCGTGTCACCA
AAATTGGTGTGGCTGCTGTGGTGCAGGGGGGCTGCACTGATGGCACCCCTTCCTGTCTTCAT
CAAGCAGCTGCCCTTCTGCCGCTCCAATATCCTTTCCCATTCTACTGCCTACACCAAGATGT
CATGAAGCTGGCCTGTGATGATATCCGGGTCAATGTCGTCTATGGCCTTATCGTCATCATCT
CCGCCATTGGCCTGGACTCACTTCTCATCTCCTTCTCATATCTGCTTATTCTTAAGACTGTGT
TGGGCTTGACACGTGAAGCCCAGGCCAAGGCATTTGGCACTTGCCTCTCATGTGTGTGCT
GTGTTCATATTCTATGTACCTTTCATTGGATTGTCCATGGTGCATCGCTTATAGCAAGCGGCG
TGACTCTCCGCTGCCCGTCATCTTGGCCAATATCTATCTGCTGGTTCCTCCTGTGCTCAACCC
AATTGTCTATGGAGTGAAGACAAAGGAGATTCGACAGCGCATCCTTCGACTTTTCCATGTGG
CCACACACGCTTCAGAGCCCTAG

MMVDPNGNESSATYFILIGLPGLEEAQFWLAFPLCSLYLIAVLGNLTIIYIVRTEHSLHEPMYIFLC
MLSGIDILISTSSMPKMLAIFWFNSTTIQFDAQLLQMFJHSLSGMESTVLLAMAFDRYVAICHPL
RHATVLTLPVTKIGVAAVVRGAALMAPLPVFIKQLPFCRSNILSHSYCLHQDVMKLCDDIRVN
VYGLIIVISAIGLDSLLISFSYLLILKTVLGLTREAQAKAFGTCVSHVCAVFIFVYVPFGLSMVHRF
SKRRDSPLPVILANIYLLVPPVLNPIVYGVKTKAIRQRILRLFHVATHASEP*

