

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 831**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005 E 05822348 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1829969**

54 Título: **Nuevo polipéptido y su uso**

30 Prioridad:

**24.12.2004 JP 2004374029**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.04.2013**

73 Titular/es:

**NATIONAL CEREBRAL AND CARDIOVASCULAR  
CENTER (50.0%)  
5-7-1, Fujishirodai  
SUITA-SHI, OSAKA , JP y  
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANGAWA, KENJI;  
MORI, KENJI;  
MIYAZATO, MIKIYA y  
KOJIMA, MASAYASU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 399 831 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

Nuevo polipéptido y su uso.

**Campo técnico**

5 La presente invención está relacionada con un nuevo polipéptido o su sal, un polinucleótido que lo codifique y así sucesivamente.

**Antecedentes de la técnica**

10 La neuromedina U es un péptido aislado y purificado de médulas espinales porcinas, basándose en su actividad para contraer el músculo liso del útero de ratas. Se presentan en primer lugar dos neuromedinas U, concretamente, neuromedina U-8, compuesta de 8 restos de aminoácidos y neuromedina U-25 compuesta de 25 restos de aminoácidos (Minamino, N. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 130, 1078-1085, 1985). La secuencia de neuromedina U-8 es idéntica a la secuencia C terminal de neuromedina U-25 y la región cadena arriba contiene un par de aminoácidos básicos observados con frecuencia en el sitio de escisión para procesamiento, y se espera por lo tanto que las dos neuromedinas U deriven de un precursor común. Además, se conocen ampliamente otras funciones fisiológicas aparte de la actividad de contracción de músculo liso. Se ha indicado que tales funciones incluyen, por ejemplo, un aumento de la presión sanguínea (Minamino, N. *et al.*), una reducción del flujo sanguíneo esplácnico (Sumi, S. *et al.*, Life Sci., 41, 1585-1590, 1987), ajuste del transporte de iones en el intestino (Brown, D. R. y Quito, F. L., Eur. J. Pharmacol. 155, 159-162, 1998) y un aumento de ACTH y un aumento posterior de corticosterona después de administración subcutánea de neuromedina U (Malendowicz, L. K. *et al.*, In Vivo, 7, 419-422, 1993). Además, se han presentado hasta ahora TGR1 (documento WO 01/57524) y FM-3 (documento WO 00/02918) como receptores para neuromedina U.

**Descripción de la invención**

25 En la actualidad, algunos agentes preventivos/terapéuticos para hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, esterilidad, hipotiroidismo, etc. Sin embargo, se desea proporcionar agentes mejores para prevenir/tratar hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.

30 Los presentes inventores realizaron estudios intensivos para resolver los problemas anteriores y descubrieron, como ligando endógeno para TGR1 y FM-3, un polipéptido que comprendía la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, 1 SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12 y también descubrieron que estos polipéptidos tienen actividades estimuladoras de células específicas. Basándose en estos hallazgos, se continuaron investigaciones adicionales. Como resultado, los inventores han llegado a conseguir la presente invención.

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se describen además en la presente memoria las siguientes características, y así sucesivamente.

35 (1) Un polipéptido, que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3, o su amida, o una sal del mismo.

(2) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, o su amida, o una sal del mismo.

40 (3) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2, o su amida, o una sal del mismo.

(4) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 3, o su amida, o una sal del mismo.

(5) Un péptido parcial del polipéptido de acuerdo con (1) anterior, su amida, o una sal del mismo.

45 (6) Un polinucleótido, que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con (1) anterior o su péptido parcial.

(7) El polinucleótido de acuerdo con (6) anterior, que es un ADN.

(8) El ADN de acuerdo con (7) anterior, que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 15.

(9) Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de acuerdo con (6) anterior.

50 (10) Un transformante, que se transforma con el vector recombinante de acuerdo con (9) anterior.

(11) El polipéptido de acuerdo con (1) anterior, que es un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6; su amida, o una sal del mismo.

55 (12) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4, o una sal del mismo.

(13) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 5, o una sal del mismo.

(14) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6, o una sal del

mismo.

(15) Un péptido parcial del polipéptido de acuerdo con (11) anterior, su amida o una sal del mismo.

(16) Un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con (11) anterior o su péptido parcial.

5 (17) El polinucleótido de acuerdo con (16) anterior, que es un ADN.

(18) El ADN de acuerdo con (13) anterior, que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 o SEC ID N°: 18.

(19) Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de acuerdo con (16) anterior.

(20) Un transformante, que se transforma con el vector recombinante de acuerdo con (19) anterior.

10 (21) Un polipéptido, que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o una sal del mismo.

(22) Un polipéptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o una sal del mismo.

15 (23) Un péptido parcial del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o una sal del mismo.

(24) Un polinucleótido, que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con (21) anterior.

(25) El polinucleótido de acuerdo con (24) anterior, que es un ADN.

(26) El ADN de acuerdo con (25) anterior, que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23 o SEC ID N°: 24.

20 (27) Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de acuerdo con (24) anterior.

(28) Un transformante, que se transforma con el vector recombinante de acuerdo con (27) anterior.

(29) Un método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (1) anterior, que comprende usar dicho polipéptido, su péptido parcial, su amida o una sal del mismo.

25 (30) El método de exploración de acuerdo con (29) anterior, que comprende usar (i) el polipéptido de acuerdo con (1) anterior, su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, y (ii) una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29, o su péptido parcial, o una sal del mismo.

(31) El método de exploración de acuerdo con (30) anterior, que comprende usar una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, su péptido parcial, o una sal de la misma.

30 (32) El método de exploración de acuerdo con (29) anterior, que comprende usar (i) el polipéptido de acuerdo con (1) anterior, su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, y (ii) una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, o su péptido parcial, o una sal de la misma.

35 (33) El método de exploración de acuerdo con (32) anterior, en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31, o su péptido parcial, o una sal de la misma.

(34) Un kit para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (1) anterior, que comprende dicho polipéptido, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.

40 (35) El kit de exploración de acuerdo con (34) anterior, que comprende además una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29, o su péptido parcial, o una sal de la misma.

(36) El kit de exploración de acuerdo con (34) anterior, que comprende además una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, o su péptido parcial, o una sal de la misma.

45 (37) Un método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, que comprende usar dicho polipéptido o una sal del mismo.

(38) Un kit para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, que comprende dicho polipéptido o una sal del mismo.

(39) Un medicamento que comprende el polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.

50 (40) Un medicamento que comprende el polinucleótido de acuerdo con (6) o (16) anterior.

(41) Un medicamento que comprende un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.

(42) El medicamento de acuerdo con (39) a (41) anterior, que es un agente para prevenir/tratar hipotensión, obesidad, letargo o síndrome de cambio de zona horario.

55 (43) El medicamento de acuerdo con (39) a (41) anterior, que es un agente para prevenir/tratar esterilidad.

(44) Un método para prevenir/tratar hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria o esterilidad, que comprende promover la actividad del polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.

60 (45) Un método para prevenir/tratar hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria o esterilidad, que comprende administrar a un mamífero una dosis eficaz de (i) el polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido de acuerdo con (6) o (16) anterior, o (iii) un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.

65 (46) Uso de (i) el polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido de acuerdo con (6) o (16) anterior, o (iii) un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, para la fabricación de un agente para

- prevenir/tratar hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria o esterilidad.
- (47) Un medicamento que comprende el polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o usa sal del mismo.
- 5 (48) Un medicamento que comprende el polinucleótido de acuerdo con (24) anterior.
- (49) Un medicamento que comprende un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- (50) El medicamento de acuerdo con uno cualquiera de (47) a (49) anterior, que es un agente para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo.
- 10 (51) Un método para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo, que comprende promover la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- (52) Un método para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo, que comprende administrar a un mamífero una dosis eficaz de (i) el polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido de acuerdo con (24) anterior, o (iii) un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 15 (53) Uso de (i) el polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido de acuerdo con (24) anterior, o (iii) un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido, o su péptido parcial, o una sal del mismo, para la preparación de un agente para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo.
- (54) Un anticuerpo para el polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 20 (55) Un medicamento que comprende el anticuerpo de acuerdo con (54) anterior.
- (56) Un agente de diagnóstico que comprende el anticuerpo de acuerdo con (54) anterior.
- (57) El agente de diagnóstico de acuerdo con (56) anterior, que es un agente de diagnóstico para hipotensión, obesidad, letargo o síndrome de cambio de zona horaria.
- 25 (58) El agente de diagnóstico de acuerdo con (56) anterior, que es un agente de diagnóstico para esterilidad.
- (58a) El agente de diagnóstico de acuerdo con (56) anterior, que es un agente de diagnóstico para hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio o enfermedad inmunitaria/inflamatoria.
- (59) Un polinucleótido antisentido, que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria del polinucleótido de acuerdo con (6) o (16) anterior, o una parte de la secuencia de bases.
- 30 (60) Un medicamento que comprende el polinucleótido antisentido de acuerdo con (59) anterior.
- (61) Un medicamento que comprende un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 35 (62) El medicamento de acuerdo con (55), (61) o (61) anterior, que es un agente para prevenir/tratar hipertensión, anorexia o insomnio.
- (63) El medicamento de acuerdo con (55), (60) o (61) anterior, que es un agente para prevenir/tratar síntomas de la menopausia.
- (64) Un método para prevenir/tratar hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia o insomnio, que comprende inhibir la actividad de polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 40 (65) Un método para prevenir/tratar hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia o insomnio, que comprende administrar a un mamífero una dosis eficaz de (i) un anticuerpo del polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria del polinucleótido de acuerdo con (6) o (16) anterior, o una parte de la secuencia de bases, o (iii) un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 45 (66) Uso de (i) un anticuerpo del polipéptido de acuerdo con (1) u (11) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria del polinucleótido de acuerdo con (6) o (16) anterior, o una parte de la secuencia de bases, o (iii) un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, para la fabricación de un agente para prevenir/tratar hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia o insomnio.
- 50 (67) Un anticuerpo para el polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 55 (68) Un medicamento que comprende el anticuerpo de acuerdo con (67) anterior.
- (69) Un agente de diagnóstico que comprende el anticuerpo de acuerdo con (67) anterior.
- (70) El agente de diagnóstico de acuerdo con (69) anterior, que es un agente de diagnóstico para esterilidad o hipotiroidismo.
- (70a) El agente de diagnóstico de acuerdo con (69) anterior, que es un agente de diagnóstico para hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia o hipertiroidismo.
- 60 (71) Un polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria del polinucleótido de acuerdo con (24) anterior, o una parte de la secuencia de bases.
- (72) Un medicamento que comprende el polinucleótido antisentido de acuerdo con (71) anterior.
- 65 (73) Un medicamento que comprende un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.

- (74) El medicamento de acuerdo con (68), (72) o (73) anterior, que es un agente para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo.
- (75) Un método para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo, que comprende inhibir la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 5 (76) Un método para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo, que comprende administrar (i) un anticuerpo al polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) un polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria del polinucleótido de acuerdo con (24) anterior, o una parte de la secuencia de bases, o (iii) un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo.
- 10 (77) Uso de (i) un anticuerpo para el polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) un polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria del polinucleótido de acuerdo con (24) anterior, o una parte de la secuencia de bases, o (iii) un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con (21) anterior, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, para la fabricación de un agente para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo.
- 15 (78) Un animal transgénico no humano que porta el polinucleótido de acuerdo con (6), (16) o (24) anterior, que es exógeno.
- (79) Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de acuerdo con (6), (16) o (24) anterior, que es exógeno y capaz de expresarse en un animal no humano.
- 20 (80) Una célula madre embrionaria de mamífero no humano, en la que el polinucleótido de acuerdo con (6), (16) o (24) anterior está inactivado.
- (81) Un mamífero no humano deficiente en expresión del polinucleótido de acuerdo con (6), (16) o (24) anterior en el que dicho polinucleótido está inactivado.
- 25 (82) Un método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, que comprende usar dicho polipéptido, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 30 (83) Un kit para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, que comprende dicho polipéptido, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- (84) Un agente para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo, que comprende un compuesto o su sal que promueve la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 35 (85) Un método para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo, que comprende promover la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 40 (86) Un método para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo, que comprende administrar a un mamífero una dosis eficaz de un compuesto o su sal que promueve la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 45 (87) Uso de un compuesto o su sal que promueve la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo, para la fabricación de un agente para prevenir/tratar síntomas de la menopausia o hipertiroidismo.
- 50 (88) Un agente para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo, que comprende un compuesto o su sal que inhibe la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- (89) Un método para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo, que comprende inhibir la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 55 (90) Un método para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo, que comprende administrar a un mamífero una dosis eficaz de un compuesto o su sal que inhibe la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo.
- 60 (91) Uso de un compuesto o su sal que inhibe la actividad de un polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo, para la fabricación de un agente para prevenir/tratar esterilidad o hipotiroidismo.
- 65

**Mejor modo para llevar a cabo la invención**

El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3, su amida o una sal del mismo se denomina en ocasiones "neuromedina S".

5 El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 11, su amida, o una sal del mismo se denomina en ocasiones "péptido 34 N terminal de neuromedina S".

El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12, su amida, o una sal del mismo se denomina en ocasiones "péptido 37 N terminal de neuromedina S".

El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6, su amida o una sal del mismo se denomina en ocasiones "precursor de neuromedina S".

10 El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 39 o SEC ID N°: 41, su amida, o una sal del mismo se denomina en ocasiones "péptido 33 N terminal de neuromedina U".

El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 40 o SEC ID N°: 42, su amida o una sal del mismo se denomina en ocasiones "péptido 36 N terminal de neuromedina U".

15 Una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29 o una sal de la misma se denomina en ocasiones "TGR1".

Una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35 o una sal de la misma se denomina en ocasiones "FM-3".

20 El polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12 (denominado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones "polipéptido A de la presente invención") y el polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42 (denominada en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones "polipéptido B" de la presente descripción") puede ser cualquier polipéptido derivado de cualquier célula de ser humano y animales de sangre caliente (por ejemplo, cobaya, rata, ratón, cerdo, oveja, bovino, mono, perro, etc.) (por ejemplo, esplenocitos, células nerviosas, células gliales, células  $\beta$  de páncreas, islote de Langerhans pancreático, células de medula ósea, células mesangiales, células de Langerhans, células epidérmicas, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, fibrocitos, miocitos, células adiposas, células inmunitarias (por ejemplo, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales, mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos), megacariocitos, células sinoviales, condrocitos, células óseas, osteoblastos, osteoclastos, células de las glándulas mamarias, hepatocitos o células intersticiales; o las células precursoras correspondientes, células madre, células cancerosas, etc.), o células de tipo hepatocitos; o cualquier tejido en el que tales células estén presentes, tales como cerebro o cualquiera de las regiones cerebrales (por ejemplo, bulbo olfatorio, núcleo amigdalóide, ganglios basales, hipocampo, tálamo, hipotálamo, núcleo subtalámico, córtex cerebral, bulbo raquídeo, cerebelo, polo occipital, lóbulo frontal, lóbulo temporal, putamen, núcleo caudado, cuerpo calloso, sustancia negra), médula espinal, hipófisis, estómago, páncreas, riñón, hígado, gónada, tiroides, vesícula biliar, médula ósea, glándula adrenal, piel, músculo, pulmón, tracto gastrointestinal (por ejemplo, intestino delgado e intestino grueso), vaso sanguíneo, corazón, timo, bazo, glándula submandibular, sangre periférica, células de sangre periférica, próstata, testículos, ovario, placenta, útero, hueso, articulación, músculo esquelético, etc.; el polipéptido también puede ser péptido sintético.

45 La secuencia de aminoácidos que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12 incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos 50% de homología, preferentemente al menos aproximadamente 60% de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 70% de homología, mucho más preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología, aún más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología y más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología, con la secuencia de aminoácidos mostrada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12; etc.

50 La homología de las secuencias de aminoácidos puede medirse usando un algoritmo de puntuación de homología NCBI BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica del Centro Nacional para la Información Biotecnológica).

55 Los ejemplos preferidos de los polipéptidos que comprenden sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12 incluyen polipéptidos que comprenden sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de

aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12 y que tienen propiedades sustancialmente equivalentes a las de los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, etc.

La actividad sustancialmente equivalente incluye, por ejemplo, una actividad de unión a ligando, acción de transducción de señales, etc. La expresión sustancialmente equivalente se usa para indicar que la naturaleza de la actividad es equivalente en términos de calidad. Por lo tanto, la actividad de unión a ligando, acción de transducción de señal, etc. es preferentemente equivalente (por ejemplo, aproximadamente de 0,01 a 100 veces, preferentemente aproximadamente de 0,5 a 20 veces, más preferentemente de 0,5 a 2 veces), pero pueden estar presentes y ser permisibles diferencias en el grado tales como un nivel de estas actividades, factores cuantitativos tales como un peso molecular del polipéptido, etc.

Las actividades tales como actividad de unión a ligando, una acción de transducción de señales, etc. pueden determinarse de acuerdo con métodos públicamente conocidos con algunas modificaciones de los mismos, por ejemplo, mediante los métodos de exploración, etc., que se describirán posteriormente.

Además, los polipéptidos que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos se usan como el polipéptido A de la presente invención: (i) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, de la que se suprimen al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10, más preferentemente varios (de 1 a 5)) aminoácidos; (ii) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, a la que se añaden al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10, y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos; (iii) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, en la que al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10, y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos; (iv) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, en la que se insertan al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10, mas preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos; o (v) combinación de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, y similares.

Los ejemplos específicos del polipéptido A de la presente invención, su amida, o una sal del mismo incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 3, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 5, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 8, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 9, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 10, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 11, su amida, o una sal del mismo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 12, su amida, o una sal del mismo, y similares.

El péptido parcial del polipéptido A de la presente invención, su amida, o una sal del mismo puede ser cualquier polipéptido siempre que sea un polipéptido disponible para el método de explorar medicamentos, etc. descrito posteriormente, y tenga la propiedad sustancialmente equivalente a la del polipéptido A de la presente invención. Con respecto al número de aminoácidos en el péptido parcial, se usan péptidos que contengan, por ejemplo, al menos 5, preferentemente al menos 10, preferentemente al menos 15 y preferentemente al menos 20 secuencias de aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos constituyente del polipéptido A de la presente invención, etc.

En la presente memoria, la expresión "actividad sustancialmente equivalente" tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente. La "actividad sustancialmente equivalente" puede ensayarse de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Los péptidos parciales pueden ser (i) en los que se suprimen al menos 1 o 2 (preferentemente varios (1 a 4)) aminoácidos de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, (ii) en los que se añaden al menos 1 o 2 (preferentemente aproximadamente 1 a 20, más preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos a las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente o (iii) en los que al menos 1 o 2

(preferentemente varios (1 a 4)) aminoácidos se reemplazan con otros aminoácidos.

En lo sucesivo en la presente memoria, el polipéptido A de la presente invención y sus péptidos parciales se denominan en ocasiones de forma colectiva "polipéptido A de la presente invención".

5 La secuencia de aminoácidos que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la  
 10 secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42 incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 50% de homología, preferentemente al menos aproximadamente 60% de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 70% de homología, mucho más preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología, aún más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología y más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42; etc.

La homología de las secuencias de aminoácidos puede medirse usando un algoritmo de puntuación de homología NCBI BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico del Centro Nacional para la Información Biotecnológica).

15 Los ejemplos preferidos del polipéptido que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la  
 20 secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42 incluyen polipéptido que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42 y que tiene propiedades sustancialmente equivalentes a las del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, etc.

25 La actividad sustancialmente equivalente incluye, por ejemplo, una actividad de unión a ligando, una acción de transducción de señal y similares. La expresión sustancialmente equivalente se usa para indicar que estas actividades son equivalentes con respecto a calidad. Por lo tanto, las actividades tales como una actividad de unión a ligando, acción de transducción de señales, etc. son preferentemente equivalentes (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a 100 veces, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 20 veces, más preferentemente de 0,5 a 2 veces), pero pueden estar presentes y son permisibles diferencias en grado de estas actividades, factores cuantitativos tales como peso molecular del polipéptido.

30 Las actividades tales como la actividad de unión a ligando, acción de transducción de señales, etc. pueden determinarse de acuerdo con métodos públicamente conocidos con algunas modificaciones de los mismos, por ejemplo, por los métodos de exploración descritos posteriormente; o similares.

Además, los polipéptidos que comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos se usan como el polipéptido B de la presente descripción: (i) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, de la que se suprimen al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos; (ii) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, a la que se añaden al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10, y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos; (iii) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, en la que al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos; (iv) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, en la que se insertan al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos; o (v) combinación de estas secuencias de aminoácidos descritas anteriormente; y similares.

Los ejemplos específicos del polipéptido B de la presente descripción incluyen un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 38, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 39, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 40, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 41, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 42, etc.

55 El péptido parcial del polipéptido B de la presente descripción puede ser cualquier polipéptido siempre que sea un polipéptido disponible para el método de exploración de medicamentos, etc., que se describirá posteriormente y tenga propiedades sustancialmente equivalentes a las del polipéptido B de la presente descripción. Con respecto al número de aminoácidos en el péptido parcial, se usan péptidos que contienen, por ejemplo, secuencias de al menos 5, preferentemente al menos 10, preferentemente al menos 15 y preferentemente al menos 20 aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos constituyente del polipéptido B de la presente descripción; etc.

En la presente memoria, la expresión “actividad sustancialmente equivalente” tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente. La “actividad sustancialmente equivalente” puede ensayarse de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

5 En los péptidos parciales, (i) pueden suprimirse al menos 1 o 2 (preferentemente varios (1 a 4)) aminoácidos de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, (ii) pueden añadirse al menos 1 o 2 (preferentemente aproximadamente 1 a 20, más preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 a 5)) aminoácidos a las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, o (iii) al menos 1 o 2 (preferentemente varios (1 a 4)) aminoácidos en las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente pueden reemplazarse con otros aminoácidos.