Figura 1



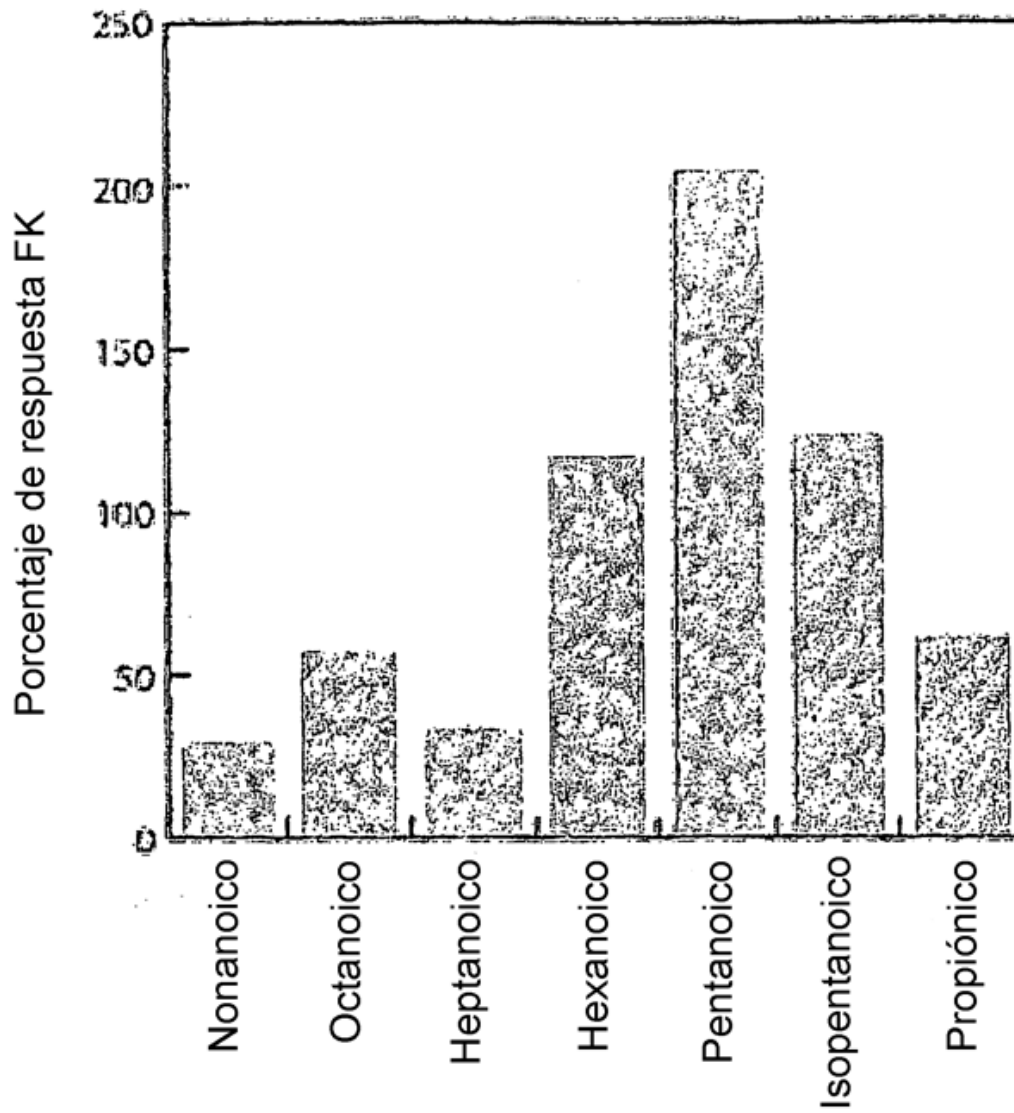


Figura 3 A

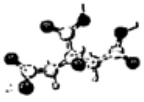
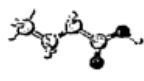
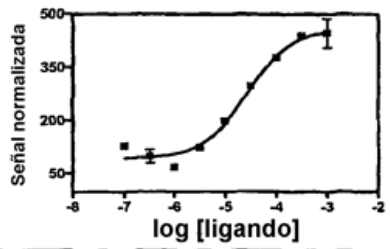
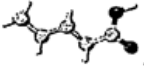
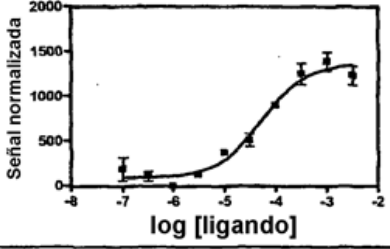

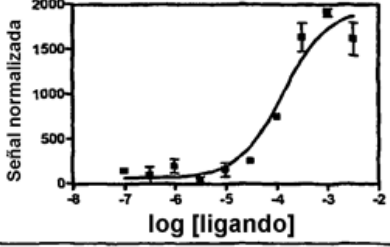
R	COOH	ESTRUCTURA	CURVA DE CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	Log CE50
ÁCIDO CÍTRICO				
(COOH)2- (CH2)2-C- OH	COOH			
ÁCIDO BUTÍRICO-ÁCIDO BUTANOICO				
CH3 - (CH2)2	COOH			-4,479 M
ÁCIDO VALÉRICO-ÁCIDO PENTANOICO				
CH3 - (CH2)3	COOH			-4,013M
ÁCIDO ISOVALÉRICO-ÁCIDO ISOPENTA- NOICO				
(CH3)2 - (CH2)2	COOH			-4,602 M

Figura 3 B


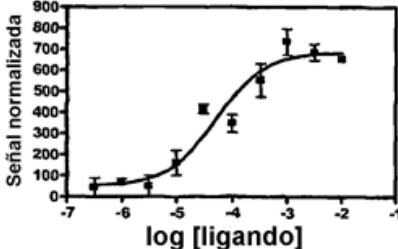
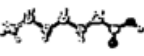
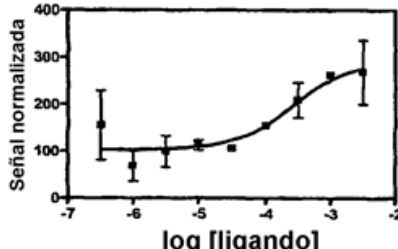
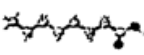
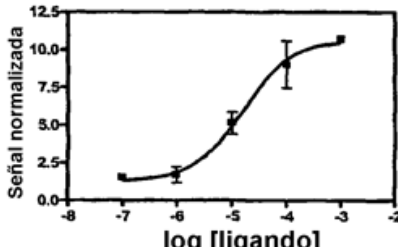
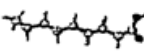
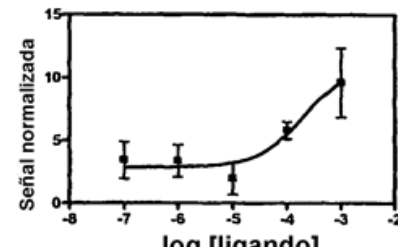
R	COOH	ESTRUCTURA	CURVA DE CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	Log CE:50
ÁCIDO CAPROICO-ÁCIDO HEXANOICO				
CH3 - (CH2)4	COOH			-4,040 M
ÁCIDO OENANTÍLICO-ÁCIDO HEPTANOICO				
CH3 - (CH2)5	COOH			-3,584 M
ÁCIDO CAPRÍLICO-ÁCIDO OCTANOICO				
CH3 - (CH2)6	COOH			-3,483 M
ÁCIDO PELARGÓNICO-ÁCIDO NONANOICO				
CH3 - (CH2)7	COOH			-3,192 M

Figura 3 C


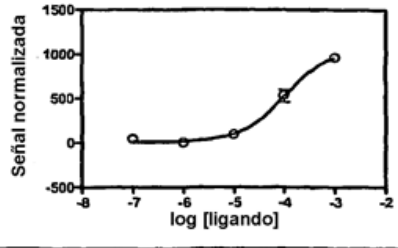
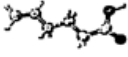
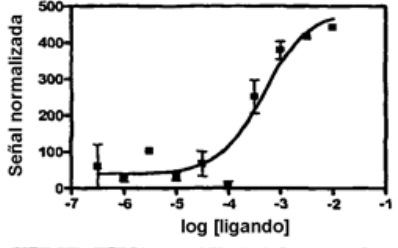
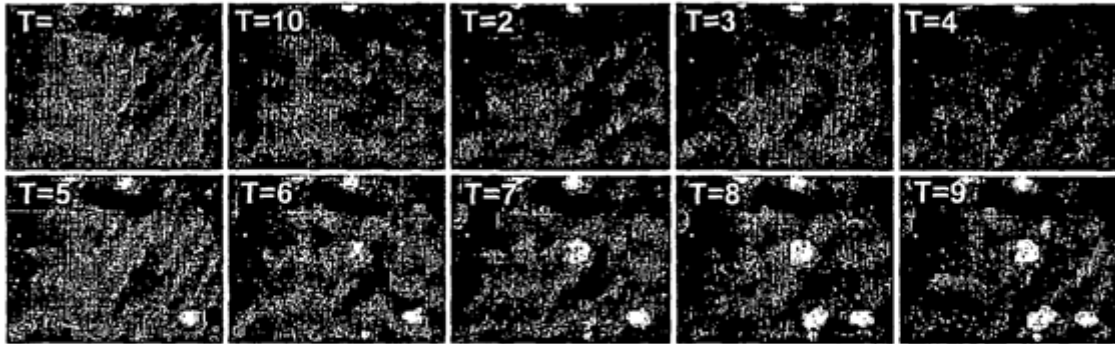
R	COOH	ESTRUCTURA	CURVA DE CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	Log CE 50
ÁCIDO HEXAHIDROBENZOICO- ÁCIDO CICLOHEXANOCARBOXÍLICO				
(CH ₂) ₅ - CH	COOH			-3,982
ÁCIDO 5-HEXENOICO				
CH ₂ -CH- (CH ₂) ₃	COOH			-3,314