10 En lo sucesivo en la presente memoria, el polipéptido B de la presente descripción y sus péptidos parciales se denominan de forma colectiva en ocasiones el “polipéptido B de la presente descripción”.

De forma similar, el “polipéptido A de la presente invención” y el “polipéptido B de la presente descripción” se denominan de forma colectiva en ocasiones “polipéptido de la presente invención”.

15 La proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos mostrada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, o sales de la misma (denominada brevemente en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones “proteína de la presente descripción”) puede ser cualquier proteína derivada de cualquier célula de ser humano o mamífero (por ejemplo, cobaya, rata, ratón, conejo, cerdo, oveja, bovino, mono, etc.) (por ejemplo, esplenocitos, células nerviosas, células gliales, células  $\beta$  del páncreas, células de medula ósea, células mesangiales, células de Langerhans, células epidérmicas, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, fibrocitos, miocitos, células adiposas, células inmunitarias (por ejemplo, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales, mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos), megacariocitos, células sinoviales, condrocitos, células óseas, osteoblastos, osteoclastos, células de las glándulas mamarias, hepatocitos o células intersticiales; o las células precursoras, células madre, células cancerosas, etc. correspondientes); células de tipo hemocito (por ejemplo, MEL, MI, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01, etc.); o cualquier tejido en el que estén presentes tales células, tales como cerebro o cualquiera de las regiones del cerebro (por ejemplo, bulbo olfatorio, núcleo amigdalóide, ganglios basales, hipocampo, tálamo, hipotálamo, núcleo subtalámico, córtex cerebral, bulbo raquídeo, cerebelo, lóbulos occipitales, lóbulo frontal, lóbulo lateral, putamen, núcleo caudado, cuerpo caloso, sustancia negra), médula espinal, glándula hipófisis, estómago, páncreas, riñones, hígado, gónadas, glándula tiroidea, vesícula biliar, médula ósea, glándulas adrenales, piel, músculo, pulmón, tractos digestivos (por ejemplo, intestino grueso, intestino delgado), vasos vasculares, corazón, timo, bazo, glándula submandibular, sangre periférica, células de sangre periférica, próstata, testículos, testes, ovarios, placenta, útero, huesos, articulaciones, músculo esqueléticos, etc. (especialmente, cerebro y cada región del cerebro). La proteína también puede ser una proteína sintética.

20

25

30

35

La secuencia de aminoácidos que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35 incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 50% de homología, preferentemente al menos aproximadamente 60% de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 70% de homología, mucho más preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología, aún más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología y más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35; etc.

40

La homología de las secuencias de aminoácidos puede medirse usando un algoritmo de puntuación de homología NCBI BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico del Centro Nacional para la Información Biotecnológica).

45

Los ejemplos preferidos de la proteína que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35 incluyen proteínas que comprenden sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35 y que tienen propiedades sustancialmente equivalentes a las de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, etc.

50

La actividad sustancialmente equivalente incluye, por ejemplo, una actividad de unión para el polipéptido de la presente invención, una acción de transducción de señales y similares. La expresión sustancialmente equivalente se usa para indicar que estas actividades son equivalentes con respecto a calidad. Por lo tanto, las actividades tales como la actividad de unión con el péptido de la presente invención, la acción de transducción de señales, etc. son preferentemente equivalentes (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 2 veces), pero pueden estar presentes y ser permisibles diferencias en grado de estas actividades, factores cuantitativos tales como un peso molecular de la

55

proteína.

Las actividades tales como la actividad de unión, la acción de transducción de señales, etc. pueden determinarse de acuerdo con métodos públicamente conocidos con algunas modificaciones de los mismos.

5 Además, se usan proteínas que comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos como la proteína de la presente descripción: (i) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, de la que se suprimen al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 o 2)) aminoácidos; (ii) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, a la que se añaden al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 o 2)) aminoácidos; (iii) la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, en la que al menos 1 o 2 (por ejemplo, aproximadamente 1 a 30, preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 o 2)) aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos; o (iv) combinación de estas secuencias de aminoácidos descritas anteriormente; y similares.

15 Los ejemplos específicos de la proteína de la presente descripción incluyen una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 27, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 29, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31 una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 33, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 35, etc.

20 Como el péptido parcial de la proteína de la presente descripción (denominado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones péptido parcial de la presente descripción), puede usarse cualquier péptido parcial siempre que sea un péptido parcial de la proteína de la presente descripción descrita anteriormente. Por ejemplo, junto con las moléculas proteicas de la presente descripción, pueden usarse las que tienen un sitio expuesto al exterior de una membrana celular y que tienen actividades de unión a ligando sustancialmente equivalentes.

25 Un ejemplo específico del péptido parcial de la proteína de la presente descripción es un péptido que contiene un dominio que se ha analizado que es un dominio extracelular (sitio hidrófilo) en el análisis de representación hidrófoba. Además, puede usarse también un péptido que contiene una parte del dominio hidrófobo. Además, puede usarse también un péptido, que contiene de forma independiente cada dominio, pero también puede ser un péptido de la parte en la que se colocan múltiples dominios.

El número de aminoácidos en el péptido parcial de la presente descripción es de al menos 20, preferentemente al menos 50 y más preferentemente al menos 100 en la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína de la presente descripción descrita anteriormente, y se prefieren tales péptidos, etc.

35 La secuencia de aminoácidos sustancialmente igual se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 50% de homología, preferentemente al menos aproximadamente 60% de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 70% de homología, aún más preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología, mucho más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología y más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología, con estas secuencias de aminoácidos.

40 En la presente memoria, la expresión "actividad de unión a ligando sustancialmente equivalente" tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente. La "actividad de unión a ligando sustancialmente equivalente" puede ensayarse por métodos públicamente conocidos con modificaciones.

45 Además en el péptido parcial de la presente descripción, pueden suprimirse al menos 1 o 2 (preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 o 2)) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35; pueden añadirse al menos 1 o 2 (preferentemente aproximadamente 1 a 20, más preferentemente aproximadamente 1 a 10 y más preferentemente varios (1 o 2)) aminoácidos a dicha secuencia de aminoácidos; o, al menos 1 o 2 (preferentemente aproximadamente 1 a 10, más preferentemente aproximadamente 1 a 5 y más preferentemente varios (1 o 2)) aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos pueden reemplazarse por otros aminoácidos.

50 Como sales del polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción o su péptido parcial, se prefieren particularmente sales de adición de ácidos fisiológicamente aceptables. Los ejemplos de tales sales incluyen sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido sulfúrico), sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico) y similares.

55 A lo largo de la memoria, los polipéptidos y proteínas de la presente invención se representan de acuerdo con el modo convencional de describir péptidos, es decir, el extremo N terminal (amino terminal) en el lado izquierdo y el extremo C terminal (carboxilo terminal) en el lado derecho. En los polipéptidos que comprenden la secuencia de

aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, etc., el extremo C terminal puede estar en forma de un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato (-COO<sup>-</sup>), una amida (-CONH<sub>2</sub>) o un éster (-COOR). En la presente memoria, los ejemplos del grupo éster representado por R incluyen un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc.; un grupo cicloalquilo C<sub>3-8</sub> tal como ciclopentilo, ciclohexilo, etc.; un grupo arilo C<sub>6-16</sub> tal como fenilo, α-naftilo, etc.; un aralquilo C<sub>7-14</sub> tal como un grupo fenilo- alquilo C<sub>1-2</sub>, por ejemplo, bencilo, fenetilo, etc.; un grupo de α-naftilalquilo C<sub>1-2</sub> tal como α-naftilmetilo, etc.; y similares. Además, también puede usarse pivaloilosimetilo o similares, que se usa ampliamente como un éster para administración oral.

En el polipéptido A de la presente invención, el grupo carboxilo C terminal (-COOH) está preferentemente en forma de una amida (-CONH<sub>2</sub>).

10 Cuando el polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción (el polipéptido/proteína de la presente invención) contiene un grupo carboxilo (o un carboxilato) en una posición distinta del extremo C terminal, el grupo carboxilo puede amidarse o esterificarse y dicha amida o éster también se incluye dentro del polipéptido/proteína de la presente invención. Los ésteres C terminales mencionados o similares se usan como el éster en este caso.

15 El polipéptido/proteína de la presente invención también incluye, en los péptidos/proteínas descritos anteriormente, en los que el grupo amino en el resto de metionina N terminal está protegido con un grupo protector (por ejemplo, un grupo acilo C<sub>1-6</sub> tal como un grupo alcanilo C<sub>2-6</sub>, por ejemplo, grupo formilo, grupo acetilo, etc.); en los que la región N terminal se escinde *in vivo* y el grupo glutamilo formado de este modo está piroglutaminado; en los que un sustituyente (por ejemplo, -OH, -SH, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, grupo guanidino, etc.) en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido con un grupo protector adecuado (por ejemplo, un grupo acilo C<sub>1-6</sub>, tal como un grupo alcanilo C<sub>2-6</sub>, por ejemplo, un grupo formilo, grupo acetilo, etc.); en los que un sustituyente en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido con un grupo protector adecuado, o péptidos conjugados/proteínas conjugadas tales como los denominados glicopéptidos/glicoproteínas que tienen cadenas de azúcares; etc.

25 En el péptido parcial de la presente descripción el extremo C terminal puede estar en cualquier forma de un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato (-COO<sup>-</sup>), una amida (-CONH<sub>2</sub>) o un éster (-COOR). Cuando el péptido parcial de la presente descripción contiene un grupo carboxilo (o un carboxilato) en una posición distinta del extremo C terminal, el grupo carboxilo puede amidarse o esterificarse y dicha amida o éster también se incluye dentro del péptido parcial de la presente descripción. Los ejemplos del grupo de éster en este caso pueden ser los ésteres C terminales descritos anteriormente, etc.

Además, el péptido parcial de la presente descripción incluye en los que el grupo amino del resto de metionina N terminal está protegido con un grupo protector; en los que la región N terminal se escinde *in vivo* y Glu formada de este modo está piroglutaminada; en los que un sustituyente en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido con un grupo protector adecuado, o péptidos conjugados tales como los denominados glicopéptidos que tienen cadenas de azúcares; etc., del mismo modo que en la proteína de la presente descripción descrita anteriormente.

El polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción o sales de los mismos pueden prepararse a partir de las células o tejidos humanos o de mamífero descritos anteriormente por métodos públicamente conocidos para purificación de péptidos/proteínas, o pueden prepararse también cultivando un transformante que porte ADN que codifique la proteína de la presente descripción que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35. También pueden prepararse por el método para síntesis de péptidos/proteínas, que se describirá posteriormente.

45 Cuando el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción o sales de los mismos se preparan a partir de los tejidos o células de ser humano o mamífero, los tejidos o células se homogeneizan, después se extraen con un ácido, un disolvente orgánico, etc. y el extracto puede purificarse y aislarse por una combinación de precipitación de proteínas por adición de sal, diálisis, filtración en gel, técnicas de cromatografía tales como cromatografía de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

El polipéptido de la presente invención puede prepararse por métodos públicamente conocidos para síntesis de polipéptidos, o escindiendo polipéptidos incluyendo el polipéptido de la presente invención con una peptidasa apropiada. Para los métodos para síntesis de polipéptidos, por ejemplo, puede usarse síntesis de fase sólida o síntesis de fase líquida. En otras palabras, los péptidos parciales o aminoácidos que pueden construir el polipéptido de la presente invención se condensan con la parte restante. Cuando el producto contiene grupos protectores, estos grupos protectores se retiran para proporcionar el polipéptido deseado. Se describen métodos públicamente conocidos para condensación y eliminación de los grupos protectores en (1) a (5) a continuación.

(1) M. Bodanszky y M. A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York (1966)

(2) Schroeder y Luebke: The Peptide, Academic Press, Nueva York (1965)

(3) Nobuo Izumiya, *et al.*: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Principios básicos y experimentos de síntesis de

péptidos), publicado por Maruzen Co. (1975)

(4) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Experimento Bioquímico) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Química de Proteínas) IV, 205 (1977)

5 (5) Haruaki Yajima ed.: Zoku Iyaku hin no Kaihatsu (Una secuela del Desarrollo de Compuestos Farmacéuticos), Vol. 14, Peptide Synthesis, publicado por Hirokawa Shoten

Después de completar la reacción, el polipéptido de la presente invención puede purificarse y aislarse por una combinación de métodos convencionales para purificación tales como extracción de disolventes, destilación, cromatografía en columna, cromatografía líquida, recristalización, etc. Cuando el polipéptido de la presente invención obtenido por los métodos anteriores está en una forma libre, este puede convertirse en una sal apropiada por un método públicamente conocido o sus modificaciones; cuando el polipéptido se obtiene en una forma de sal, esta puede convertirse en una forma libre por un método públicamente conocido.

10 Para sintetizar amidas del polipéptido de la presente invención, pueden usarse resinas disponibles en el mercado para síntesis peptídica que son adecuadas para formación de amidas. Los ejemplos de tales resinas incluyen resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidrilamina, resina de aminometilo, resina de alcohol 4-benciloxibencílico, resina de 4-metilbenzhidrilamina, resina de PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenil acetamidometilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminoetil) fenoxi, etc. Usando estas resinas, se condensan aminoácidos en los que grupos  $\alpha$ -amino y grupos funcionales de las cadenas laterales están protegidos de forma apropiada, en la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo de acuerdo con diversos métodos de condensación públicamente conocidos. Al final de la reacción, el polipéptido se escinde de la resina y al mismo tiempo se retiran los grupos protectores. Después se realiza una reacción de formación de enlaces disulfuro intramoleculares en una solución altamente diluida para obtener el polipéptido objetivo.

25 Para condensación de los aminoácidos protectores descritos anteriormente, puede usarse una diversidad de reactivos de activación para síntesis de polipéptidos, y se emplean particularmente carbodiimidias. Los ejemplos de tales carbodiimidias incluyen DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida, N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, etc. Para activación por estos reactivos, los aminoácidos protegidos en combinación con un inhibidor de racemización (por ejemplo, HOBt, HOObt) se añaden directamente a la resina, o los aminoácidos protectores se activan previamente en forma de anhídridos ácidos simétricos, ésteres de HOBT o ésteres de HOObt, seguido de adición de los aminoácidos protegidos activados de este modo a la resina. Pueden seleccionarse disolventes adecuados para usar para activar los aminoácidos protectores o condensar con la resina de disolventes que se sabe que pueden usarse para reacciones de condensación de polipéptidos. Son ejemplos de tales disolventes amidas ácidas tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, etc.; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo, etc.; alcoholes tales como trifluoroetanol, etc.; sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido, etc.; éteres tales como piridina, dioxano, tetrahidrofurano, etc.; nitrilos tales como acetonitrilo, propionitrilo, etc.; ésteres tales como metil acetato, etil acetato, etc.; y mezclas apropiadas de estos disolventes. La temperatura de reacción se selecciona de forma apropiada del intervalo que se sabe que es aplicable a reacciones de unión de polipéptidos y se selecciona habitualmente en el intervalo de aproximadamente -20 °C a 50 °C. Los derivados de aminoácidos activados se usan generalmente en un exceso de 1,5 a 4 veces. La condensación se examina usando la reacción de ninhidrina; cuando la condensación es insuficiente, la condensación puede completarse repitiendo la reacción de condensación sin retirada de los grupos protectores. Cuando la condensación aún es insuficiente incluso después de repetir la reacción, se acetilan aminoácidos que no han reaccionado con anhídrido acético o acetilimidazol para cancelar cualquier posible efecto adverso en la reacción posterior.

45 Los ejemplos de los grupos protectores usados para proteger los grupos amino de aminoácidos de partida incluyen Z, Boc, t-pentiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, 2-nitrofenilsulfonilo, difenilfosfinotioilo, Fmoc, etc. Los ejemplos de los grupos protectores para un grupo carboxilo incluyen 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo y fenacilo así como benciloxicarbonil hidrazida, t-butoxicarbonil hidrazida, tritil hidrazida y similares, además del grupo alquilo C<sub>1-6</sub>, grupo cicloalquilo C<sub>3-8</sub> y grupo aralquilo C<sub>7-14</sub> descritos como R anteriormente.

50 El grupo hidroxilo de serina y treonina puede protegerse, por ejemplo, a través de su esterificación o eterificación. Los ejemplos de grupos usados apropiadamente para la esterificación incluyen un grupo alcanilo inferior tal como grupo acetilo, etc., un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo, etc., y un grupo derivado de carbono tal como un grupo benciloxicarbonilo, grupo etoxicarbonilo, etc. Los ejemplos de grupos usados de forma apropiada para la eterificación incluyen grupo bencilo, grupo tetrahidropiranilo, grupo t-butilo, etc.

55 Los ejemplos de grupos para proteger el grupo de hidroxilo fenólico de tirosina incluyen Bzl, Cl<sub>2</sub>-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z, t-butilo, etc.

Los ejemplos de grupos usados para proteger el resto de imidazol de histidina incluyen Tos, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo, DNP, benciloximetilo, Bum, Boc, Trt, Fmoc, etc.

Los ejemplos de los grupos de carboxilo activados en el material de partida incluyen los anhídridos ácidos correspondientes, azidas, ésteres activados [ésteres con alcoholes (por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol,

2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccimida, N-hidroxiftalimida, HOBT]], etc. Como los aminoácidos en los que se activan los grupos amino en el material de partida, se emplean las amidas fosfóricas correspondientes, etc.

5 Para eliminar (retirar por división) los grupos protectores, se usan reducción catalítica en flujo de gas de hidrógeno en presencia de un catalizador tal como Pd-negro, Pd-carbono, etc., un tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhídrido, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético, una solución de mezcla de estos ácidos, etc.; un tratamiento con una base tal como diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, etc.; reducción con sodio en amoniaco líquido, etc. La eliminación del grupo protector por el tratamiento ácido descrito anteriormente se lleva a cabo generalmente a una temperatura de aproximadamente -20 °C a 40 °C. En el  
10 tratamiento ácido, es eficaz añadir un aceptor de cationes tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, dimetilsulfuro, 1,4-butanoditiol o 1,2-etanoditiol. Además, se retira el grupo 2,4-dinitrofenilo conocido como el grupo protector para el imidazol de histidina por un tratamiento con tiofenol. El grupo formilo usado como el grupo protector del indol de triptófano se elimina por el tratamiento ácido mencionado en presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol, etc. descrito anteriormente, así como por un tratamiento con un álcali tal como solución de hidróxido  
15 sódico diluida, amoniaco diluido, etc.

La protección de grupos funcionales que no deberían estar implicados en la reacción de los materiales de partida, grupos protectores, eliminación de los grupos protectores y activación de grupos funcionales implicados en la reacción pueden seleccionarse de forma apropiada de grupos públicamente conocidos y medios públicamente conocidos.

20 En otro método para producir las amidas del polipéptido, por ejemplo, el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido carboxilo terminal se protege en primer lugar por amidación; la cadena peptídica se extiende después a una longitud deseada hacia el lateral del grupo amino. A continuación, se prepara un péptido en el que solamente se ha eliminado el grupo protector del grupo  $\alpha$ -amino N terminal en la cadena peptídica del péptido y un péptido (o aminoácidos) en el que se ha eliminado solamente el grupo protector del grupo carboxilo C terminal. Los dos péptidos se condensan en una  
25 mezcla de los disolventes descritos anteriormente. Los detalles de la reacción de condensación son iguales que los descritos anteriormente. Después de purificarse el péptido protegido obtenido por la condensación, todos los grupos protectores se eliminan por el método descrito anteriormente para proporcionar el polipéptido en bruto deseado. Este polipéptido en bruto se purifica por diversos medios de purificación conocidos. La liofilización de la fracción principal proporciona la amida del polipéptido deseado.

30 Para preparar el polipéptido esterificado de la presente invención, por ejemplo, el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido carboxilo terminal se condensa con un alcohol deseado para preparar el éster de aminoácido, lo que se sigue de un procedimiento similar para la preparación del polipéptido amidado anterior para proporcionar la forma de éster del polipéptido deseado del mismo modo que en la amida del polipéptido deseado.

35 El péptido parcial del polipéptido de la presente invención puede prepararse digiriendo el polipéptido de la presente invención con una peptidasa apropiada o puede prepararse de acuerdo con el método mencionado para síntesis de polipéptidos. La amida o éster del péptido parcial del polipéptido de la presente invención también puede prepararse por una modificación del método para preparar la amida o éster descrito anteriormente. Además, las sales del péptido parcial del polipéptido de la presente invención son las mismas que se proporcionan para las sales del polipéptido de la presente invención descrito anteriormente.

40 Puede seleccionarse sustancialmente el mismo o los mismos sustituyentes de un aminoácido o aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de otros aminoácidos de la clase a la que pertenece el aminoácido o los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, etc. Los ejemplos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, etc. Los ejemplos de aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, histidina, etc. Los ejemplos de aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, etc.  
45

Una forma marcada de los polipéptidos de la presente invención, los péptidos parciales descritos en (1) anterior o los péptidos descritos en (2) anterior incluye los marcados con un isótopo, los marcados con fluorescencia (marcaje de fluorescencia con, por ejemplo, fluoresceína, etc.), los marcados con biotina, los marcados con una enzima, etc., por  
50 métodos públicamente conocidos.

Específicamente, pueden usarse los polipéptidos de la presente invención, que se marcan con [<sup>3</sup>H], [<sup>125</sup>I], [<sup>14</sup>C], [<sup>35</sup>S], etc. Por métodos públicamente conocidos.

55 El ADN que codifica el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción puede ser cualquier ADN siempre que contenga un ADN que codifique el péptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35. El ADN también puede ser cualquiera de ADN genómico, biblioteca de ADN genómico, ADNc derivado de

las células y tejidos descritos anteriormente, biblioteca de ADNc derivada de las células y tejidos descritos anteriormente y ADN sintético. El vector para usar para la biblioteca puede ser cualquiera de bacteriófago, plásmido, cósmido, fagémido, etc. El ADN también puede amplificarse directamente por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (en lo sucesivo en la presente memoria abreviada como RT-PCR) usando fracción de ARN preparada a partir de las células y tejidos descritos anteriormente.

(Clonación de ADN)

El ADN que codifica el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción también puede prepararse por los siguientes métodos de ingeniería genética.

Para clonación del ADN que codifica completamente el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción, el ADN puede amplificarse por PCR usando cebadores de ADN sintéticos que contienen una parte de la secuencia de bases del polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción o el ADN insertado en un vector apropiado puede seleccionarse por hibridación con un fragmento de ADN marcado o ADN sintético que codifica una parte o la región completa del polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción. La hibridación puede realizarse, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning (2ª ed., J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). La hibridación también puede realizarse usando una biblioteca disponible en el mercado de acuerdo con el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. Las condiciones altamente rigurosas usadas en la presente memoria son, por ejemplo, las de una concentración de sodio de aproximadamente 19 a 40 mM, preferentemente aproximadamente 19 a 20 mM a una temperatura de aproximadamente 50 a 70 °C, preferentemente de aproximadamente 60 a 65 °C. En particular, se prefieren más condiciones de hibridación en una concentración de sodio de aproximadamente 19 mM a una temperatura de aproximadamente 65 °C.

La conversión de la secuencia de bases del ADN puede efectuarse por métodos públicamente conocidos tales como el método de ODA-LA PCR, el método de doble cadena con huecos o el método de Kunkel o sus modificaciones usando kits públicamente conocidos disponibles como Mutan™-super Express Km (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), Mutan™-K (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), etc.

El ADN clonado que codifica el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción puede usarse tal cual, dependiendo del fin o, si se desea, después de digestión con una enzima de restricción o después de adición de un engarce al mismo. El ADN puede contener ATG como un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' del mismo y puede contener además TAA, TGA o TAG como un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' del mismo. Estos codones de inicio y terminación de la traducción también pueden añadirse usando un adaptador de ADN sintético apropiado.

(Vector de expresión)

El vector de expresión para el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción puede fabricarse, por ejemplo, (i) escindiendo el fragmento de ADN deseado del ADN que codifica el polipéptido de la presente invención o la proteína de la presente descripción y después (ii) ligando el fragmento de ADN con un vector de expresión apropiado cadena abajo de un promotor en el vector.

Los ejemplos del vector incluyen plásmidos de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12 o pUC13), plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5 o pCI94), plásmidos derivados de levadura (por ejemplo, pSH19 o pSH15), bacteriófagos tales como fago  $\lambda$ , etc., virus animales tales como retrovirus, virus vaccinia, baculovirus, etc. El promotor usado en la presente invención puede ser cualquier promotor si coincide bien con un hospedador para usar para expresión génica.

En el caso de usar células animales como el hospedador, los ejemplos del promotor incluyen promotor derivado de SV-40, promotor LTR retroviral, promotor de metalotioneína (HT), promotor de choque térmico, promotor de citomegalovirus (CMV), promotor de SR $\alpha$ , etc. Cuando el hospedador es una bacteria del género *Escherichia*, los ejemplos preferidos del promotor incluyen promotor de trp, promotor de T7, promotor de lac, promotor de recA, promotor de  $\lambda$ P<sub>L</sub>, promotor de lpp, etc. En el caso de usar bacterias del género *Bacillus* como el hospedador, son ejemplos preferidos del promotor, promotor de SPO1, promotor de SPO2, promotor de penP, etc. Cuando se usa levadura como el hospedador, son ejemplos preferidos del promotor, promotor de PH05, promotor de PGK, promotor de GAP, promotor de ADH1, promotor de GAL, etc. Cuando se usan células de insecto como el hospedador, los ejemplos preferidos del promotor incluyen promotor de polihedrina, promotor de P10, etc.

Además de los ejemplos anteriores, el vector de expresión puede contener opcionalmente además un potenciador, una señal de corte y empalme, una señal de adición de poliA, un marcador de selección, origen de replicación de SV40 (abreviado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones SV40ori), etc. Los ejemplos del marcador de selección incluyen gen de dihidrofolato reductasa (abreviado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones dhfr) [resistencia a metotrexato (MTX)], gen de resistencia a ampicilina (abreviado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones Amp<sup>r</sup>), gen de resistencia a neomicina (abreviado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones Neo, resistencia a G418), etc. En particular cuando se usa gen dhfr como el marcador de selección en

células CHO (dhfr<sup>r</sup>), también puede realizarse selección en medio sin timidina.

Si es necesario, se añade una secuencia señal que coincide con un hospedador en el extremo N terminal del polipéptido o su péptido parcial. Son ejemplos de la secuencia señal que pueden usarse secuencia señal PhoA, secuencia señal OmpA, etc. en el caso de usar bacterias del género *Escherichia* como el hospedador; secuencia señal de  $\alpha$ -amilasa, secuencia señal de subtilisina, etc. en el caso de usar bacterias del género *Bacillus* como el hospedador; secuencia señal del factor de acoplamiento  $\alpha$  (MF $\alpha$ ), secuencia señal de invertasa, etc. en el caso de usar levadura como el hospedador; y secuencia señal de insulina, secuencia señal de interferón  $\alpha$ , secuencia señal de molécula de anticuerpo, etc. en el caso de usar células animales como el hospedador, respectivamente.

(Transformante)

- 10 Usando el vector que porta el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención construido de este modo, pueden prepararse transformantes.

Son ejemplos del hospedador, que pueden emplearse, bacterias que pertenecen al género *Escherichia*, bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, levadura, insectos o células de insecto y células de animales, etc.

- 15 Los ejemplos específicos de las bacterias que pertenecen al género *Escherichia* incluyen *Escherichia coli* K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)], C600 (Genetics, 39, 440(1954)], etc.

Los ejemplos de las bacterias que pertenecen al género *Bacillus* incluyen *Bacillus subtilis* Mil 14 [Gene, 24, 255 (1983)], 207-21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)], etc.

- 20 Los ejemplos de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, etc.

Como el insecto puede usarse, por ejemplo, una larva de *Bombyx mori*, etc. [Maeda, *et al.*, Nature, 315, 592 (1985)].

- 25 Los ejemplos de células de insectos incluyen, para el virus AcNPV, células de *Spodoptera frugiperda* (células Sf), células MG1 derivadas del intestino medio de *Trichoplusia ni*, células High Five™ derivadas de huevo de *Trichoplusia ni*, células derivadas de *Mamestra brassicae*, células derivadas de *Estigmene acrea*, etc.; y para el virus BmNPV, se usan células de *Bombyx mori* N (células BmN), etc. Son ejemplos de la célula Sf que pueden usarse células Sf9 (ATCC CRL1711) y células Sf21 [ambas células se describen en Vaughn, J. L. *et al.*, In Vivo, JJ, 213-217 (1977)], etc.

- 30 Los ejemplos de células animales incluyen células de mono COS-7, células Vero, células de hámster Chino CHO, células de hámster Chino CHO deficientes en gen de DHFR (células CHO dhfr<sup>r</sup>), células L de ratón, células 3T3 de ratón, células de mieloma de ratón, células HEK293 humanas, células FL humanas, células 293, células C127, células BALB3T3, células Sp-2/O, etc.

Las bacterias que pertenecen al género *Escherichia* pueden transformarse, por ejemplo, mediante el método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972), Gene, 17, 107(1982), etc.

- 35 Las bacterias que pertenecen al género *Bacillus* pueden transformarse, por ejemplo, mediante el método descrito en Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979), etc.

La levadura puede transformarse, por ejemplo, mediante el método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1929 (1978), etc.

Las células de insecto o los insectos pueden transformarse, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en Bio/Technology, 6, 47-55(1988), etc.

- 40 Las células animales pueden transformarse, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en Virology, 52, 456(1973).

Los métodos para introducir los vectores de expresión en las células incluyen, por ejemplo, el método de lipofección [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 7413 (1987)], el método de fosfato cálcico [Virology, 52, 456-467 (1973)], el método de electroporación [EMBO J., 1, 841-845 (1982)], etc.

- 45 Como se ha descrito anteriormente, puede obtenerse el transformante transformado por el vector de expresión que comprende el ADN que codifica la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención.

- 50 Los métodos para expresar de forma estable la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención usando células animales incluyen métodos para seleccionar las células por selección de clones en los que los vectores de expresión descritos anteriormente se introducen en cromosomas. Específicamente, pueden seleccionarse transformantes basándose en los marcadores de selección descritos anteriormente. Además, las selecciones de clones repetidos en los transformantes obtenidos de este modo usando los marcadores de selección

5 permiten adquirir líneas celulares animales estables capaces de expresar en gran medida la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención. Además, cuando se usa el gen dhfr como el marcador de selección, puede llevarse a cabo incubación aumentando gradualmente la concentración de MTX para seleccionar células resistentes, por lo que el ADN que codifica la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención se amplifica en las células simultáneamente con el gen dhfr para adquirir líneas celulares animales con mayor expresión.

10 Los transformantes descritos anteriormente se cultivan en condiciones capaces de expresar el ADN que codifica la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención para producir y acumular la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención, por lo que puede producirse la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención.

15 Cuando el hospedador es una bacteria que pertenece al género *Escherichia* o el género *Bacillus*, el transformante puede incubarse de forma apropiada en un medio líquido que contiene materiales requeridos para el crecimiento del transformante tales como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, materiales inorgánicos, y así sucesivamente. Los ejemplos de las fuentes de carbono incluyen glucosa, dextrina, almidón soluble, sacarosa, etc. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno incluyen materiales inorgánicos u orgánicos tales como sales de amonio, sales de nitrato, agua de macerado de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soja, extracto de patata, etc. Son ejemplos de los materiales inorgánicos cloruro cálcico, dihidrogenofosfato sódico, cloruro de magnesio, etc. Además, también pueden añadirse extracto de levadura, vitaminas, factores promotores del crecimiento, etc. al medio. Preferentemente, el pH del medio se ajusta de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

20 Un ejemplo preferido del medio para incubación de la bacteria que pertenece al género *Escherichia* es medio M9 complementado con glucosa y ácidos Casamino (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1972). Si es necesario, puede añadirse un compuesto químico tal como ácido 3β-indolilacrílico al medio para activar de este modo el promotor de forma eficaz.

25 Cuando se usan como hospedador las bacterias que pertenecen al género *Escherichia*, el transformante se cultiva habitualmente a aproximadamente 15 a 43 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas. Si es necesario, el cultivo puede airearse o agitarse.

30 Cuando se usan como hospedador las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, el transformante se cultiva generalmente a aproximadamente 30 a 40 °C durante aproximadamente 6 a 24 horas. Si es necesario, el cultivo puede airearse o agitarse.

35 Cuando se usa como hospedador levadura, el transformante se cultiva, por ejemplo, en medio mínimo de Burkholder [Bostian, K. L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4505 (1980)] o en medio SD complementado con ácidos Casamino 0,5% [Bitter, G. A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5330 (1984)]. Preferentemente, el pH del medio se ajusta a aproximadamente 5 a aproximadamente 8. En general, el transformante se cultiva a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 35 °C durante aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas. Si es necesario, el cultivo puede airearse o agitarse.

40 Cuando se usan como hospedador células de insecto o insectos, el transformante se cultiva, por ejemplo, en Medio de Insectos de Grace (Nature, 195, 788 (1962)) al que se añade un aditivo apropiado tal como suero bovino 10% inmovilizado. Preferentemente, el pH del medio se ajusta a aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,4. Normalmente, el transformante se cultiva a aproximadamente 27 °C durante aproximadamente 3 a 5 días y, si es necesario y se desea, el cultivo puede airearse o agitarse.

45 Cuando se emplean como hospedador células animales, el transformante se cultiva en, por ejemplo, medio MEM que contiene aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de suero bovino fetal [Science, 122, 501 (1952)], medio DMEM [Virology, 8, 396 (1959)], medio RPMI 1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], etc. Preferentemente, el pH del medio se ajusta a aproximadamente 6 a aproximadamente 8. El transformante se cultiva habitualmente a aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 15 a 60 horas y, si es necesario y se desea, el cultivo puede airearse o agitarse.

Especialmente cuando se usan células CHO (dhfr<sup>-</sup>) y gen dhfr como marcadores de selección, se prefiere usar medio DMEM sustancialmente sin timidina complementado con suero de ternero fetal dializado.

50 (Separación y purificación de la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención)

La proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención pueden separarse y purificarse del cultivo descrito anteriormente, por ejemplo, por los procedimientos descritos posteriormente.

55 Cuando la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención se extraen del cultivo o las células, después de la incubación los transformantes o células se recogen por un método públicamente conocido y se suspenden en un tampón apropiado. Los transformantes o células se rompen después por métodos públicamente conocidos tales como ultrasonificación, un tratamiento con lisozima y/o ciclos de congelación-descongelación,

seguido de centrifugación, filtración, etc. Puede obtenerse de este modo el extracto en bruto de la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención. El tampón usado para los procedimientos puede contener un modificador proteico tal como urea o hidrocloreuro de guanidina, o un tensioactivo tal como Triton (marca registrada) X-100, etc.

- 5 Cuando la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención se liberan en el cultivo, después de completar la incubación el sobrenadante puede separarse de los transformantes o células para recoger el sobrenadante por un método públicamente conocido.

La proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención contenidos en el sobrenadante de cultivo o el extracto obtenido de este modo pueden purificarse combinando de forma apropiada métodos públicamente conocidos para separación y purificación. Tales métodos públicamente conocidos para separación y purificación incluyen un método que utiliza la diferencia de solubilidad tal como precipitación de proteínas por adición de sal, precipitación de disolvente, etc.; un método que utiliza principalmente diferencia de peso molecular tal como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, etc.; un método que utiliza la diferencia en carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico, etc.; un método que utiliza la diferencia de afinidad específica tal como cromatografía de afinidad, etc.; un método que utiliza diferencia de hidrofobicidad tal como cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, etc.; un método que utiliza diferencia de punto isoelectrónico tal como electroforesis de isoelectroenfoque, cromatoenfoque, etc.; y similares.

En el caso en el que la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención obtenido de este modo estén en una forma libre, pueden convertirse a sus sales por métodos públicamente conocidos o modificaciones de los mismos. Por otro lado, cuando la proteína o polipéptido se obtiene en forma de una sal, puede convertirse en su forma libre o en una sal diferente por métodos públicamente conocidos o modificaciones de los mismos.

La proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención producido por el recombinante puede tratarse, antes o después de la purificación, con una enzima modificadora de proteínas apropiada para modificar de forma apropiada la misma o retirar parcialmente una proteína ((poli) péptido). Los ejemplos de la enzima modificadora de proteínas incluyen tripsina, quimiotripsina, arginil endopeptidasa, proteína quinasa, glicosidasa, o similares. La degradación de Edman usando el reactivo de Edman (fenilisotiocianato), que se conoce públicamente, puede usarse para suprimir el aminoácido N terminal.

La presencia de la proteína producida de este modo de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención puede ensayarse por un inmunoensayo enzimático usando un anticuerpo específico, o similares.

(Anticuerpo)

La presente invención proporciona además anticuerpos para el polipéptido de la presente invención.

Los anticuerpos para el polipéptido de la presente invención pueden ser cualquiera de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, siempre que sean capaces de reconocer el polipéptido de la presente invención.

35 Los anticuerpos para el polipéptido de la presente invención pueden fabricarse por métodos públicamente conocidos para producir anticuerpos o antisueros, usando como antígeno el polipéptido de la presente invención.

[Preparación de Anticuerpo Monoclonal]

(a) Preparación de célula productora de anticuerpo monoclonal

40 El polipéptido de la presente invención se administra a un mamífero por separado o junto con vehículos o diluyentes al sitio en el que es posible producción de anticuerpo por la administración. Para potenciar la productividad de anticuerpos tras la administración, pueden administrarse adyuvantes completos de Freund o adyuvantes incompletos de Freund. La administración se llevó a cabo habitualmente una vez cada dos a seis semanas y de 2 a 10 veces en total. Son ejemplos de los mamíferos aplicables monos, conejos, perros, cobayas, ratones, ratas, ovejas y cabras, prefiriéndose ratones y ratas.

45 En la preparación de células productoras de anticuerpos monoclonales, se seleccionan animales de sangre caliente, por ejemplo, ratones, inmunizados con un antígeno en el que se observa la titulación de anticuerpo, después se recoge el bazo o ganglio linfático después de 2 a 5 días desde la inmunización final y se fusionan células productoras de anticuerpos contenidas en los mismos con células de mieloma para proporcionar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Puede realizarse medición del título de anticuerpos en los antisueros, por ejemplo, haciendo reaccionar una forma marcada del polipéptido de la presente invención, que se describirá posteriormente, con el antisero seguido de ensayar la actividad de unión del agente de marcaje unido al anticuerpo. La fusión puede realizarse, por ejemplo, mediante el método conocido de Kohler y Milstein [Nature, 256, 495 (1975)]. Son ejemplos del acelerador de fusión polietilenglicol (PEG), virus Sendai, etc., de los que se emplea preferentemente PEG.

Son ejemplos de las células de mieloma NS-1, P3U1, SP2/0, etc. En particular, se emplea preferentemente P3U1. Una relación preferida del recuento de las células productoras de anticuerpo usadas (células de bazo) y el recuento de células de mieloma está dentro de un intervalo de aproximadamente 1:1 a 20:1. Cuando se añade PEG (preferentemente, PEG 1000 a PEG 6000) en una concentración de aproximadamente 10 a 80% seguido de incubación a aproximadamente 20 a 40 °C, preferentemente a aproximadamente 30 a 37 °C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, puede realizarse una fusión celular eficaz.

Pueden usarse diversos procedimientos para explorar el hibridoma productor de anticuerpos monoclonales. Los ejemplos de tales métodos incluyen un método que comprende añadir el sobrenadante de hibridoma a una fase sólida (por ejemplo, microplaca) adsorbida con un antígeno del polipéptido de la presente invención directamente o junto con un vehículo, añadir un anticuerpo antiinmunoglobulina (cuando se usan células de ratón para la fusión celular, se usa anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón) marcado con una sustancia radiactiva o una enzima, o Proteína A y detectar el anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida, y un método que comprende añadir el sobrenadante de hibridoma a una fase sólida adsorbida con un anticuerpo antiinmunoglobulina o Proteína A, añadir el polipéptido A de la presente invención marcado con una sustancia radiactiva o una enzima y detectar el anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida.

El anticuerpo monoclonal puede seleccionarse por métodos públicamente conocidos o por modificaciones de estos métodos. En general, puede efectuarse selección en un medio para células animales complementado con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Puede usarse cualquier medio de selección y crecimiento siempre que el hibridoma pueda crecer en él. Por ejemplo, puede usarse medio RPMI 1640 que contiene 1 a 20%, preferentemente 10 a 20% de suero bovino fetal, medio GIT (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contiene 1 a 10% de suero bovino fetal, un medio sin suero para incubación de un hibridoma (SFM-101, Nissui Seiyaku Co., Ltd.), etc. para el medio de selección y crecimiento. Se lleva a cabo incubación generalmente a 20 a 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C, durante 5 días a 3 semanas, preferentemente de 1 a 2 semanas. La incubación puede realizarse normalmente en gas de dióxido de carbono 5%. El título de anticuerpo del sobrenadante de cultivo de hibridomas puede determinarse del mismo modo que en el ensayo para el título de anticuerpos en antiseros descritos anteriormente.

#### (b) Purificación de anticuerpo monoclonal

Puede llevarse a cabo separación y purificación del anticuerpo monoclonal por métodos aplicados a separación y purificación convencional de inmunoglobulinas, del mismo modo que en los métodos convencionales para separación y purificación de anticuerpos policlonales [por ejemplo, precipitación de proteínas por adición de sal, precipitación de alcohol, precipitación de punto isoelectrico, electroforesis, adsorción y desorción con intercambiadores de iones (por ejemplo, DEAE), ultracentrifugación, filtración en gel, o un método de purificación específico que comprende recoger solamente un anticuerpo con un adsorbente activado tal como una fase sólida de unión a antígeno, Proteína A, Proteína G etc. y disociar la unión para obtener el anticuerpo].

#### [Preparación de anticuerpo policlonal]

El anticuerpo policlonal de la presente invención puede producirse por métodos públicamente conocidos o sus modificaciones. Por ejemplo, se prepara un complejo de inmunógeno (antígeno polipeptídico de la presente invención) y una proteína vehículo, y se inmuniza un mamífero con el complejo de una manera similar al método descrito anteriormente para la producción de anticuerpos monoclonales. El producto que contiene el anticuerpo para el polipéptido A de la presente invención se recoge del animal inmunizado seguido de separación y purificación del anticuerpo.

En el complejo de un inmunógeno y una proteína vehículo usado para inmunizar a un mamífero, el tipo de proteína vehículo y la relación de mezcla de un vehículo y hapteno puede ser cualquier tipo en cualquier relación, siempre que el anticuerpo se produzca eficazmente para el hapteno inmunizado por entrecruzamiento con el vehículo. Por ejemplo, se acopla albúmina de suero bovino, tiroglobulinas bovinas, hemocianina de lapa californiana, etc. a hapteno en una relación en peso de vehículo y hapteno de aproximadamente 0,1 a 20, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.

Puede usarse una diversidad de agentes de condensación para el acoplamiento de un vehículo con hapteno. Se usan glutaraldehído, carbodiimida, éster activado por maleimida, reactivos de éster activados que contienen grupo tiol o grupo ditiopiridilo, etc. para el acoplamiento.

El producto de condensación se administra a animales de sangre caliente solo o junto con vehículo o diluyentes al sitio en el que el anticuerpo puede producirse por la administración. Para potenciar la productividad del anticuerpo tras la administración, puede administrarse adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund. La administración se realiza habitualmente aproximadamente una vez cada aproximadamente 2 a 6 semanas y aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces en total.

El anticuerpo policlonal puede recogerse de la sangre, líquido ascítico, etc., preferentemente de la sangre, líquido ascítico, etc. de mamíferos inmunizados por el método descrito anteriormente.