Figura 3 D

A



B

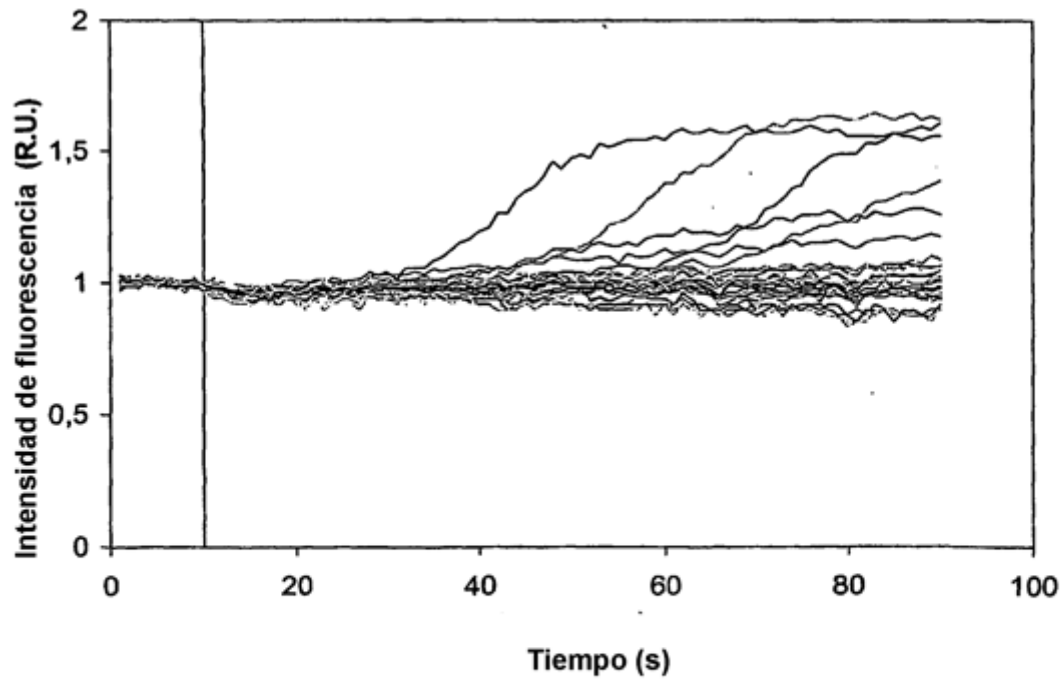
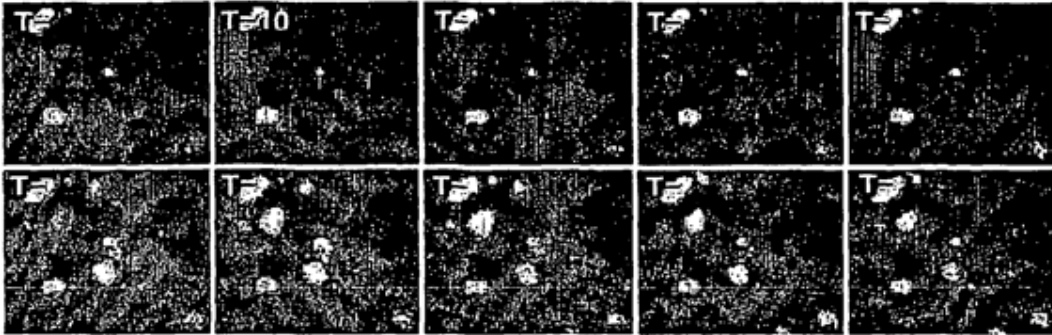