El título de anticuerpos policlonales en antisuero puede ensayarse por el mismo procedimiento que se usa para determinación del título de anticuerpos del suero descrito anteriormente. La separación y purificación del anticuerpo policlonal puede llevarse a cabo de acuerdo con el método para la separación y purificación de inmunoglobulinas realizado como se aplica a la separación y purificación de anticuerpos monoclonales descrito anteriormente en la presente memoria.

El anticuerpo de la presente invención descrito anteriormente es capaz de reconocer específicamente el polipéptido de la presente invención. Por lo tanto, el anticuerpo puede usarse para cuantificar el polipéptido de la presente invención en un fluido de ensayo, especialmente por el inmunoensayo de tipo sándwich, etc. En otras palabras, la presente invención proporciona, por ejemplo, los siguientes métodos de cuantificación: (i) un método para cuantificar el polipéptido de la presente invención en un fluido de ensayo, que comprende hacer reaccionar el anticuerpo de la presente invención de forma competitiva con el fluido de ensayo y una forma marcada del polipéptido de la presente invención, y medir la relación del polipéptido marcado de la presente invención unido al anticuerpo; y, (ii) un método para cuantificar el polipéptido de la presente invención en un fluido de ensayo, que comprende hacer reaccionar el fluido de ensayo con el anticuerpo de la presente invención inmovilizado en un vehículo y una forma marcada del anticuerpo de la presente invención simultáneamente o secuencialmente, y medir la actividad del marcador en el vehículo inmovilizador.

En el método de cuantificación (ii) descrito anteriormente, se prefiere que un anticuerpo reconozca la región N terminal del polipéptido de la presente invención, y otro anticuerpo reaccione con la región C terminal del polipéptido de la presente invención.

Usando los anticuerpos monoclonales para el polipéptido de la presente invención (denominados en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones los anticuerpos monoclonales para la presente invención), puede cuantificarse el polipéptido de la presente invención. Además, el polipéptido de la presente invención también puede detectarse por tinción tisular, o similares. Para estos fines, puede usarse la molécula de anticuerpo en sí misma, o puede usarse también fracción F(ab')<sub>2</sub>, Fab' o Fab de la molécula de anticuerpo.

Los métodos de cuantificación del polipéptido de la presente invención que usan los anticuerpos de la presente invención no están particularmente limitados. Puede usarse cualquier método de cuantificación, siempre que la cantidad de un anticuerpo, antígeno o complejo antígeno-anticuerpo correspondiente a la cantidad de antígeno (por ejemplo, la cantidad del polipéptido de la presente invención) en un fluido de ensayo pueda detectarse por medios químicos o físicos y pueda calcularse la cantidad del antígeno a partir de una curva patrón preparada a partir de soluciones convencionales que contienen cantidades conocidas del antígeno. Por ejemplo, se usa de forma apropiada nefrometría, método competitivo, método inmunométrico y método de tipo sándwich, siendo el método de tipo sándwich descrito posteriormente más preferible con respecto a sensibilidad y especificidad.

Como el agente marcador para los métodos que usan sustancias marcadas, se emplean, por ejemplo, radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, etc. Para el radioisótopo, por ejemplo, se usan [<sup>125</sup>I], [<sup>131</sup>I], [<sup>3</sup>H], [<sup>14</sup>C], etc. Como la enzima descrita anteriormente, se prefieren enzimas estables con una alta actividad específica; por ejemplo, se usan β-galactosidasa, β-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa, malato deshidrogenasa, etc. Son ejemplos de la sustancia fluorescente usada fluorescamina e isotiocianato de fluoresceína. Para la sustancia luminiscente, se usan, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina y lucigenina. Además, puede usarse el sistema de biotina-avidina para unir un anticuerpo o antígeno con el agente de marcaje.

Para inmovilización de un antígeno o anticuerpo, puede usarse adsorción física. También pueden usarse métodos de unión química convencionalmente usados para insolubilización o inmovilización de la proteína, enzimas, etc. Para el vehículo, por ejemplo, se usan polisacáridos insolubles tales como agarosa, dextrano, celulosa, etc.; resina sintética tal como poliestireno, poliacrilamida, silicio, etc., vidrio y similares.

En el método de tipo sándwich, el anticuerpo monoclonal de la presente invención que está inmovilizado se hace reaccionar con un fluido de ensayo (reacción primaria), después con una forma marcada del anticuerpo monoclonal de la presente invención (reacción secundaria), y se mide la actividad del marcador en el vehículo inmovilizador, por lo que puede cuantificarse la cantidad del polipéptido A de la presente invención en el fluido de ensayo. El orden de las reacciones primaria y secundaria puede invertirse, y las reacciones pueden realizarse simultáneamente o con un intervalo. El agente marcador y el método para inmovilización pueden realizarse por algunas modificaciones de los descritos anteriormente.

En inmunoensayo por el método de tipo sándwich, el anticuerpo usado para anticuerpos inmovilizados o marcados no es necesariamente de una especie, sino que puede usarse una mezcla de dos o más anticuerpos para aumentar la sensibilidad de la medición.

En los métodos para ensayar el polipéptido de la presente invención por el método de tipo sándwich de acuerdo con la presente invención, se usan preferentemente anticuerpos que se unen a diferentes sitios del polipéptido de la presente invención como los anticuerpos monoclonales de la presente invención para las reacciones primaria y secundaria. Es decir, en los anticuerpos usados para las reacciones primaria y secundaria, por ejemplo, cuando el anticuerpo usado en la reacción secundaria reconoce la región C terminal del polipéptido de la presente invención,

es preferible usar el anticuerpo que reconoce la región distinta de la región C terminal para la reacción primaria, por ejemplo, el anticuerpo que reconoce la región N terminal.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede usarse para otros sistemas de ensayo distintos del método de tipo sándwich por ejemplo, para método competitivo, método inmunométrico, nefrometría o similares. En el método competitivo, un antígeno en un fluido de ensayo y un antígeno marcado se hacen reaccionar de forma competitiva con un anticuerpo, y el antígeno marcado que no ha reaccionado (F) y el antígeno marcado unido al anticuerpo (B) se separan (separación B/F). Se mide la cantidad del marcador en B o F, y se cuantifica la cantidad del antígeno en el fluido de ensayo. Este método de reacción incluye un método de fase líquida que usa un anticuerpo soluble como un anticuerpo, polietilenglicol para separación B/F y un anticuerpo secundario para el anticuerpo soluble, etc. y un método inmovilizado que usa un anticuerpo movilizado como el anticuerpo primario o que usa un anticuerpo soluble como el anticuerpo primario y anticuerpo inmovilizado como el anticuerpo secundario.

En el método inmunométrico, un antígeno en un fluido de ensayo y un antígeno inmovilizado se hacen reaccionar de forma competitiva con una cantidad dada de anticuerpo marcado, la fase sólida se separa de la fase líquida, o un antígeno en un fluido de ensayo y una cantidad en exceso de anticuerpo marcado se hacen reaccionar, el antígeno inmovilizado se añade después para unir el anticuerpo marcado que no ha reaccionado con la fase sólida y la fase sólida se separa de la fase líquida. Después se mide la cantidad del marcador en cada fase para cuantificar el antígeno en el fluido de ensayo.

En la nefrometría, se cuantifica el precipitado insoluble producido después de la reacción antígeno-anticuerpo en gel o solución. Cuando la cantidad de un antígeno en el fluido de ensayo es pequeña y solamente se obtiene una pequeña cantidad del precipitado, se emplea provechosamente nefrometría de láser usando dispersión de láser.

Para aplicar estos métodos inmunológicos individuales a los métodos de cuantificación de la presente invención, no se requiere ninguna condición o procedimiento particular. Se construyen sistemas para medir el polipéptido de la presente invención añadiendo la consideración técnica habitual en la materia a las condiciones y procedimientos convencionales. Para los detalles de estos medios técnicos generales, puede hacerse referencia a las siguientes revisiones y textos. Por ejemplo, Hiroshi Irie, ed. "Radioimmunoassay" (Kodansha, publicado en 1974), Hiroshi Irie, ed. "Sequel to the Radioimmunoassay" (Kodansha, publicado en 1979), Eiji Ishikawa, *et al.* ed. "Enzyme immunoassay" (Igakushoin, publicado en 1978), Eiji Ishikawa, *et al.* ed. "Enzyme immunoassay" (2ª ed) (Igakushoin, publicado en 1982), Eiji Ishikawa, *et al.* ed. "Enzyme immunoassay" (3ª ed.) (Igakushoin, publicado en 1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Parte A)), en la misma referencia., Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Parte B)), en la misma referencia., Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Parte C)), en la misma referencia., Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Parte D: Selected Immunoassays)), en la misma referencia., Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Parte E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), en la misma referencia., Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Parte I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (todas publicadas por Academic Press Publishing).

Como anteriormente, el polipéptido de la presente invención puede cuantificarse con buena sensibilidad, usando el anticuerpo de la presente invención.

Además, la cuantificación del polipéptido de la presente invención *in vivo* que usa el anticuerpo de la presente invención permite diagnosticar diversas enfermedades asociadas con disfunción del polipéptido de la presente invención.

El anticuerpo de la presente invención también puede usarse para detectar el polipéptido de la presente invención, que está presente en una muestra de ensayo tal como un fluido corporal, un tejido, etc. El anticuerpo también puede usarse para preparar una columna de anticuerpo usada para purificación del polipéptido de la presente invención, detectar el polipéptido de la presente invención en cada fracción tras purificación, analizar el comportamiento del polipéptido de la presente invención en las células en investigación; etc.

(Polinucleótido antisentido)

El polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de bases de un ADN que codifica el polipéptido de la presente invención (en lo sucesivo en la presente memoria estos ADN se denominan de forma colectiva en ocasiones ADN de la presente invención en la descripción del polinucleótido antisentido) puede ser cualquier polinucleótido antisentido, siempre que posea una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de bases del ADN de la presente invención y sea capaz de suprimir la expresión de dicho ADN, pero se prefiere ADN antisentido.

La secuencia de bases sustancialmente complementaria del ADN de la presente invención incluye, por ejemplo, una secuencia de bases que tiene al menos aproximadamente 70% de homología, preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología y más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología, con la secuencia de bases completa o con su secuencia de bases parcial (es decir, hebra complementaria del ADN de la presente invención) y similares. En particular, se prefiere el polinucleótido antisentido que tiene al menos aproximadamente 70% de homología,

preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 90% de homología y más preferentemente al menos aproximadamente 95% de homología, con la hebra complementaria de la secuencia de bases que codifica la región N terminal de la proteína de la presente invención (por ejemplo, la secuencia de bases en torno al codón de inicio, etc.) en la secuencia de bases completa de la hebra complementaria para el ADN de la presente invención.

Son ejemplos específicos polinucleótidos antisentido que comprenden toda o parte de la secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia de bases de ADN que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 48 o SEC ID N°: 51, etc.

El polinucleótido antisentido está constituido generalmente por bases de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30.

Para prevenir digestión con una hidrolasa tal como nucleasa, etc., el resto de ácido fosfórico (fosfato) de cada nucleótido que constituye el ADN antisentido puede sustituirse con restos de ácido fosfórico modificados químicamente, por ejemplo, fosfortioato, metil fosfonato, fosforoditionato, etc. Estos polinucleótidos antisentido pueden sintetizarse usando un sintetizador de ADN públicamente conocido, etc.

De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido antisentido que puede inhibir la replicación o expresión de un gen que codifica el polipéptido de la presente invención puede diseñarse y sintetizarse basándose en la información de secuencia de bases clonada o determinada del ADN que codifica el polipéptido. Dicho polinucleótido puede hibridar con ARN de un gen que codifica el polipéptido de la presente invención e inhibir la síntesis de ARN o la función de ARN, o puede regular/controlar la expresión de un gen que codifica el polipéptido de la presente invención mediante interacción con ARN asociados con el polipéptido de la presente invención. Los polinucleótidos complementarios de las secuencias específicas de ARN asociado con el polipéptido de la presente invención y polinucleótidos que pueden hibridar específicamente con ARN asociado con el polipéptido de la presente invención son útiles para regular/controlar la expresión de un gen que codifica el polipéptido de la presente invención *in vivo* e *in vitro*. Estos polinucleótidos son también útiles para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades, etc.

El término "correspondiente" se usa para indicar homólogo o complementario de una secuencia particular del nucleótido incluyendo el gen, secuencia de bases o ácido nucleico. El término "correspondiente" entre nucleótidos, secuencias de bases o ácidos nucleicos y polipéptidos habitualmente se refiere a aminoácidos de un polipéptido bajo instrucciones derivadas de la secuencia de nucleótidos (ácidos nucleicos) o sus complementos. El bucle en horquilla del extremo 5', repeticiones de 6 pares de bases del extremo 5', región no traducida del extremo 5', codón de inicio de la traducción de polipéptidos, región codificante de polipéptidos, codón de terminación de la traducción, región no traducida 3', región palindrómica del extremo 3' y bucle en horquilla del extremo 3' que codifica el polipéptido pueden seleccionarse como regiones diana preferidas, aunque puede seleccionarse cualquier otra región como una diana en los genes que codifican el polipéptido.

Puede indicarse que la relación entre el ácido nucleico diana y el polinucleótido complementario de al menos una parte de la región diana es "antisentido". Los ejemplos del polinucleótido antisentido incluyen un polinucleótido que contiene 2-desoxi-D-ribosa, un polinucleótido que contiene D-ribosa, cualquier otro tipo de polinucleótido que sea N-glicósido de una base de purina o pirimidina, u otros polímeros que tengan cadenas principales no de nucleótidos, u otros polímeros que contengan enlaces no convencionales (siempre que los polímeros contengan nucleótidos que tengan una configuración tal que permita la formación de pares de bases o apilamiento de bases, como se encuentra en ADN o ARN), etc. Los polinucleótidos antisentido pueden ser ADN bicatenario, ADN monocatenario, ARN bicatenario, ARN monocatenario o un híbrido ADN:ARN, y pueden incluir además polinucleótidos no modificados (u oligonucleótidos no modificados), los que tienen tipos de modificaciones públicamente conocidos, por ejemplo, los que tienen marcadores conocidos en la técnica, los que tienen protecciones terminales, polinucleótidos metilados, los que tienen sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural por su análogo, los que tienen modificaciones intramoleculares de nucleótidos tales como los que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y los que tienen enlaces cargados o enlaces que contienen azufre (por ejemplo, fosfortioatos, fosforoditioatos, etc.), los que tienen grupos de cadena lateral tales como proteínas (nucleasas, inhibidores de nucleasa, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.) o sacáridos (por ejemplo, monosacáridos, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen agentes alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos  $\alpha$  anoméricos, etc.) y similares. En la presente memoria la expresión "nucleósido", "nucleótido" y "ácido nucleico" se usan para referirse a restos que no contienen solamente las bases de purina y pirimidina, sino también otras bases heterocíclicas, que se han modificado. Tales modificaciones pueden incluir purinas y pirimidinas metiladas, purinas y pirimidinas aciladas y otros anillos heterocíclicos. Los nucleótidos modificados y nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, en el que, por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo pueden opcionalmente sustituirse con un átomo o átomos de halógeno, un grupo o grupos alifáticos, etc., o pueden convertirse en los grupos funcionales correspondientes tales como éteres, aminas o similares.

El polinucleótido antisentido de la presente invención es ARN, ADN o un ácido nucleico modificado (ARN, ADN). Son ejemplos específicos del ácido nucleico modificado, pero sin limitación, derivados de azufre y tiofosfato de ácidos nucleicos y los resistentes a degradación de amidas de polinucleósidos o amidas de oligonucleósidos. El polinucleótido antisentido de la presente invención puede modificarse preferentemente basándose en el siguiente diseño, es decir, (1) aumentando la estabilidad intracelular del polinucleótido antisentido, (2) potenciando la permeabilidad celular del polinucleótido antisentido, (3) aumentando la afinidad del ácido nucleico por la hebra sentido diana a un nivel mayor, o (4) minimizando la toxicidad, si la hubiera, del polinucleótido antisentido.

La mayoría de tales modificaciones se conocen en la técnica, como se desvela en J. Kawakami, *et al.*, Pharm. Tech. Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke, *et al.* ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993; etc.

El polinucleótido antisentido de la presente invención puede contener azúcares, bases o enlaces alterados o modificados, puede proporcionarse en una forma especializada tal como liposomas, microesferas o puede aplicarse a terapia génica, o puede proporcionarse en combinación con restos unidos. Tales restos unidos usados incluyen policationes tales como polilisina que actúan como neutralizadores de carga de la cadena principal de fosfato, o restos hidrófobos tales como lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, colesterolos, etc.) que potencian la interacción con membranas celulares o aumentan la captación del ácido nucleico. Son ejemplos preferidos de los lípidos para unirse a colesterolos o derivados de los mismos (por ejemplo, colesterol clorofornato, ácido cólico, etc.). Estos restos pueden unirse al ácido nucleico en los extremos 3' o 5' y también pueden unirse a los mismos a través de una base, azúcar o enlace nucleosídico intramolecular. Otros restos pueden ser grupos de protección específicamente situados en los extremos 3' o 5' del ácido nucleico para evitar la degradación por nucleasas tales como exonucleasa, RNasa, etc. Tales grupos de protección incluyen, pero sin limitación, grupos protectores hidroxilo conocidos en la técnica, incluyendo glicoles tales como polietilenglicol, tetraetilenglicol y similares.

La actividad de inhibición del polinucleótido antisentido puede investigarse usando el transformante de la presente invención, el sistema de expresión génica *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, o el sistema de traducción *in vivo* o *in vitro* del polipéptido de la presente invención. El ácido nucleico puede aplicarse a células por diversos métodos públicamente conocidos.

En lo sucesivo en la presente memoria, el polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6, o su péptido parcial o amida, o sal del mismo, se denomina en ocasiones brevemente "polipéptido A1 de la presente invención".

En lo sucesivo en la presente memoria, el polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o su péptido parcial o amida, o sal del mismo, se denomina en ocasiones brevemente "polipéptido A2 de la presente invención".

En lo sucesivo en la presente memoria, el polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial o amida, o sal del mismo, se denomina en ocasiones brevemente "polipéptido B de la presente descripción".

[1] Método de exploración y kit de exploración para compuesto candidato a fármaco

El método de exploración de compuestos candidatos a fármaco que comprende usar el polipéptido de la presente invención y el kit para explorar compuestos candidatos a fármacos que comprende el polipéptido de la presente invención se describen posteriormente (en lo sucesivo en la presente memoria denominado en ocasiones brevemente "método de exploración de la presente invención" y "kit de exploración de la presente invención", respectivamente).

(Método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de la presente invención)

El polipéptido de la presente invención es útil como un reactivo para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de la presente invención.

El método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad (función) del polipéptido de la presente invención (denominado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones simplemente el promotor o inhibidor), que comprende usar el polipéptido de la presente invención, incluye 1) a 3) posterior.

1) La actividad (actividad supresora de liberación de prolactina, etc.) del polipéptido A1 de la presente invención se ensaya y se compara entre (i) el caso en el que el polipéptido A1 de la presente invención se pone en contacto con células y (ii) el caso en el que el polipéptido A1 de la presente invención y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con células, para explorar el promotor o inhibidor.

En el método de exploración descrito anteriormente, por ejemplo, las células se incuban en los casos (i) y (ii) y se mide la cantidad de prolactina liberada. Se usan preferentemente células o similares, en los que se induce liberación de prolactina, como las células descritas anteriormente. Por ejemplo, se emplean células de hipófisis anterior de rata (por ejemplo, células eosinófilas), etc. Puede usarse cualquier medio siempre que sea un medio que no interfiera con las actividades poseídas por el polipéptido A1 de la presente invención, tal como la actividad supresora de liberación de prolactina; por ejemplo, se usa DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), etc. La cantidad de prolactina liberada puede determinarse por métodos públicamente conocidos, por ejemplo, radioinmunoensayo usando kit de RIA (radioinmunoensayo) (fabricado por Amersham, etc.). Son ejemplos del compuesto de ensayo péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos de tejidos animales, plasma sanguíneo, etc. Estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o compuestos conocidos.

Cuando un compuesto de ensayo promueve la actividad (por ejemplo, la actividad supresora de liberación de prolactina) del polipéptido A1 de la presente invención en el caso (ii) descrito anteriormente en al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, en comparación con el caso (i) anterior, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido A1 de la presente invención. Por ejemplo, cuando un compuesto de ensayo inhibe la actividad (por ejemplo, la actividad supresora de liberación de prolactina) del polipéptido A1 de la presente invención en el caso (ii) descrito anteriormente en al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, en comparación con el caso (i) anterior, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido A1 de la presente invención.

2) La actividad (actividad de liberación de prolactina, etc.) del polipéptido A2 de la presente invención se ensaya y se compara entre (iii) el caso en el que el polipéptido A2 de la presente invención se pone en contacto con células y (iv) el caso en el que el polipéptido A2 de la presente invención y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con células, para explorar el promotor o inhibidor.

En el método de exploración descrito anteriormente, por ejemplo, las células se incuban en los casos (iii) y (iv) y se mide la cantidad de prolactina liberada. Las células que se usan preferentemente son células en las que se induce liberación de prolactina, o similares. Por ejemplo, se emplean células de hipófisis anterior de rata (por ejemplo, células eosinófilas), etc. Puede usarse cualquier medio siempre que sea un medio que no interfiera con las actividades tales la actividad de liberación de prolactina poseídas por el polipéptido A2 de la presente invención; por ejemplo se usa DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) o similares. La cantidad de prolactina liberada puede determinarse por métodos públicamente conocidos, por ejemplo, radioinmunoensayo usando kit RIA (radioinmunoensayo) (fabricado por Amersham, etc.). El compuesto de ensayo incluye, por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos tisulares animales, plasma sanguíneo, etc. Estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o compuestos conocidos.

Por ejemplo, cuando un compuesto de ensayo promueve la actividad (por ejemplo, actividad liberadora de prolactina) del polipéptido A2 de la presente invención en el caso (iv) descrito anteriormente en al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, en comparación con el caso (iii) anterior, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido A2 de la presente invención. Por ejemplo, cuando un compuesto de ensayo inhibe la actividad (por ejemplo, actividad de liberación de prolactina) del polipéptido A2 de la presente invención en el caso (iv) descrito anteriormente en al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, en comparación con el caso (iii) anterior, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido A2 de la presente invención.

3) La actividad (actividad liberadora de prolactina, etc.) del polipéptido B de la presente descripción se ensaya y se compara entre (v) el caso en el que el polipéptido B de la presente descripción se pone en contacto con células y (vi) el caso en el que el polipéptido B de la presente descripción y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con células, para explorar el promotor o inhibidor.

En el método de exploración descrito anteriormente, por ejemplo, las células se incuban en los casos (v) y (vi) y se mide la cantidad de prolactina liberada. Las células que se usan preferentemente son células en las que se induce liberación de prolactina, o similares. Por ejemplo, se emplean células de hipófisis anterior de rata (por ejemplo, células eosinófilas), etc. Puede usarse cualquier medio siempre que sea un medio que no interfiera con las actividades tales como la actividad de liberación de prolactina, etc., poseídas por el polipéptido B de la presente descripción y, por ejemplo, se emplea DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) o similares. La cantidad de prolactina liberada puede determinarse por métodos públicamente conocidos, por ejemplo, radioinmunoensayo usando kit RIA (radioinmunoensayo) (fabricado por Amersham, etc.). El compuesto de ensayo incluye, por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos tisulares animales, plasma sanguíneo, etc. Estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o compuestos conocidos.

Por ejemplo, cuando un compuesto de ensayo promueve la actividad (por ejemplo, actividad de liberación de prolactina) del polipéptido B de la presente descripción en el caso (vi) descrito anteriormente en al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, en comparación con el caso (v) anterior, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido B de la presente descripción. Por ejemplo, cuando un compuesto de ensayo inhibe la actividad (por ejemplo, actividad de liberación de prolactina) del polipéptido B de la presente descripción en el caso (vi) descrito anteriormente en al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, en comparación con el caso (v) anterior, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido B de la presente descripción.

(Kit para explorar el compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de la presente invención)

El kit para explorar el compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de la presente invención comprende el polipéptido de la presente invención o su sal. Preferentemente, el kit comprende además reactivos para ensayar el polipéptido de la presente invención, tales como reactivos para ensayar prolactina (por ejemplo, kit RIA, etc.) y similares.

Los ejemplos de los kits de exploración de la presente invención incluyen los que comprenden (a) y (b) a continuación.

(a) Tampón de ensayo y tampón de lavado

Solución salina equilibrada de Hanks (fabricada por Gibco, Inc.) complementada con albúmina de suero bovino 0,05% (fabricado por Sigma, Inc.)

La solución se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , y se almacena a 4 °C o puede prepararse en el momento de uso.

(b) Preparación convencional del polipéptido de la presente invención

El polipéptido de la presente invención se disuelve en PBS complementado con albúmina de suero bovino 0,1% (fabricado por Sigma) para alcanzar 1 mM, y la solución se almacena a -20 °C.

(Método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción)

El método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína (por ejemplo, TGR1 o FM-3) de la presente descripción que comprende usar el polipéptido de la presente invención, o el kit para explorar un compuesto o su sal que alteran las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende el polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción se describen posteriormente en detalle (denominado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones brevemente "método de exploración de la presente invención" y "kit de exploración de la presente invención", respectivamente).

Usando la proteína de la presente descripción o construyendo el sistema de expresión de una forma recombinante de la proteína de la presente descripción y usando el sistema de ensayo de unión para el polipéptido de la presente invención (sistema de ensayo de receptor de ligando) a través del sistema de expresión, el compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción (por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos tisulares animales, plasma sanguíneo, etc.) pueden explorarse.

Tales compuestos incluyen compuestos que tienen la actividad estimuladora celular (por ejemplo, la actividad que promueve la liberación de ácido araquidónico, liberación de acetilcolina, liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, producción de AMPc intracelular, producción de GMPc intracelular, producción de inositol fosfato, cambio en el potencial de membrana celular, fosforilación de proteínas intracelulares, activación de c-fos, cambio de pH, etc.) mediada por la proteína de la presente descripción (es decir, agonistas), compuestos que no tienen la actividad estimuladora celular (es decir, antagonistas) y similares.

La expresión "altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción" se usa para incluir tanto casos en los que la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción se inhibe como en los que se promueve.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende comparar (i) el caso en el que el polipéptido de la presente invención se pone en contacto con la proteína de la presente descripción y (ii) el caso en el que el polipéptido de la presente invención y un compuesto de

ensayo se ponen en contacto con la proteína de la presente descripción.

De acuerdo con el método de exploración de la presente invención, el método comprende ensayar, (i) cuando el polipéptido de la presente invención se pone en contacto con la proteína de la presente descripción descrita anteriormente y (ii) cuando el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con la proteína de la presente descripción, la actividad estimuladora celular (por ejemplo, la actividad que promueve liberación de ácido araquidónico, liberación de acetilcolina, liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, producción de AMPc intracelular, producción de GMPc intracelular, producción de inositol fosfato, cambio del potencial de membrana celular, fosforilación de proteínas intracelulares, activación de c-fos, cambio de pH, etc.) o similares se ensaya y se realiza comparación entre (i) y (ii).

Los ejemplos específicos del método de exploración de la presente invención incluyen:

(1) un método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende medir cantidades de unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción cuando una forma marcada del polipéptido de la presente invención, que se muestra como un derivado del polipéptido de la presente invención (denominado en lo sucesivo en la presente memoria simplemente "polipéptido marcado de la presente invención"), se pone en contacto con la proteína de la presente descripción y cuando el polipéptido marcado de la presente invención y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con la proteína de la presente descripción; y comparar las cantidades de unión;

(2) un método para explorar un compuesto o su sal que altera las cantidades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende medir cantidades de unión del polipéptido de la presente invención y una célula que contiene el polipéptido de la presente invención o una fracción de membrana de la célula, cuando el polipéptido marcado de la presente invención se pone en contacto con la célula que contiene la proteína de la presente descripción o la fracción de membrana de la célula y cuando el polipéptido marcado de la presente invención y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con la célula que contiene la proteína de la presente descripción o la fracción de membrana de la célula, y comparar las cantidades de unión;

(3) un método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende ensayar la cantidad de unión del polipéptido marcado de la presente invención con la proteína de la presente descripción, en el caso en el que el polipéptido marcado de la presente invención se pone en contacto con la proteína de la presente descripción expresada en una membrana celular cultivando un transformante que contiene un ADN que codifica la proteína de la presente descripción y en el caso en el que el polipéptido marcado de la presente invención y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con la proteína de la presente descripción expresada en una membrana celular cultivando un transformante que contiene un ADN que codifica la proteína de la presente descripción y comparar las propiedades;

(4) un método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende ensayar la actividad estimuladora celular (por ejemplo, la actividad que promueve la liberación de ácido araquidónico, liberación de acetilcolina, liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, producción de AMPc intracelular, producción de GMPc intracelular, producción de inositol fosfato, cambio en el potencial de membrana celular, fosforilación de proteínas intracelulares, activación de c-fos, cambio de pH, etc.) mediada por la proteína de la presente descripción, cuando un compuesto que activa la proteína de la presente descripción (por ejemplo, el polipéptido de la presente invención) se pone en contacto con una célula que contiene la proteína de la presente descripción y cuando un compuesto que activa la proteína de la presente descripción y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con una célula que contiene la proteína de la presente descripción y comparar las propiedades; y

(5) un método para explorar un compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, que comprende ensayar la actividad estimuladora celular (por ejemplo, la actividad que promueve liberación de ácido araquidónico, liberación de acetilcolina, liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, producción de AMPc intracelular, producción de GMPc intracelular, producción de inositol fosfato, cambio en el potencial de membrana celular, fosforilación de proteínas intracelulares, activación de c-fos, cambio de pH, etc.) mediada por la proteína de la presente descripción, cuando un compuesto que activa la proteína de la presente descripción (por ejemplo, el polipéptido de la presente invención) se pone en contacto con la proteína de la presente descripción expresada en una membrana celular cultivando un transformante que contiene un ADN que codifica la proteína de la presente descripción y cuando un compuesto que activa la proteína de la presente descripción y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con la proteína de la presente descripción expresada en una membrana celular cultivando un transformante que contiene un ADN que codifica la proteína de la presente descripción y comparar las propiedades; y similares.

El método de exploración de la presente invención se describirá posteriormente de forma más específica.

En primer lugar, la proteína de la presente descripción, que se usa para el método de exploración de la presente invención, puede ser cualquier proteína, siempre que contenga la proteína de la presente descripción y preferentemente sea una fracción de membrana de órganos, etc. de ser humano o mamífero. Sin embargo, es muy difícil obtener órganos derivados de seres humanos entre otros, y la proteína de la presente descripción, o similares, expresada abundantemente usando recombinantes, son adecuados para su uso en la exploración.

Para producir la proteína de la presente descripción, se usan los métodos mencionados, etc.

Cuando se usan células que contienen la proteína de la presente descripción, fracciones de membrana de estas células, o similares, en el método de exploración de la presente invención, estas células o fracciones de membrana pueden prepararse por los procedimientos descritos posteriormente.

Cuando se emplean células que contienen la proteína de la presente descripción, por ejemplo, TGR1, las células pueden fijarse usando glutaraldehído, formalina, etc. La fijación puede realizarse por métodos públicamente conocidos.

Las células que contienen TGR1 se refieren a células hospedadoras en las que se expresa TGR1, y tales células hospedadoras incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, células de insecto, células animales, etc., descritas anteriormente.

La fracción de membrana celular se usa para indicar una fracción abundante en la membrana celular obtenida por rotura celular y posterior fraccionamiento por métodos públicamente conocidos. Los métodos de rotura celular incluyen aplastamiento celular usando un homogeneizador Potter-Elvehjem, rotura usando un mezclador de Waring o Polytron (fabricado por Kinematica Inc.), rotura por ultrasonificación, rotura por pulverización celular a través de boquillas finas con una presión aumentada usando una prensa Francesa, y similares. El fraccionamiento de membrana celular se efectúa principalmente por fraccionamiento usando una fuerza centrífuga, tal como centrifugación fraccional, centrifugación de gradiente de densidad, etc. Por ejemplo, el fluido de rotura celular se centrifuga a velocidad baja (500 rpm a 3.000 rpm) durante un periodo de tiempo corto (normalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos), el sobrenadante resultante se centrifuga después a mayor velocidad (de 15.000 rpm a 30.000 rpm) normalmente durante 30 minutos a 2 horas. El precipitado obtenido de este modo se usa como la fracción de membrana. La fracción de membrana es rica en TGR1 expresado y componentes de membrana tales como fosfolípidos derivados de células, proteínas de membrana, etc.

La cantidad de TGR1 en las células o fracciones de membrana celular que contienen el TGR1 es preferentemente de  $10^3$  a  $10^8$  moléculas, más preferentemente de  $10^5$  a  $10^7$  moléculas, por célula. A media que aumenta la cantidad de expresión, la actividad de unión a ligando por unidad de la fracción de membrana aumenta de modo que no solamente puede construirse el sistema de exploración altamente sensible sino que también pueden ensayarse grandes cantidades de muestras en el mismo lote.

Para realizar los métodos (1) a (3) para explorar el compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción, se emplean una fracción apropiada de la proteína de la presente descripción o un ligando marcado o un compuesto que tiene la actividad del ligando (tal como el polipéptido de la presente invención). Para la fracción de la proteína de la presente descripción, es deseable una fracción del tipo de origen natural de la proteína de la presente descripción o una fracción del tipo de proteína recombinante de la presente descripción que tenga actividades equivalentes a la misma, o similares. En la presente memoria, la actividad equivalente se usa para indicar actividades de unión a ligando, etc., que son equivalentes. Para el ligando marcado o el compuesto que tiene la actividad del ligando, se usa un ligando marcado o un compuesto que tiene la actividad del ligando (tal como el polipéptido de la presente invención), etc. Puede utilizarse un ligando marcado con, por ejemplo, [ $^3\text{H}$ ], [ $^{125}\text{I}$ ], [ $^{14}\text{C}$ ], [ $^{35}\text{S}$ ], etc. (una forma marcada del polipéptido de la presente invención), etc.

Específicamente, la exploración de un compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción puede realizarse por los siguientes procedimientos. En primer lugar, se produce una preparación del receptor convencional suspendiendo células que contienen la proteína de la presente descripción o sus fracciones de membrana en un tampón apropiado para exploración. Puede usarse cualquier tampón siempre que no interfiera con la unión ligando-receptor, incluyendo dicho tampón un tampón fosfato, un tampón Tris-HCl, etc., que tiene pH de 4 a 10 (convenientemente pH de 6 a 8). Para el fin de minimizar la unión no específica, puede añadirse un tensioactivo tal como CHAPS, Tween-80™ (fabricado por Kao-Atlas Inc.), digitonina, desoxicolato, etc. al tampón. Además para el fin de suprimir la degradación de la proteína de la presente descripción o el polipéptido de la presente invención por una proteasa, también puede añadirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF, leupeptina, E-64 (fabricado por Peptide Institute, Inc.), pepstatina, etc. Se añade una cantidad dada (5.000 cpm a 500.000 cpm) del polipéptido marcado de la presente invención (una forma marcada del polipéptido de la presente invención) a 0,01 ml a 10 ml de la solución receptora y, a la vez, se permite que esté presente conjuntamente un compuesto de ensayo  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$   $\mu\text{M}$ . Para determinar la cantidad de unión no específica (NSB), también se proporciona un tubo de reacción que contiene un gran exceso del polipéptido de la presente invención en una forma no marcada. La reacción se lleva a cabo de 0 °C a 50 °C, preferentemente de aproximadamente 4 °C a 37 °C durante 20 minutos a 24 horas, preferentemente de 30 minutos a 3 horas. Después

de completar la reacción, la mezcla de reacción se filtra a través de papel de filtro de fibra de vidrio, etc., y se lava con un volumen apropiado del mismo tampón. Después se mide la radiactividad residual en el papel de filtro de fibra de vidrio por medio de un contador de centelleo líquido en un contador  $\gamma$ . Cuando se resta la unión no específica (NSB) de la cuenta ( $B_0$ ) cuando está ausente cualquier compuesto antagonista y la cuenta obtenida de este modo ( $B_0 - \text{NSB}$ ) se hace 100%, un compuesto de ensayo que tenga la unión específica ( $B - \text{NSB}$ ) de, por ejemplo, 80% o menos, puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención.

Para ensayar la unión de la proteína de la presente descripción con el polipéptido de la presente invención, también puede emplearse BIAcore (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech Co.). En esta técnica, el polipéptido de la presente invención se inmoviliza en una microplaca sensora mediante el método de acoplamiento de amino siguiendo el protocolo adjunto al dispositivo. Un tampón tal como tampón fosfato, tampón Tris, etc., que contenga la proteína de la presente descripción purificada de las células que contienen la proteína de la presente descripción o transformantes que contienen un ADN que codifica la proteína de la presente descripción, o una fracción de membrana que contenga la proteína de la presente descripción, o la proteína purificada de la presente descripción o una fracción de membrana que contenga la proteína de la presente descripción y un compuesto de ensayo, se pasa sobre la microplaca sensora a un caudal de 2 a 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Supervisando que el compuesto de ensayo presente conjuntamente altera el cambio en resonancia de plasmón superficial provocado por la unión de la proteína de la presente descripción con el polipéptido de la presente invención en la microplaca sensora, puede explorarse el compuesto que altera la unión de la proteína de la presente descripción con el polipéptido de la presente invención. De acuerdo con esta técnica, la alteración puede determinarse de forma similar mediante el procedimiento que implica inmovilizar de la proteína de la presente descripción en una microplaca sensora y pasar sobre la microplaca sensora una solución de tampón tal como tampón de fosfato, tampón Tris, etc., que contiene el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo. Son ejemplos del compuesto de ensayo los mismos que se han proporcionado anteriormente.

El método (4) o (5) descrito anteriormente para explorar el compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción puede realizarse como sigue. Por ejemplo, la actividad estimuladora celular (por ejemplo, la actividad que promueve o suprime liberación de ácido araquidónico, liberación de acetilcolina, liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, producción de AMPc intracelular, producción de GMPc intracelular, producción de inositol fosfato, cambio del potencial de membrana celular, fosforilación de proteínas intracelulares, activación de c-fos, cambio de pH, etc.) mediada por la proteína de la presente descripción pueden ensayarse por métodos públicamente conocidos, o usando kits de ensayo disponibles en el mercado. Específicamente, las células que contienen la proteína de la presente descripción se cultivan en primer lugar en una placa de múltiples pocillos, etc. Antes de explorar, el medio se reemplaza con medio nuevo o célula con un tampón no citotóxico apropiado, seguido de incubación durante un periodo de tiempo dado en presencia de un compuesto de ensayo, etc. Posteriormente, las células se extraen o se recupera el sobrenadante y el producto resultante se cuantifica mediante procedimientos apropiados. Cuando es difícil detectar la producción del indicador de actividad estimuladora celular (por ejemplo, ácido araquidónico, etc.) debido a una enzima degradante contenida en las células, puede añadirse un inhibidor contra dicha enzima degradante antes del ensayo. Para detectar la actividad tal como la supresión de producción de AMPc, se aumenta la producción de línea basal en las células por forskolina o similares y puede detectarse el efecto supresor en la producción de línea basal aumentada.

Para explorar ensayando la actividad estimuladora celular, se requieren células en las que se exprese la proteína de la presente descripción. Son ejemplos preferidos de las células, en las que se expresa la proteína de la presente descripción, líneas celulares, etc., en las que se expresa un tipo recombinante de la proteína de la presente descripción descrita anteriormente. La célula, en la que la proteína de la presente descripción se expresa y que es un transformante, puede ser una cepa expresada de forma estable o una cepa expresada de forma temporal. Para células animales, también se emplean las células mencionadas del mismo tipo.

Los ejemplos de los compuestos de ensayo incluyen péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos tisulares animales, plasma sanguíneo, etc.

En más detalle, se describen posteriormente los siguientes sistemas de ensayo usados para el sistema de ensayo de receptor de ligando mencionado.

(1) Cuando las células con receptor expresado se estimulan por un agonista del receptor, la proteína G en las células se activa y se une al mismo GTP. Este fenómeno se supervisa también en una fracción de membrana de las células con receptor expresado. Habitualmente, el GTP se hidroliza y cambia a GDP. Cuando se añade previamente  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  a la solución de reacción,  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  se une a la proteína G como en GTP, pero no se hidroliza de modo que se mantiene el estado unido a la membrana celular que contiene proteína G. Cuando se usa  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  marcado, la radiactividad que permanece en la membrana celular puede medirse para ensayar la actividad estimuladora de células con receptor expresado del agonista del receptor. Usando esta reacción, la actividad estimuladora del polipéptido de la presente invención en las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción. Aunque este método se lleva a cabo usando la fracción de membrana que contiene la proteína de la presente descripción como en (1) a (3), no usando las células que contienen la proteína de la presente descripción como en

(4) o (5) descritas anteriormente, la actividad estimuladora celular se ensaya en el método como en (4) o (5). De acuerdo con este método de ensayo, la sustancia que muestra actividad promotora de la unión de GTP $\gamma$ S con la fracción de membrana que contiene la proteína de la presente descripción es un agonista, el compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción puede explorarse añadiendo el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo y supervisando que se producen cambios en las actividades promotoras de la unión de GTP $\gamma$ S en la fracción de membrana que expresa la proteína de la presente descripción, en comparación con administración única del polipéptido de la presente invención. Por lo tanto, el compuesto que muestra la actividad de suprimir la actividad promotora de la unión de GTP $\gamma$ S frente a la fracción de membrana de células capaces de expresar la proteína de la presente descripción por el polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, un agonista puede explorarse también administrando un compuesto de ensayo solamente y supervisando la actividad promotora de la unión de GTP $\gamma$ S en la fracción de membrana de células que expresan la proteína de la presente descripción.

Un ejemplo específico del método de exploración se describe posteriormente de forma específica. La fracción de membrana que contiene la proteína de la presente descripción, que se prepara por el procedimiento descrito anteriormente, se diluye en un tampón para dilución de membrana (Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 150 mM, GDP 1  $\mu$ M, BSA 0,1%, pH 7,4). Una relación de dilución varía dependiendo de la cantidad de un receptor expresado. La dilución se distribuye en 0,2 ml en cada uno de Falcon 2053, a la que se añade el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo, y se añade adicionalmente [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S a la mezcla en una concentración final de 200 pM. Después de mantener a 25 °C durante una hora, se añade tampón de lavado helado (Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 150 mM, BSA 0,1%, CHAPS 0,05%, pH 7,4, 1,5 ml) a la mezcla seguido de filtración a través de un papel de filtro de fibra de vidrio GF/F. Después de mantener a 65 °C durante 30 minutos, la mezcla se seca y se mide la radiactividad de [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S unido a la fracción de membrana que permaneció en el papel de filtro con un contador de centelleo líquido. Cuando la radiactividad en la zona experimental añadida solamente con el polipéptido de la presente invención se define como 100% y la radiactividad de la zona experimental sin añadir el polipéptido de la presente invención se define como 0%, se calcula un efecto del compuesto de ensayo en la actividad promotora de la unión de GTP $\gamma$ S por el polipéptido de la presente invención. El compuesto de ensayo que muestra la actividad promotora de unión a GTP $\gamma$ S de, por ejemplo, 80% o menos puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención.

(2) En las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción, el nivel de AMPc intracelular se reduce mediante estimulación del polipéptido de la presente invención. Usando esta reacción, pueden ensayarse las actividades estimuladoras del polipéptido de la presente invención en las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción.