Figura 4

A



B

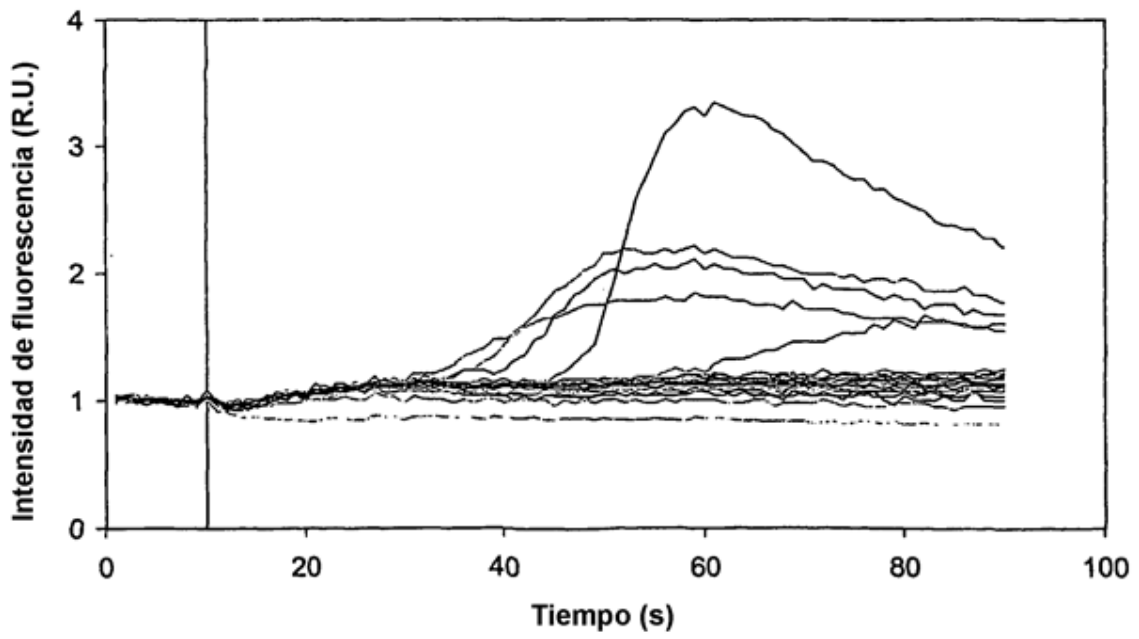
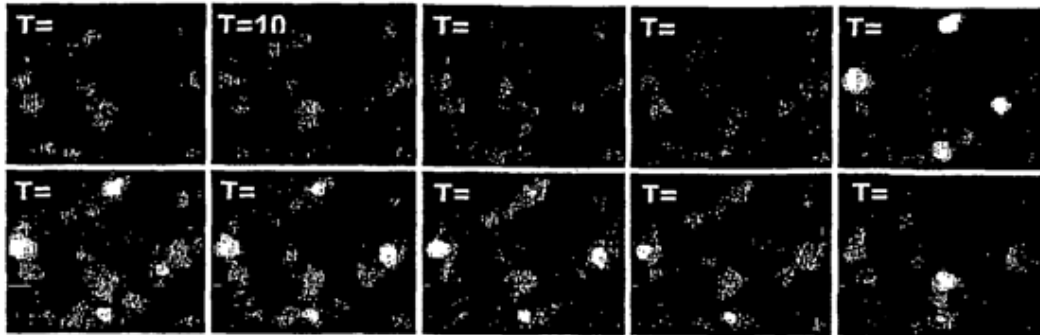


Figura 5

A



B

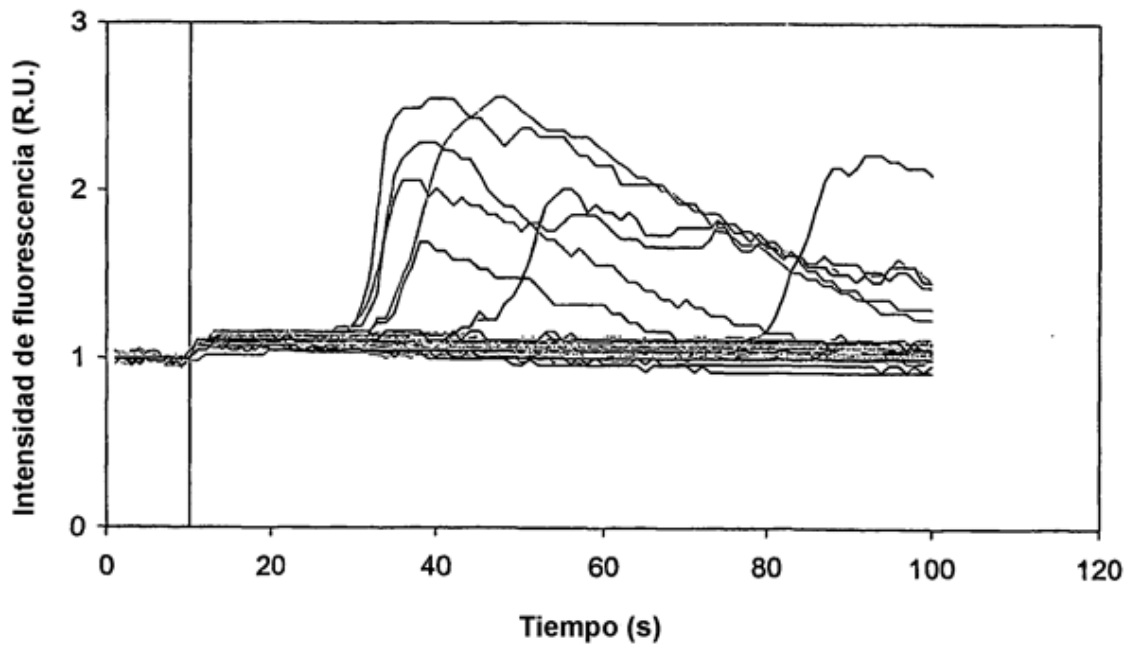


Figura 6