El nivel de AMPc producido en las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción puede ensayarse por el sistema RIA usando un anticuerpo anti-AMPc, cuyo anticuerpo se obtiene de ratón, rata, conejo, cabra, bovino, etc. inmunizado, y AMPc marcado con [<sup>125</sup>I] (ambos disponibles en el mercado) o mediante el sistema de EIA usando un anticuerpo anti-AMPc y AMPc marcado en combinación. También es posible cuantificar mediante el método de SPA, usando perlas, que contienen centelleantes que portan anticuerpos anti-AMPc inmovilizados usando proteína A o anticuerpos para IgG, etc. del animal usado para producir los anticuerpos anti-AMPc (usando, por ejemplo, el kit fabricado por Amersham Pharmacia Biotech, Inc.).

De acuerdo con este método, el compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción puede explorarse aumentando el nivel de AMPc intracelular por un ligando tal como forskolina, calcitonina, etc. capaz de aumentar el nivel de AMPc intracelular, añadiendo el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo, y supervisando la supresión del nivel de AMPc intracelular alterado por administración única del polipéptido de la presente invención. En este caso, el compuesto que muestra una actividad de inhibición de la actividad de supresión de producción de AMPc en células, en las que se expresa la proteína de la presente descripción, por el polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, puede explorarse un compuesto que muestra la actividad agonista supervisando la actividad supresora de la producción de AMPc cuando se añade un compuesto de ensayo solamente.

El método de exploración se describe posteriormente más específicamente. Se siembran células CHO en las que se expresa la proteína de la presente descripción en una placa de 24 pocillos en 5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo seguido de incubación durante 48 horas. Las células se lavan con tampón de Hanks (pH 7,4) complementado con 3-isobutilmetilxantina 0,2 mM, BSA 0,05% y HEPES 20 mM (en lo sucesivo en la presente memoria el tampón de Hanks (pH 7,4) complementado con 3-isobutilmetilxantina 0,2 mM, BSA 0,05% y HEPES 20 mM se denomina simplemente tampón de reacción). A continuación, se añaden 0,5 ml del tampón de reacción a las células y la mezcla se mantiene caliente en un incubador durante 30 minutos. El tampón de reacción se retira y se añaden 0,25 ml de un tampón de reacción nuevo a las células. Después, se añaden 0,25 ml de un tampón de reacción que contiene forskolina 2  $\mu$ M,

en el que se incorpora el polipéptido de la presente invención 1  $\mu\text{M}$  o el polipéptido de la presente invención 1  $\mu\text{M}$  y un compuesto de ensayo, a las células, seguido de reacción a 37 °C durante 24 minutos. La reacción se termina añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 20%. La mezcla de reacción se pone después en hielo durante 1 hora para extraer AMPc intracelular. La cantidad de AMPc en el extracto se mide usando un kit de AMPc EIA (Amersham Pharmacia Biotech). Tomando la cantidad de AMPc producida por estimulación con forskolina como 100% y la cantidad de AMPc inhibida por adición del polipéptido de la presente invención 1  $\mu\text{M}$  como 0%, se calcula un efecto del compuesto de ensayo en la actividad de supresión de la producción de AMPc por el polipéptido de la presente invención. El compuesto de ensayo que inhibe la actividad del polipéptido de la presente invención para aumentar la actividad de producción de AMPc, por ejemplo, a 80% o más, puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención.

Para determinar la actividad promotora de la producción de AMPc, el AMPc producido añadiendo un compuesto de ensayo a células CHO, en las que se expresa la proteína de la presente descripción, sin añadir forskolina, se cuantifica por el procedimiento descrito anteriormente. En este caso, un compuesto de ensayo que muestra que aumenta la actividad productora de AMPc, por ejemplo, a 10% o más, puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención.

(3) Se inserta un ADN que contiene CRE (elemento de respuesta a AMPc) en un sitio de multiclonación cadena arriba de un gen de luciferasa en Vector PicaGene Básico o Vector PicaGene Potenciador (Toyo Ink Mfg. Co., Ltd.), que se convierte en un vector de gen indicador-CRE. En una célula transfectada con vector de gen indicador-CRE, la estimulación asociada con aumento de AMPc induce la expresión del gen de luciferasa mediado por CRE y producción de proteína luciferasa posterior a la misma. En otras palabras, ensayando la actividad luciferasa, pueden detectarse cambios en el nivel de AMPc en las células transfectada con vector de gen indicador-CRE. Utilizando las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción, que se transfectan con el vector de gen indicador-CRE, puede explorarse un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de presente descripción. El método de exploración se describe específicamente posteriormente.

Las células transfectadas con gen indicador-CRE en las que se expresa la proteína de la presente descripción se siembran en una placa de 24 pocillos en  $5 \times 10^3$  células/pocillo seguido de incubación durante 48 horas. Las células se lavan en tampón de Hanks (pH 7,4) complementado con 3-isobutil-metilxantina 0,2 mM, BSA 0,05% y HEPES 20 mM (en lo sucesivo en la presente memoria el tampón de Hanks (pH 7,4) complementado con 3-isobutil-metilxantina 0,2 mM, BSA 0,05% y HEPES 20 mM se denomina tampón de reacción). A continuación, se añaden 0,5 ml del tampón de reacción a las células y la mezcla se mantiene caliente en un incubador durante 30 minutos. El tampón de reacción se retira y se añaden 0,25 ml de un tampón de reacción nuevo a las células. Después, se añaden el polipéptido de la presente invención 1 nM o el polipéptido de la presente invención 1 nM y un compuesto de ensayo, así como 0,25 ml del tampón de reacción que contiene forskolina 2  $\mu\text{M}$  a las células, seguido de reacción a 37 °C durante 24 minutos. Las células se disuelven en un agente de lisis celular para PicaGene (Toyo Ink Mfg. Co., Ltd.) y se añade un sustrato luminiscente (Toyo Ink Mfg. Co., Ltd.) al lisado. La luminiscencia emitida por luciferasa se mide por un luminómetro, un contador de centelleo líquido o un contador superior. Un efecto del compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción puede ensayarse comparando las cantidades de luminiscencia de luciferasa con el caso en el que el polipéptido de la presente invención se administra solo. En este caso, se suprime un aumento de la cantidad de luminiscencia por estimulación con forskolina mediante administración del polipéptido de la presente invención. El compuesto que puede recuperar la supresión puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, puede explorarse también un agonista administrando un compuesto de ensayo solo y supervisando la supresión de la cantidad de luminiscencia intensificada por estimulación con forskolina del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención.

Además de luciferasa, puede emplearse fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa o  $\beta$ -galactosidasa como el gen indicador. La actividad enzimática de productos génicos de estos genes indicadores puede ensayarse fácilmente usando kits de ensayo disponibles en el mercado, como se describe posteriormente. La actividad fosfatasa alcalina, la actividad cloranfenicol acetiltransferasa y la actividad  $\beta$ -galactosidasa pueden ensayarse usando, por ejemplo, Lumi-Phos 530 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kit de Ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa FAST CAT fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y Aurora Gal-XE fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., respectivamente.

(4) Cuando las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción se estimulan por el polipéptido de la presente invención para liberar metabolitos de ácido araquidónico extracelularmente, el ácido araquidónico que tiene radiactividad se incorpora previamente a las células, y la actividad puede determinarse ensayando la radiactividad liberada extracelularmente. En este caso, el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo se añaden para supervisar el efecto del polipéptido de la presente invención en la actividad liberadora de metabolitos de ácido araquidónico. Por lo tanto, puede explorarse un compuesto que afecta a la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción.

En este caso, puede seleccionarse un compuesto que inhibe la actividad liberadora de metabolitos de ácido araquidónico como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Además, añadiendo un compuesto de ensayo solo y supervisando la actividad liberadora de metabolitos de ácido araquidónico en la célula en la que se expresa la proteína de la presente descripción, también puede explorarse un compuesto que muestra la actividad agonista.

El método de exploración que afecta a la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción se describe posteriormente de forma más específica.

Se siembran células CHO en las que se expresa la proteína de la presente descripción en una placa de 24 pocillos en  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Después de incubación durante 24 horas, se añade [ $^3\text{H}$ ] ácido araquidónico a las células en 0,25  $\mu\text{Ci}$ /pocillo. Dieciséis horas después, las células se lavan en tampón de Hanks (pH 7,4) complementado con BSA 0,05% y HEPES 20 mM. A cada pocillo se añaden 500  $\mu\text{l}$  del tampón de reacción que contiene el polipéptido de la presente invención en la concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , o el polipéptido de la presente invención en la concentración final de 10  $\mu\text{M}$  y un compuesto de ensayo. Después de incubación a 37 °C durante 60 minutos, se cargan 400  $\mu\text{l}$  de la solución de reacción en un centelleador y se mide la cantidad de metabolitos de [ $^3\text{H}$ ] ácido araquidónico liberados en la solución de reacción usando un contador de centelleo. Cuando se añade solamente tampón 10 nM, en el que no se añade el polipéptido de la presente invención, la cantidad de metabolitos de [ $^3\text{H}$ ] ácido araquidónico se toma como 0% y la cantidad de metabolitos de [ $^3\text{H}$ ] ácido araquidónico se toma como 100% cuando se añade el tampón al que se añade el polipéptido de la presente invención 10 nM (no se añade compuesto de ensayo). Por lo tanto, se calcula un efecto en la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción. Un compuesto que muestra la actividad de liberación de metabolitos de ácido araquidónico de, por ejemplo, 50% o menos, puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención.

(5) Cuando las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción se estimulan por el polipéptido de la presente invención, aumenta el nivel de unión  $\text{Ca}^{2+}$  intercelular. Utilizando esto, pueden supervisarse los efectos de un compuesto de ensayo en la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción.

Las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción se inoculan en un cubreobjetos de vidrio esterilizado para microscopia. Dos días después, el medio de cultivo se reemplaza por HBSS en el que se suspende Fura-2 AM 4 mM (Dojin Kagaku Kenkyusho), que después se permite que se mantenga a temperatura ambiente durante 2 horas y 30 minutos. Después de lavar con HBSS, el cubreobjetos de vidrio se pone en una cubeta, y se mide el aumento de relación de la intensidad de fluorescencia a 505 nm con un espectrómetro de fluorescencia a longitudes de onda de excitación de 340 nm y 380 nm, cuando se añaden el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo. En este caso, un compuesto que afecta a la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción puede explorarse midiendo cambios en la intensidad de fluorescencia provocados por adición del compuesto de ensayo, en comparación con el caso en el que se administra solamente el polipéptido de la presente invención. Además, puede usarse FLIPR (fabricado por Molecular Device) como se describe posteriormente. Es decir, se añade Fluo-3 AM (fabricado por Dojin Kagaku Kenkyusho) a una suspensión celular para incorporar Fluo-3 AM a las células. El sobrenadante se lava después varias veces a través de centrifugación y las células se inoculan en una placa de 96 pocillos. Después de ponerlo en el dispositivo FLIPR, el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo se añaden del mismo modo que en el caso de Fura-2. Un compuesto que afecta a la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción puede explorarse midiendo los cambios en la intensidad de fluorescencia provocados por adición del compuesto de ensayo, en comparación con el caso en el que se administra solamente el polipéptido de la presente invención. En estos casos, un compuesto que suprime un aumento de la intensidad de fluorescencia por el polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, un agonista puede también explorarse supervisando un aumento de la intensidad de fluorescencia cuando se añade solamente un compuesto de ensayo.

En las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción, cuando se coexpresa un gen de proteína tal como aequorina, etc. que emite luz en respuesta a un aumento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y la aequorina cambia al tipo unido a Ca por un aumento del nivel de iones  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares para emitir luz. Utilizando esta emisión de luz, puede explorarse un compuesto que afecta a la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción añadiendo el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo y supervisando que la emisión de luz observada por adición del compuesto de ensayo cambia, en comparación con el caso en el que se administra solamente el polipéptido de la presente invención. El método es el mismo que se ha descrito anteriormente, excepto que no se incorpora la sustancia fluorescente a las células.

(6) Se sabe que cuando se añade un agonista del receptor a una célula que expresa receptor, el nivel de inositol trifosfato intracelular aumenta. Supervisando la reacción en la célula que expresa la proteína de la presente descripción, que se induce por el polipéptido de la presente invención, puede explorarse un compuesto que afecta a la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción. Un día después de la

inoculación de las células en una placa de 24 pocillos, se añade mio-[2-<sup>3</sup>H]inositol (2,5 microCi/pocillo) a cada pocillo y se incuba durante un día en este medio. Después de lavar exhaustivamente, el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo se añaden a las células. La reacción se termina después añadiendo ácido perclórico 10%. La mezcla de reacción se neutraliza con KOH 1,5 M y solución HEPES 60 mM y después se pasa a través de una columna empaquetada con 0,5 ml de resina de Ag1 x 8 (Bio-Rad). Después de lavar con Na<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 5 mM y HCOONH<sub>4</sub> 60 mM, la radiactividad eluida con HCOONH<sub>4</sub> 1 M y HCOOH 0,1 M se mide con un contador de centelleo líquido. Cuando la radiactividad en el medio del tampón de reacción sin añadir el polipéptido de la presente invención se hace 0% y la radiactividad en el medio añadido con el polipéptido de la presente invención se hace 100%, se calcula el efecto de un compuesto de ensayo en la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción. Un compuesto de ensayo que muestra la actividad de producción de inositol trifosfato de, por ejemplo, 50% o menos puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, un agonista puede explorarse de forma similar supervisando un aumento de la producción de inositol trifosfato cuando se añade solamente el compuesto de ensayo.

(7) Se inserta un ADN que contiene TRE (elemento de respuesta a TPA) en un sitio de multiclonación cadena arriba de un gen de luciferasa en Vector PicaGene Básico o Vector PicaGene Potenciador (Toyo Ink Mfg. Co., Ltd.), que se convierte en un vector de gen indicador-TRE. En una célula transfectada con vector de gen indicador TRE, la estimulación acompañada por un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular induce la expresión de gen luciferasa mediado por TRE y después la producción de proteína luciferasa. Es decir, ensayando la actividad luciferasa, pueden detectarse cambios en el nivel de iones de calcio en la célula transfectada con vector de gen indicador-TRE. Utilizando las células transfectadas con vector de gen indicador-TRE en las que se expresa la proteína de la presente descripción, puede explorarse un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción. El método de exploración se describe específicamente posteriormente.

Las células transfectadas con gen indicador-TRE en las que se expresa la proteína de la presente descripción se inoculan en una placa de 24 pocillos en 5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo seguido de incubación durante 48 horas. Después de que las células se hayan lavado en tampón de Hanks (pH 7,4) complementado con BSA 0,05% y HEPES 20 mM, se añaden el polipéptido de la presente invención 10 nM o el polipéptido de la presente invención 10 nM y un compuesto de ensayo a las células, seguido de reacción a 37 °C durante 60 minutos. Las células se disuelven en un agente de lisis celular para PicaGene (Toyo Ink Mfg. Co., Ltd.) y se añade un sustrato de luminiscencia (Toyo Ink Mfg. Co., Ltd.) al lisado. Se mide la luminiscencia por luciferasa mediante un luminómetro, un contador de centelleo líquido o un contador superior. Los efectos de un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción pueden medirse comparando la cantidad de luminiscencia por luciferasa con el caso en el que se añade el polipéptido de la presente invención. En este caso, la cantidad de luminiscencia aumenta con un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular mediante administración del polipéptido de la presente invención y puede seleccionarse un compuesto que suprime el aumento como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, también puede explorarse un agonista supervisando un aumento de la luminiscencia del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención, cuando se administra solamente un compuesto de ensayo.

Además de luciferasa, pueden emplearse como el gen indicador fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa o β-galactosidasa. La actividad enzimática de productos génicos de estos genes indicadores puede ensayarse fácilmente como se describe posteriormente, usando kits de ensayo disponibles en el mercado. La actividad fosfatasa alcalina, la actividad cloranfenicol acetiltransferasa y la actividad β-galactosidasa pueden ensayarse usando, por ejemplo, Lumi-Phos 530 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kit de Ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa FAST CAT fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y Aurora Gal-XE fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., respectivamente.

(8) En la célula en la que se expresa la proteína de la presente descripción en respuesta al polipéptido de la presente invención, se observa crecimiento por activación de MAP quinasa. Este crecimiento puede ensayarse por la actividad MAP quinasa, captación de timidina o recuento celular (MTT, etc.). Utilizando esto, puede explorarse un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción.

La actividad MAP quinasa puede ensayarse fácilmente añadiendo el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo a las células, obteniendo una fracción de MAP quinasa de un lisado celular por inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-MAP quinasa y usando después, por ejemplo, Kit de Ensayo de MAP Quinasa fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y γ-[<sup>32</sup>P]-ATP. La actividad de captación de timidina puede ensayarse inoculando las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción, añadiendo el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo a las células, añadiendo además [metil-<sup>3</sup>H]-timidina, provocando lisis celular y después contando la radiactividad de la timidina marcada captada en las células con un contador de centelleo líquido.

El crecimiento de células en las que se expresa la proteína de la presente descripción también puede determinarse inoculando las células expresadas, añadiendo al polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo, añadiendo además MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio), permitiendo que MTT se capte en las células para convertirlo de este modo a MTT formazán, provocando

lisis celular con isopropanol que se hace ácido con ácido clorhídrico, y midiendo después la absorción a 570 nm.

El método para explorar un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción utilizando la actividad de captación de timidina marcada se describe específicamente posteriormente.

5 Las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción se inoculan en una placa de 24 pocillos en 5000 células/pocillo seguido de incubación durante un día. A continuación, las células se incuban en un medio sin suero durante 2 días para llevar las células a privación. Se añaden el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo a las células. Después de incubación durante 24 horas, se añade [metil-<sup>3</sup>H] timidina en 0,015 MBq/pocillo seguido de incubación durante 6 horas. Después de lavar las células con PBS(-), se añade metanol a las células. Se permite que la mezcla se mantenga durante 10 minutos. A continuación, se añade ácido tricloroacético 5% y se permite que la mezcla se mantenga durante 15 minutos. Las células inmovilizadas se lavan cuatro veces con agua destilada. Después de lisis celular con una solución de hidróxido sódico 0,3 N, se mide la radiactividad en el lisado con un contador de centelleo líquido. Pueden determinarse los efectos de un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción comparando con un aumento de la radiactividad por captación de timidina cuando se administra solamente el polipéptido de la presente invención. En este caso, un compuesto que suprime un aumento de la radiactividad administrando el polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, puede explorarse un agonista supervisando un aumento de la radiactividad del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención cuando se administra solamente el compuesto de ensayo.

(9) Cuando el polipéptido de la presente invención se añade a las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción, el canal K se activa de modo que los iones K<sup>+</sup> presentes dentro de las células salen fuera de la célula. Puesto que los iones Rb<sup>+</sup> en los elementos relacionados con iones K<sup>+</sup> fluyen fuera de las células a través del canal de K sin distinguirse de iones K<sup>+</sup>, se añade Rb marcado ([<sup>86</sup>Rb]) a las células para permitir captación intracelular del isótopo. Después, se mide la salida de [<sup>86</sup>Rb] que fluye fuera por estimulación del polipéptido A de la presente invención para ensayar la acción del polipéptido A de la presente invención. Se describe específicamente posteriormente el método para explorar el compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción utilizando la actividad de salida de [<sup>86</sup>Rb].

30 Dos días después de inoculación en 24 pocillos, las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción se mantienen calientes durante 2 horas en un medio complementado con 1 mCi/ml de <sup>86</sup>RbCl. El medio se lava exhaustivamente para retirar completamente <sup>86</sup>RbCl en el líquido exterior. Se añade el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo a las células. El líquido exterior se recupera 30 minutos después y la radiactividad se cuenta con contador  $\gamma$ . Los efectos de un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción pueden ensayarse comparando un aumento de la radiactividad por salida de [<sup>86</sup>Rb] con el caso en el que se administra solamente el polipéptido de la presente invención. En este caso, un compuesto que suprime un aumento de la radiactividad por administración del polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, puede explorarse un agonista también supervisando un aumento de la radiactividad del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención cuando se administra solamente el compuesto de ensayo.

(10) La actividad del polipéptido de la presente invención puede ensayarse midiendo el pH extracelular (tasa de acidificación) que cambia en las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción, en respuesta al polipéptido de la presente invención, usando un dispositivo Cytosensor (Molecular Device Co.). El método para explorar un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción a través de la medición del pH extracelular usando el dispositivo Cytosensor se describe específicamente posteriormente.

50 Las células en las que se expresa la proteína de la presente descripción se cultivan durante una noche en una cápsula para el dispositivo Cytosensor, que se dispone en una cámara del dispositivo para calentar a reflujo medio RPMI 1640 que contiene BSA 0,1% (fabricado por Molecular Device) durante aproximadamente 2 horas hasta que el pH extracelular se hace estable. Después de que el pH se haga estable, el medio que contiene el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo se calienta a reflujo en las células. Se ensayan los cambios de pH en el medio provocados por el reflujo. Los efectos de un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción pueden ensayarse comparando cambios de pH extracelular en las células, en las que se expresa la proteína de la presente descripción, con el caso en el que se administra solamente el polipéptido de la presente invención. En este caso, un compuesto que suprime cambios de pH extracelular administrando el polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, un agonista también puede explorarse supervisando cambios de pH extracelular del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención cuando se administra solamente

el compuesto de ensayo.

(11) En *Saccharomyces Cerevisiae*, el receptor de feromonas sexuales STe2 de tipo acoplamiento  $\alpha$  haploide (MAT $\alpha$ ) se acopla a Gpa1 de proteína G para activar MAP quinasa en respuesta al factor de acoplamiento  $\alpha$  de feromonas sexuales, por lo que se activan Far1 (detención del ciclo celular) y activador de la transcripción Ste12. Ste12 induce la expresión de una amplia diversidad de proteínas, incluyendo FUS 1 que se asocia con acoplamiento. Por otro lado, el regulador Sst2 actúa para inhibir el proceso anterior. En este sistema, se ha realizado un intento de construir un sistema de ensayo para la reacción de un agonista con la proteína de la presente descripción, que implica preparar una levadura transfectada con un gen que codifica la proteína de la presente descripción, activar el sistema de transducción de señal intracelular en la levadura por estimulación agonista a la proteína de la presente descripción y usar el crecimiento resultante, etc. como un in indicador (Pausch, M. H., Trends in Biotechnology, 15, 487-494, 1997). Utilizando este sistema puede explorarse levadura transfectada con el gen que codifica la proteína de la presente descripción, el compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción.

Se retiran Ste2 en levadura MAT $\alpha$  y un gen que codifica Gpa1 y en su lugar se introduce un gen que codifica la proteína de la presente descripción y un gen que codifica proteína fusionada Gpa1-Gai2. Se elimina un gen que codifica Far para no provocar detención del ciclo celular y se elimina un gen que codifica Sst para aumentar previamente la sensibilidad en respuesta al polipéptido de la presente invención. Además, se introduce gen FUS1-HIS3, que está ligado a FUS 1 con el gen de biosíntesis de histidina HIS3. La ingeniería genética recombinante anterior puede realizarse fácilmente, por ejemplo, por el método presentado por Price, *et al.* (Price, L. A. *et al.*, Molecular and Cellular Biology, JL5, 6188-6195 (1995)), usando un gen que codifica la proteína de la presente descripción en lugar del gen de receptor de somatostatina de tipo 2 (SSTR2). La levadura transformante construida de este modo es sensible al polipéptido de la presente invención como un ligando para la proteína de la presente descripción con una alta sensibilidad de modo que se activa MAP quinasa y se sintetiza una enzima de biosíntesis de histidina. Después, el transformante se hace capaz de crecer en un medio deficiente en histidina. Utilizando esto, puede supervisarse una respuesta de la levadura en la que se expresa la proteína de la presente descripción usando crecimiento de la levadura en un medio deficiente en histidina como un indicador. Se describe posteriormente el método para explorar un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción.

La levadura producida de este modo como se ha descrito anteriormente, en la que se expresa la proteína de la presente descripción, se incuba durante una noche en medio líquido de síntesis completa y después se añade a un medio de agar disuelto sin histidina en una concentración de  $2 \times 10^7$  células/ml. La levadura se siembra después en una placa de Petri cuadrada de 9 x 9 cm. Después de que se solidifique el agar, se sitúa un papel de filtro esterilizado impregnado con el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo en la superficie del agar, seguido de incubación a 30 °C durante 3 días. Los efectos de un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción pueden ensayarse comparando el crecimiento de levadura alrededor del papel de filtro con el caso de administración única del polipéptido de la presente invención. En este caso, el compuesto que suprime el crecimiento de la levadura por administración del polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, también puede explorarse un agonista supervisando el crecimiento de la levadura del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención. Además, un compuesto que altera la unión del polipéptido de la presente invención con la proteína de la presente descripción también puede ensayarse añadiendo previamente el polipéptido de la presente invención al medio de agar, impregnando un papel de filtro esterilizado con un compuesto de ensayo solamente, incubando y supervisando que el crecimiento de la levadura sobre la superficie completa de una placa de Petri está afectado en la periferia del papel de filtro.

(12) Cuando se inyecta ARN génico que codifica la proteína de la presente descripción en oocitos de *Xenopus laevis* y se estimula por el polipéptido de la presente invención, el nivel de ión  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta para provocar una corriente de cloruro activado por calcio, que puede tomarse como fluctuación en el potencial de membrana (lo mismo se aplica al caso en el que se produce fluctuación en el gradiente de nivel de ión de K). Supervisando esta reacción inducida por el polipéptido de la presente invención en oocitos de *Xenopus laevis* en los que se transfecta el gen que codifica la proteína de la presente descripción, puede explorarse un compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción.

Se anatomiza un *Xenopus laevis* hembra anestesiado sumergiéndolo en agua helada para retirar los oocitos. Los grupos de oocitos se tratan con colagenasa (0,5 mg/ml) disuelta en una solución de MBS (NaCl 88 mM, KCl 1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,41 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,33 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,82 mM,  $\text{NaHCO}_3$  2,4 mM, HEPES 10 mM; pH 7,4) a 19 °C durante 1 a 6 horas a 150 rpm, hasta que se sueltan los oocitos. Se realiza lavado 3 veces reemplazando el líquido exterior con la solución de MBS seguido de microinyección de ARNm (50 ng/50 nl) que codifica la proteína de la presente descripción con un micromanipulador. El ARNm que codifica la proteína de la presente descripción puede prepararse a partir de tejidos o células, o puede transcribirse a partir de plásmidos *in vitro*. Los oocitos se incuban en la solución de MBS a 20 °C durante 3 días. Los oocitos se sitúan en un hueco de un dispositivo de fijación de voltaje, en el que se perfunde continuamente solución de Ringer, y que atraviesa las células con microelectrodos de vidrio para fijación de voltaje y microelectrodos de vidrio para registro de potencial, en el que el electrodo (-) se sitúa fuera

de los oocitos. Cuando el potencial de retención se estabiliza, la solución de Ringer que contiene el polipéptido de la presente invención o el polipéptido de la presente invención y un compuesto de ensayo se perfunde para registrar cambios en el potencial. Los efectos del compuesto que altera los propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción pueden determinarse comparando cambios en el potencial de membrana celular de los oocitos de *Xenopus laevis* en los que se transfecta el gen que codifica la proteína de la presente descripción, conteniendo el caso en el que se perfunde solamente la solución de Ringer el polipéptido de la presente invención. En este caso, un compuesto que suprime los cambios del potencial de membrana celular mediante administración del polipéptido de la presente invención puede seleccionarse como una sustancia candidata capaz de alterar las propiedades de unión de la proteína de la presente descripción y el polipéptido de la presente invención. Por otro lado, un agonista puede explorarse también supervisando los cambios de potencial de membrana celular del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención en el que se administra solamente el compuesto de ensayo.

En este sistema, la cantidad de alteración puede aumentarse introduciendo ARN poli(A)<sup>+</sup> de diversos genes de proteína G de modo que se hace más fácil supervisar la reacción. Además, la reacción puede ensayarse coinyectando ARN de poli(A)<sup>+</sup> a un gen para la proteína tal como aequorina que emite luz en presencia de Ca<sup>2+</sup> y supervisando la emisión de luz, no los cambios en potencial de membrana.

(Kit para explorar el compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción)

El kit para explorar el compuesto o su sal que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción comprende la proteína de la presente descripción, una célula que contiene la proteína de la presente descripción, o una fracción de membrana de la célula que contiene la proteína de la presente descripción, y el polipéptido de la presente invención.

Los ejemplos del kit de exploración de la presente invención incluyen lo siguiente.

#### 1. Reactivo para exploración

(a) Tampón de ensayo y tampón de lavado

Solución Salina Equilibrada de Hanks (fabricada por Gibco Co.) complementada con albúmina de suero bovino 0,05% (Sigma Co.).

La solución se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,45 µm y se almacena a 4 °C. Como alternativa, la solución puede prepararse en el momento de uso.

(b) Preparación convencional de la proteína de la presente descripción

Se subcultivan células CHO en las que se expresa la proteína de la presente descripción en una placa de 12 pocillos a la tasa de  $5 \times 10^5$  células/pocillo y después se cultiva a 37 °C en CO<sub>2</sub> 5% y aire 95% durante 2 días.

(c) Ligando marcado

El polipéptido de la presente invención marcado con [<sup>3</sup>H], [<sup>125</sup>I], [<sup>14</sup>C], [<sup>35</sup>S] disponibles en el mercado, etc.

El péptido marcado se disuelve en un disolvente o tampón adecuado, y la solución se almacena a 4 °C o -20 °C, que se diluye a 1 µM con un tampón de ensayo en el momento del uso.

(d) Solución de ligando convencional

El polipéptido de la presente invención se disuelve en PBS complementado con albúmina de suero bovino 0,1% (fabricado por Sigma) en una concentración de 1 mM y la solución se almacena a -20 °C.

2. Método de ensayo

(a) Las células se cultivan en una placa de cultivo tisular de 12 pocillos para expresar la proteína de la presente descripción. Después de lavar las células dos veces con 1 ml del tampón de ensayo, se añaden 490 µl del tampón de ensayo a cada pocillo.

(b) Después de añadirse 5 µl de una solución de compuesto de ensayo de  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  M, se añaden 5 µl de una forma marcada del polipéptido de la presente invención al sistema seguido de reacción a temperatura ambiente durante una hora. Para determinar la cantidad de unión no específica, se añade el polipéptido de la presente invención de  $10^{-3}$  M en una cantidad de 5 µl, en lugar del compuesto de ensayo.

(c) La mezcla de reacción se retira y se lava 3 veces con 1 ml cada una del tampón de lavado. El polipéptido marcado de la presente invención unido a las células se disuelve en NaOH 0,2 N-SDS 1% y se mezcla con 4 ml de un centelleador líquido A (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

(d) La radiactividad se mide usando un contador de centelleo líquido (fabricado por Beckmann) y se calcula el PMB (porcentaje de la unión máxima) de acuerdo con la siguiente ecuación:

Fórmula:

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

5 en la que:

PMB: porcentaje de la unión máxima  
 B: valor cuando se añade una muestra  
 NSB: unión no específica  
 B<sub>0</sub>: unión máxima

10 El compuesto o su sal, que se obtiene por el método de exploración o el kit de exploración de la presente invención, es un compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción (que inhibe o promueve la unión). Específicamente, estos compuestos son compuestos que muestran la actividad estimuladora celular mediada por la proteína de la presente descripción (llamados agonistas),  
 15 o compuestos que no muestran la actividad estimuladora celular (llamados antagonistas). Los ejemplos de tales compuestos incluyen péptidos, proteínas, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación y similares. Estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o compuestos públicamente conocidos.

Para evaluar si el compuesto es un agonista o un antagonista de la proteína de la presente descripción descrita anteriormente, puede realizarse un método específico para la evaluación de acuerdo con (i) o (ii) posterior.

20 (i) De acuerdo con los métodos de exploración (1) a (3) descritos anteriormente, el ensayo de unión se lleva a cabo para obtener compuesto que altera las propiedades de unión del polipéptido de la presente invención y la proteína de la presente descripción (especialmente, el compuesto que inhibe la unión). Se determina después si el compuesto tiene la actividad estimuladora celular anterior mediada por la proteína de la presente descripción. El compuesto o su sal que tiene la actividad estimuladora celular es un agonista para la proteína de la presente descripción, mientras que el compuesto o su sal que no tiene dicha actividad es un antagonista para la proteína de la presente descripción.  
 25

(ii) (a) Se pone en contacto un compuesto de ensayo con una célula que contiene la proteína de la presente descripción y la actividad estimuladora celular mediada por la proteína de la presente descripción. El compuesto o su sal que tiene la actividad estimuladora celular es un agonista.

30 (b) La actividad estimuladora celular mediada por la proteína de la presente descripción se ensaya en el caso en el que un compuesto que activa la proteína de la presente descripción (por ejemplo, el polipéptido de la presente invención o un agonista de la proteína de la presente descripción, etc.) se pone en contacto con una célula que contiene la proteína de la presente descripción y en el caso en el que un compuesto que activa la proteína de la presente descripción y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con una célula que contiene la proteína de la presente descripción, y comparando las propiedades. El compuesto o su sal capaz de reducir la actividad estimuladora celular mediada por el compuesto que activa la proteína de la presente descripción es un antagonista.  
 35

El agonista tiene la misma acción que la actividad fisiológica poseída por el polipéptido de la presente invención, y es útil como un medicamento seguro y poco tóxico del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención.

Por el contrario, el antagonista puede suprimir la actividad fisiológica poseída por el polipéptido de la presente invención, y es útil como un medicamento seguro y poco tóxico que suprime la actividad del receptor.

40 [2] Medicamento que comprende el polipéptido, etc. de la presente invención

El polipéptido A1 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad contráctil del tracto digestivo, actividad contráctil del músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora del consumo de alimentos, actividad supresora de liberación de prolactina, etc. y se asocia con los avances y retardos de fase de ritmos circadianos. Por lo tanto, el polipéptido A1 de la presente invención, el polinucleótido que codifica el polipéptido A1 de la presente invención y el  
 45 compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido A1 de la presente invención son útiles como agentes seguros y poco tóxicos para prevenir/tratar, por ejemplo, hipotensión, obesidad (por ejemplo, mastocitosis maligna, obesidad exógena, obesidad hiperinsular, obesidad hiperplásmica, adiposidad hipofisario, obesidad hipoplásmica, obesidad hipotiroidea, obesidad hipotalámica, obesidad sintomática, obesidad infantil, obesidad de la parte superior del cuerpo, obesidad alimentaría, obesidad hipogonadal, mastocitos sistémica, obesidad simple, obesidad central, etc.), hiperfagia, trastornos del sueño [por ejemplo, insomnio primario, trastornos de los ritmos circadianos (por ejemplo, cambio de las condiciones físicas provocado por trabajo en tres turnos, síndrome de cambio de zona horaria (desfase horario), etc.)], letargo, esterilidad, depresión de temporada, disfunción reproductora, enfermedades endocrinas, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, diversos trastornos relacionados con la edad, trastorno circulatorio cerebral (por ejemplo, apoplejía, etc.), lesión craneal, lesión de la médula espinal, epilepsia, ansiedad,  
 50 depresión, trastorno maniaco depresivo, esquizofrenia, alcoholismo, enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis,  
 55

arritmia, síndrome premenstrual, glaucoma, cáncer, SIDA, diabetes mellitus, etc., preferentemente, hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, esterilidad, etc. El anticuerpo para el polipéptido A1 de la presente invención y el compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido A1 de la presente invención son útiles como agentes seguros y poco tóxicos para prevenir/tratar, por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, enfermedad inmunitaria/inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis deformante, etc.), etc., preferentemente hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.

El polipéptido A2 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad liberadora de prolactina, etc. Por lo tanto, el polipéptido A2 de la presente invención, el polinucleótido que codifica el polipéptido A2 de la presente invención y el compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido A2 de la presente invención son útiles como agentes seguros y poco tóxicos para prevenir/tratar, por ejemplo, deficiencia en la liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc., preferentemente síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc. El anticuerpo para el polipéptido A2 de la presente invención y el compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido A2 de la presente invención son útiles como agentes seguros y poco tóxicos para prevenir/tratar, por ejemplo, tumor de hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactoreo, acromegalia, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastornos de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc., preferentemente esterilidad, hipotiroidismo, etc.; (preferentemente, como un agente supresor de producción de prolactina).

El polipéptido B de la presente descripción tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. Por lo tanto, el polipéptido B de la presente descripción, el polinucleótido que codifica el polipéptido B de la presente descripción y el compuesto o su sal que promueve la actividad del péptido B de la presente descripción son útiles como agentes seguros y poco tóxicos para prevenir/tratar, por ejemplo, deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc., preferentemente síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc. El anticuerpo para el polipéptido B de la presente descripción y el compuesto o su sal que inhibe la actividad de polipéptido B de la presente descripción son útiles como agentes seguros y poco tóxicos para prevenir/tratar, por ejemplo, tumor de hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactoreo, acromegalia, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastorno de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc., preferentemente esterilidad, hipotiroidismo, etc.; (preferentemente, como un agente supresor de producción de prolactina).

El agonista de la proteína de la presente descripción puede usarse, por ejemplo, como un agente para prevenir/tratar hipotensión; un vasoconstrictor local, un estimulante de contracción uterina; un agente para aliviar y prevenir/tratar diversas enfermedades asociadas con disfunción contráctil uterina incluyendo inercia uterina, hemorragia por atonía uterina, pre y post expulsión de placenta, subinvolución del útero, aborto inducido, inducción de alumbramiento, detención del parto, incompetencia cervical, inversión del útero, placenta retenida y membranas del óvulo retenidas, hemorragia postparto, prolapso genital femenino, esterilidad, cuidados maternos durante embarazo múltiple, presentación anómala, dismenorrea, aborto espontáneo, endometriosis, enfermedad inflamatoria crónica del útero, mioma uterino, anomalías uterinas, adenomiosis uterina, laceración uterocervical, trastorno de estrés post traumático, etc. El antagonista de la proteína de la presente descripción es útil como un agente para prevenir/tratar hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia renal aguda, trastornos relacionados con el estrés [por ejemplo (1) trastornos cardiovasculares (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio, arritmia, etc.), (2) trastornos respiratorios (por ejemplo, asma bronquial, síndrome de hiperventilación, etc.), (3) trastornos musculoesqueléticos (por ejemplo, artritis reumatoide, lumbago, migrañas, cefalea de tensión, etc.), (4) diabetes mellitus, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, dolor crónico, supresión inmune, trastornos alimentarios (por ejemplo, úlcera gástrica, colitis ulcerosa, etc.)], etc.; un agente supresor de la contracción uterina; un agente para aliviar y prevenir/tratar diversos trastornos asociados con contracciones uterinas excesivas, incluyendo parto hipertónico, contracciones falsas, embarazo prolongado, contracciones uterinas tónicas, sufrimiento fetal, ruptura uterina, laceración cervical, parto prematuro, mioma uterino, anomalías uterinas, adenomiosis uterina, anomalías en la fuerza expulsiva, enfermedad inflamatoria crónica del útero, cuidados maternos durante embarazo múltiple, presentación anómala, síndrome de Prader-Willi, dismenorrea, etc.

Como sales del polipéptido de la presente invención, se usa el compuesto que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de la presente invención, el compuesto que puede obtenerse usando el método de exploración o kit de exploración descrito anteriormente, o similares, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos incluyen sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con sales orgánicas, sales con aminoácidos básicos o ácidos, etc.

Los ejemplos preferidos de las sales con bases inorgánicas incluyen sales metálicas alcalinas tales como sales de sodio, sales de potasio, etc.; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio, etc.; sales de aluminio, sales de amonio y similares.

Los ejemplos preferidos de las sales con bases orgánicas incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, diciticlohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, etc.

Los ejemplos preferidos de las sales con ácidos inorgánicos incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc.

5 Los ejemplos preferidos de las sales con ácidos orgánicos incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, etc.

Los ejemplos adecuados de las sales con aminoácidos básicos incluyen sales con arginina, lisina, ornitina, etc. Los ejemplos preferidos de las sales con aminoácidos ácidos incluyen sales con ácido aspártico, ácido glutámico, etc.

10 Cuando el polipéptido de la presente invención, el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, el compuesto que promueve o inhibe el polipéptido de la presente invención, el anticuerpo para el polipéptido de la presente invención, el compuesto o sus sales que pueden obtenerse usando el método de exploración o kit de exploración de la presente invención se usan como los medicamentos descritos anteriormente, se pueden formular de una manera convencional. Por ejemplo, pueden administrarse por vía oral como comprimidos recubiertos con azúcar o con recubrimiento entérico si es necesario, cápsulas, elixires, microcápsulas, etc., o por vía parenteral en forma de inyecciones tales como soluciones o suspensiones estériles en agua o en soluciones farmacéuticamente aceptables distintas de agua. Por ejemplo, el compuesto o sus sales pueden mezclarse con vehículos, agentes saporíferos, excipientes, vehículos, conservantes, estabilizadores, aglutinantes, etc. en una forma de dosificación unitaria requerida para práctica farmacéutica generalmente aceptada para preparar preparaciones farmacéuticas. La cantidad de principios activos en estas preparaciones se ajusta para obtener dosis apropiadas dentro de intervalos específicos.

20 Los aditivos miscibles con comprimidos, cápsulas, etc. incluyen un aglutinante tal como gelatina, almidón de maíz, tragacanto y goma arábica, un excipiente tal como celulosa cristalina, un agente de hinchamiento tal como almidón de maíz, gelatina y ácido algínico, un lubricante tal como estearato de magnesio, un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa y sacarina, y un agente saporífero tal como menta, aceite de *Gaultheria adeno-thrix* y cereza. Cuando la dosificación unitaria está en forma de una cápsula, pueden usarse además vehículos líquidos tales como aceites y grasas junto con los aditivos descritos anteriormente. Una composición estéril para inyección puede formularse de una manera convencional usada para preparar composiciones farmacéuticas, por ejemplo, disolviendo o suspendiendo los principios activos en un vehículo tal como agua para inyección con un aceite vegetal de origen natural tal como aceite de sésamo y aceite de coco, etc. para preparar la composición farmacéutica.

30 Los ejemplos de un medio acuoso para inyección incluyen solución salina fisiológica y una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manitol, cloruro sódico, etc.) y pueden usarse en combinación con una ayuda de disolución apropiada tal como un alcohol (por ejemplo, etanol, etc.), un polialcohol (por ejemplo propilenglicol, polietilenglicol, etc.), un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80™, HCO-50, etc.) o similares. Los ejemplos del medio oleoso incluyen aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que también pueden usarse en combinación con una ayuda de disolución tal como bencil benzoato, alcohol bencílico, etc.

35 Estas preparaciones pueden formularse además con un tampón (por ejemplo, tampón de fosfato, tampón de acetato sódico, etc.), un lenitivo (por ejemplo, cloruro de benzalconio, hidrocloreuro de procaína, etc.), un estabilizador (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol, etc.), un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico, fenol, etc.), un antioxidante, etc. El líquido preparado de este modo para inyección normalmente se carga en una ampolla apropiada.

40 La preparación farmacéutica obtenida de este modo es segura y poco tóxica, y por lo tanto puede administrarse a mamíferos de sangre caliente (por ejemplo, ser humano, cobaya, rata, ratón, cerdo, oveja, bovino, mono, perro o ave), etc.

45 La dosis del compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido A1 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipotensión generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipotensión en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, generalmente es ventajoso administrar el compuesto o su sal en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

55 La dosis del compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido A2 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de

aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administra, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, generalmente es ventajoso administrar el compuesto o su sal en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido B de la presente descripción puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es generalmente ventajoso administrar el compuesto o su sal en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede usarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido A1 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipertensión generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipertensión en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es generalmente ventajoso administrar en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido A2 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, este se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con esterilidad generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con esterilidad en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, generalmente es ventajoso administrar en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido B de la presente descripción puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, este se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con esterilidad generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con esterilidad en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es generalmente ventajoso administrar en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del compuesto (especialmente el antagonista) o su sal, que se obtiene usando el método de exploración o kit de exploración de la presente invención, puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto o su sal se administra por vía oral, se administra al paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con hipertensión generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con hipertensión en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es ventajoso administrar el compuesto o su sal en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

En lo sucesivo en la presente memoria, el medicamento que comprende el polipéptido de la presente invención, el medicamento que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención y el medicamento que comprende el anticuerpo para el polipéptido de la presente invención se describe de forma más específica.

(Medicamento que comprende el polipéptido de la presente invención)

5 El polipéptido A1 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad contráctil del tracto digestivo, actividad contráctil del músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora del consumo de alimentos, actividad supresora de liberación de prolactina, etc. y se asocia con los avances y retardos de fase de los ritmos circadianos. Por lo tanto, el polipéptido A1 de la presente invención es útil como agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, hipotensión, obesidad (por ejemplo, mastocitosis maligna, obesidad exógena, obesidad hiperinsulinémica, 10 obesidad hiperplásica, obesidad hipofisaria, obesidad hipoplásica, obesidad hipotiroidea, obesidad hipotalámica, obesidad sintomática, obesidad infantil, obesidad de la parte superior del cuerpo, obesidad alimentaria, obesidad hipogonadal, mastocitosis sistémica, obesidad sencilla, obesidad central, etc.), letargo, síndrome de cambio de zona horaria, esterilidad, etc.

15 El polipéptido A2 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad de liberación de prolactina, etc. y es útil como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.

El polipéptido B de la presente descripción posee, por ejemplo, una actividad de liberación de prolactina, etc. y es útil como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.

Las sales del polipéptido de la presente invención incluyen las sales descritas anteriormente y se prefieren las descritas anteriormente.

20 Cuando se usa el polipéptido de la presente invención en el agente preventivo/terapéutico descrito anteriormente, el polipéptido se usa provechosamente en un nivel de pureza de al menos 90%, preferentemente al menos 95%, más preferentemente al menos 98% y más preferentemente al menos 99%.

25 Cuando se usa el polipéptido de la presente invención como el medicamento anteriormente mencionado (agente preventivo/terapéutico, etc.), el polipéptido puede prepararse en preparaciones farmacéuticas por métodos públicamente conocidos, incluyendo los métodos descritos anteriormente.

30 El polipéptido de la presente invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos que pueden recubrirse con azúcar, si es necesario, cápsulas, elixires, microcápsulas, etc., o por vía parenteral en forma de inyecciones tales como soluciones o suspensiones estériles en agua o en soluciones farmacéuticamente aceptables distintas de agua. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención puede mezclarse con vehículos, agentes saporíferos, excipientes, vehículos, conservantes, estabilizadores, aglutinantes, etc. en una forma de dosificación unitaria generalmente aceptada. El principio activo en la preparación se controla en una dosis tal que se obtiene una dosis apropiada dentro del intervalo específico dado.

35 Los aditivos miscibles con comprimidos, cápsulas, etc. incluyen un aglutinante tal como gelatina, almidón de maíz, tragacanto y goma arábiga, un excipiente tal como celulosa cristalina, un agente de hinchamiento tal como almidón de maíz, gelatina y ácido alginico, un lubricante tal como estearato de magnesio, un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa y sacarina, un agente saporífero tal como pimienta, aceite de *Gaultheria adenothrix* y cereza, etc. Cuando la dosificación unitaria está en forma de una cápsula, pueden usarse además vehículos líquidos tales como aceites y grasas junto con los aditivos descritos anteriormente. Una composición estéril para inyección puede formularse de una manera convencional usada para realizar preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, disolviendo 40 o suspendiendo los principios activos en un vehículo tal como agua para inyección con un aceite vegetal de origen natural tal como aceite de sésamo y aceite de coco, etc. para preparar las preparaciones farmacéuticas.

45 Los ejemplos de un medio acuoso para inyección incluyen solución salina fisiológica y una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manitol, cloruro sódico, etc.), o similares y pueden usarse en combinación con una ayuda de disolución apropiada tal como un alcohol (por ejemplo, etanol, etc.), un polialcohol (por ejemplo propilenglicol, polietilenglicol, etc.), un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80™, HCO-50, etc.) o similares. Los ejemplos del medio oleoso incluyen aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que también pueden usarse en combinación con una ayuda de disolución tal como bencil benzoato, alcohol bencílico, etc. El polipéptido puede formularse además junto con un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón de acetato sódico, etc.), un lenitivo (por ejemplo, cloruro de benzalconio, hidrocloreuro de procaína, etc.), un 50 estabilizador (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol, etc.), un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico, fenol, etc.), un antioxidante, etc. El líquido preparado de este modo para inyección se carga normalmente en una ampolla apropiada.

55 Puesto que la preparación farmacéutica obtenida de este modo es segura y poco tóxica, se puede administrar a seres humanos u otros mamíferos de sangre caliente (por ejemplo, ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, caballo, ave, gato, perro, mono, chimpancé, etc.).

La dosis del polipéptido A1 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando se administra el polipéptido A1 por vía oral, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipotensión generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, las condiciones, vía de administración, etc. En general, cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipotensión en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, se administra provechosamente una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del polipéptido A2 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando se administra por vía oral el polipéptido A2, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, las condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es generalmente ventajoso administrar el polipéptido A2 en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

La dosis del polipéptido B de la presente descripción puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Por ejemplo, cuando se administra por vía oral el polipéptido B, se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia generalmente en una dosis de aproximadamente 0,1 a 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 300 mg y más preferentemente de aproximadamente 3,0 a 50 mg. En la administración parenteral, su dosis única puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, las condiciones, vía de administración, etc. Cuando se administra al paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es generalmente ventajoso administrar el polipéptido B en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente convertida por cada 60 kg de peso.

(Medicamento que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención)

El polipéptido A1 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad contráctil del tracto digestivo, actividad contráctil del músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora del consumo de alimentos, actividad supresora de la liberación de prolactina, etc. y se asocia con los avances y retardos de fase de los ritmos circadianos. Por lo tanto, el polinucleótido que codifica el polipéptido A1 de la presente invención es útil como un agente poco tóxico y seguro, para prevenir/tratar, por ejemplo, hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, esterilidad, etc.

El polipéptido A2 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad liberadora de prolactina, etc. Por lo tanto, el polinucleótido que codifica el polipéptido A2 de la presente invención es útil como un agente poco tóxico y seguro para prevenir/tratar síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.

El polipéptido B de la presente descripción posee, por ejemplo, una actividad de liberación de prolactina, etc. Por lo tanto, el polinucleótido que codifica el polipéptido B de la presente descripción es útil como un agente poco tóxico y seguro para prevenir/tratar síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.

Cuando un paciente tiene un nivel reducido de, o es deficiente en el polipéptido de la presente invención en su cuerpo, el polinucleótido de la presente invención puede actuar para cumplir el papel del polipéptido de la presente invención de forma suficiente o apropiada para el paciente, (i) administrando el polinucleótido de la presente invención al paciente para expresar el polipéptido de la presente invención en el cuerpo, o (ii) insertando el polinucleótido de la presente invención en una célula, expresando el polipéptido de la presente invención y después transportando la célula al paciente, o similares.

Cuando el polinucleótido de la presente invención se usa como el agente preventivo/terapéutico descrito anteriormente, el polinucleótido puede prepararse en preparaciones farmacéuticas por métodos públicamente conocidos, incluyendo los métodos descritos anteriormente, que se proporcionan para administración.

Por ejemplo, el polinucleótido puede administrarse solo; o después de que el polinucleótido se inserte en un vector apropiado tal como vector de retrovirus, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, etc., el producto puede administrarse a un ser humano u otro animal de sangre caliente de una manera convencional. El polinucleótido de la presente invención también puede administrarse tal cual o con adyuvantes para ayudar a su

captación por pistola génica o a través de un catéter tal como un catéter con un hidrogel. Además, puede prepararse un vector insertado con el polinucleótido (por ejemplo, ADN) de la presente invención en preparaciones farmacéuticas del mismo modo que en el polipéptido de la presente invención descrito anteriormente, y las preparaciones pueden usarse de forma normal por vía parenteral.

- 5 Las preparaciones farmacéuticas obtenidas de este modo son seguras y poco tóxicas y pueden administrarse, por ejemplo, a seres humanos u otros animales de sangre caliente (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, conejos, aves, ovejas, cerdos, bovinos, caballos, gatos, perros, monos, etc.).

10 La dosis del polinucleótido que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido A1 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. Pero en general es de aproximadamente 0,1 a 100 mg por día para el paciente (como 60 kg de peso corporal) con hipotensión.

La dosis del polinucleótido que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido A2 de la presente invención puede variar dependiendo de las condiciones, etc. pero generalmente es de aproximadamente 0,1 a 100 mg por día para el paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia.

15 La dosis del polinucleótido que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido B de la presente descripción puede variar dependiendo de las condiciones, etc. pero generalmente es de aproximadamente 0,1 a 100 mg por día para el paciente (como 60 kg de peso corporal) con síntomas de la menopausia.

(Medicamento que comprende el anticuerpo para el polipéptido de la presente invención)

20 El polipéptido A1 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad contráctil del tracto digestivo, actividad contráctil de músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora de consumo de alimentos, actividad supresora de liberación de prolactina, etc. y se asocia con los avances y retardos de fase de ritmos circadianos. Por lo tanto, el anticuerpo para el polipéptido A1 de la presente invención es útil como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.

25 El polipéptido A2 de la presente invención tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. Por lo tanto, el anticuerpo para el polipéptido A2 de la presente invención es útil como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.

El polipéptido B de la presente descripción tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. En consecuencia, el anticuerpo para el polipéptido B de la presente descripción es útil como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.

30 Cuando se usa el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo neutralizador) de la presente invención como el medicamento descrito anteriormente (agente terapéutico/preventivo, etc.), puede usarse la molécula de anticuerpo en sí misma, o pueden usarse también fracciones F(ab')<sub>2</sub>, Fab' o Fab de la molécula de anticuerpo.

35 El agente para prevenir/tratar las enfermedades descritas anteriormente, que comprende el anticuerpo de la presente invención puede administrarse por vía oral o por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravascular, vía subcutánea, etc.) a seres humanos u otros mamíferos (por ejemplo, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono, etc.) directamente como líquido o en forma de una composición farmacéutica apropiada. Preferentemente, el agente puede administrarse en forma de vacuna de una manera convencional.

40 El anticuerpo de la presente invención puede administrarse directamente tal cual o en forma de una composición farmacéutica apropiada. La composición farmacéutica puede prepararse por métodos públicamente conocidos, incluyendo el método descrito anteriormente. Por ejemplo, la composición farmacéutica usada para administración puede contener el anticuerpo de la presente invención o sales del mismo, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacológicamente aceptable. Dicha composición farmacéutica se proporciona en la forma de dosificación adecuada para administración oral o parenteral.

45 Específicamente, la composición para administración oral incluye preparaciones sólidas o líquidas, específicamente, comprimidos (incluyendo grageas y comprimidos recubiertos de película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), jarabe, emulsiones, suspensiones, etc. Dicha composición se fabrica por métodos públicamente conocidos y puede contener un vehículo, un diluyente o excipiente usado convencionalmente en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Son ejemplos del vehículo o excipiente para comprimidos lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio, etc.

50 Son ejemplos de la composición para administración parenteral usada inyecciones, supositorios, etc. y las inyecciones pueden incluir la forma de dosificación de inyecciones intravenosas, subcutáneas, transcutáneas, intramusculares y de goteo, etc. Tales inyecciones se preparan por métodos públicamente conocidos, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo mencionado de la presente invención o sus sales en un medio líquido acuoso u oleoso estéril. Para el medio acuoso para inyección, por ejemplo, se usa solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen glucosa y otros adyuvantes, etc. Pueden usarse en combinación  
55 ayudas de disolución apropiadas, por ejemplo, alcohol (por ejemplo, etanol), polialcohol (por ejemplo, propilenglicol o

polietilenglicol), tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado)]. Para la solución oleosa, por ejemplo, se usa aceite de sésamo, aceite de soja y similares, y pueden usarse en combinación ayudas de disolución tales como bencil benzoato, alcohol bencílico, etc. El líquido preparado de este modo para inyección se carga normalmente en una ampolla apropiada. El supositorio usado para administración rectal puede prepararse mezclando el anticuerpo mencionado o sus sales con base de supositorio convencional.

La composición farmacéutica oral o parenteral descrita anteriormente se prepara provechosamente en una forma de dosificación unitaria adecuada para la dosis del principio activo. Los ejemplos de dicha forma de dosificación unitaria incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. Se prefiere que el anticuerpo descrito anteriormente esté contenido generalmente en una dosis de 5 a 500 mg por forma de dosificación unitaria, de 5 a 100 mg especialmente para inyecciones y 10 a 250 mg para otras preparaciones.

La dosis del anticuerpo para el polipéptido A1 de la presente invención varía dependiendo del sujeto al que se administre, enfermedad diana, condiciones, vía de administración, etc.; cuando se usa para el tratamiento/prevenición del paciente con, por ejemplo, hipertensión, el anticuerpo de la presente invención se administra provechosamente al paciente a través de inyección intravenosa, normalmente en una dosis única de aproximadamente 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 a 5 veces, preferentemente de aproximadamente 1 a 3 veces, por día. Para otra administración parenteral y administración oral, puede administrarse la dosis correspondiente. Cuando las condiciones son extremadamente graves, la dosis puede aumentarse dependiendo de las condiciones.

La dosis del anticuerpo para el polipéptido A2 de la presente invención varía dependiendo del sujeto al que se administre, enfermedad diana, condiciones, vía de administración, etc.; cuando se usa para el tratamiento/prevenición del paciente con, por ejemplo, esterilidad, el anticuerpo de la presente invención se administra provechosamente al paciente a través de inyección intravenosa, normalmente en una dosis única de aproximadamente 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 a 5 veces, preferentemente de aproximadamente 1 a 3 veces, por día. Para otra administración parenteral y administración oral, puede administrarse la dosis correspondiente. Cuando las condiciones son extremadamente graves, la dosis puede aumentarse dependiendo de las condiciones.

La dosis del anticuerpo para el polipéptido B de la presente descripción varía dependiendo del sujeto al que se administre, enfermedad diana, condiciones, vía de administración, etc.; cuando se usa para el tratamiento/prevenición del paciente con, por ejemplo, esterilidad, el anticuerpo de la presente invención se administra provechosamente al paciente a través de inyección intravenosa, normalmente en una dosis única de aproximadamente 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 a 5 veces, preferentemente de aproximadamente 1 a 3 veces, por día. Para otra administración parenteral y administración oral, puede administrarse la dosis correspondiente. Cuando las condiciones son extremadamente graves, la dosis puede aumentarse dependiendo de las condiciones.

[3] Agente de diagnóstico que usa el anticuerpo de la presente invención

Como se ha descrito anteriormente, el polipéptido de la presente invención puede cuantificarse con alta sensibilidad usando el anticuerpo de la presente invención. Por lo tanto, pueden diagnosticarse diversas enfermedades asociadas con el polipéptido de la presente invención usando el anticuerpo de la presente invención.

Específicamente, el polipéptido A1 de la presente invención tiene, por ejemplo, una actividad contráctil del tracto digestivo, actividad contráctil del músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora de consumo de alimentos, actividad supresora de liberación de prolactina, etc. y se asocia con los avances y retardos de fase de los ritmos circadianos. En consecuencia, cuando se detecta un nivel aumentado del polipéptido A1 de la presente invención usando el anticuerpo de la presente invención, puede diagnosticarse que se padece enfermedad, por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, enfermedad inmunitaria/inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis deformante, etc.), etc.; o es altamente probable que se padezcan estas enfermedades en el futuro. Además, cuando se detecta un nivel reducido del polipéptido A1 de la presente invención, puede diagnosticarse que se padece enfermedad tal como hipotensión, obesidad (por ejemplo, mastocitosis maligna, obesidad exógena, obesidad hiperinsulinémica, obesidad hiperplásmica, obesidad hipofisaria, obesidad hipoplásmica, obesidad hipotiroidea, obesidad hipotalámica, obesidad sintomática, obesidad infantil, obesidad de la parte superior del cuerpo, obesidad alimentaria, obesidad hipogonadal, mastocitosis sistémica, obesidad sencilla, obesidad central, etc.), hiperfagia, trastornos del sueño [por ejemplo, insomnio primario, trastornos de los ritmos circadianos (por ejemplo, cambio de las condiciones físicas provocado por trabajo de tres turnos, síndrome de cambio de zona horaria (desfase horario), etc.)], letargo, esterilidad, depresión de temporada, disfunción reproductora, enfermedades endocrinas, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, diversos trastornos relacionados con la edad, trastorno circulatorio cerebral (por ejemplo, apoplejía, etc.), lesión craneal, lesión de la médula espinal, epilepsia, ansiedad, depresión, trastorno maniaco depresivo, esquizofrenia, alcoholismo,

enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis, arritmia, síndrome premenstrual, glaucoma, cáncer, SIDA; diabetes mellitus, etc.; o es altamente probable padecer estas enfermedades en el futuro.

5 El polipéptido A2 de la presente invención tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. En consecuencia, cuando se detecta un nivel aumentado del polipéptido A2 de la presente invención usando el anticuerpo de la presente invención, puede diagnosticarse que se padece enfermedad, por ejemplo, tumor de hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactorrea, acromegalia, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastornos de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc.; o es altamente probable padecer estas enfermedades en el futuro. Además, cuando se detecta un nivel reducido del polipéptido A2 de la presente invención, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc.; o es altamente probable padecer estas enfermedades en el futuro.

15 El polipéptido B de la presente descripción tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. En consecuencia, cuando se detecta un nivel aumentado del polipéptido B de la presente descripción usando el anticuerpo de la presente invención, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, tumor de hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactorrea, hiperpituitarismo, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastorno de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc.; o es altamente probable padecer estas enfermedades en el futuro. Además, cuando se detecta un nivel reducido del polipéptido B de la presente descripción, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc.; o es altamente probable padecer estas enfermedades en el futuro.

#### [4] Agente de diagnóstico génico

25 Usando el polinucleótido (ADN) de la presente invención, por ejemplo, como una sonda, se puede detectar una anomalía (anomalía génica) del ADN o ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención en seres humanos u otro animal de sangre caliente (por ejemplo, rata, ratón, cobaya, conejo, ave, oveja, cerdo, bovino, caballo, gato, perro, mono, etc.). Por lo tanto, el polinucleótido es útil como un agente de diagnóstico génico para daños al ADN o ARNm, su mutación o expresión reducida, o expresión aumentada o sobreexpresión del ADN o ARNm.

30 El diagnóstico génico descrito anteriormente usando el ADN de la presente invención puede realizarse, por ejemplo, por hibridación de Northern públicamente conocida o ensayo de PCR-SSCP (Genomics, 5, 874-879 (1989), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 2766-2770 (1989)), micromatriz de ADN, etc.

35 El polipéptido A1 de la presente invención posee, por ejemplo, una actividad contráctil de tracto digestivo, actividad contráctil del músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora del consumo de alimentos, actividad supresora de la liberación de prolactina, etc. y se asocia con los avances y retardos de fase de los ritmos circadianos. Por lo tanto, cuando se detecta sobreexpresión de un gen para el polipéptido A1, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, enfermedad inmunitaria/inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis deformante, etc.), etc. o es altamente probable que se padezcan estas enfermedades en el futuro. Además, cuando se detecta una expresión reducida del gen para el polipéptido A1 de la presente invención, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, hipotensión, obesidad (por ejemplo, mastocitosis maligna, obesidad exógena, obesidad hiperinsulinémica, obesidad hiperplásmica, obesidad hipofisaria, obesidad hipoplásmica, obesidad hipotiroidea, obesidad hipotalámica, obesidad sintomática, obesidad infantil, obesidad de la parte superior del cuerpo, obesidad alimentaria, obesidad hipogonadal, mastocitosis sistémica, obesidad sencilla, obesidad central, etc.), hiperfagia, trastornos del sueño [por ejemplo, insomnio primario, trastornos de los ritmos circadianos (por ejemplo, cambio de las condiciones físicas provocado por trabajos en tres turnos, síndrome de cambio de zona horaria (desfase horario, etc.)], letargo, esterilidad, depresión de temporada, disfunción reproductora, enfermedades endocrinas, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, diversos trastornos relacionados con la edad, trastorno circulatorio cerebral (por ejemplo, apoplejía, etc.), lesión craneal, lesión de la médula espinal, epilepsia, ansiedad, depresión, trastorno maniaco depresivo, esquizofrenia, alcoholismo, enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis, arritmia, síndrome premenstrual, glaucoma, cáncer, SIDA; diabetes mellitus, etc.; o es altamente probable que se padezcan estas enfermedades en el futuro.

55 El polipéptido A2 de la presente invención tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. Por lo tanto, cuando se detecta sobreexpresión de un gen para el polipéptido A2, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, tumor de hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactorrea, acromegalia, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastorno de la espermatogénesis, hipotiroidismo, etc. o es altamente probable que se padezcan estas enfermedades en el futuro. Además, cuando se detecta una expresión reducida del gen para el polipéptido A2 de la presente invención, puede diagnosticarse que se padece enfermedad, por ejemplo, deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc.; o es altamente probable que se

60

padezcan estas enfermedades en el futuro.

El polipéptido B de la presente descripción tiene una actividad liberadora de prolactina, etc. Por lo tanto, cuando se detecta sobreexpresión de un gen para el polipéptido B, se puede diagnosticar que se padece enfermedad, por ejemplo, tumor de hipófisis, tumor del diencéfalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactorrea, acromegalia, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastorno de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc.; o es altamente probable que se padezcan estas enfermedades en el futuro. Además, cuando se detecta una expresión reducida del gen para el polipéptido B de la presente descripción, puede diagnosticarse que se padece enfermedad, por ejemplo, deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc.; o es altamente probable que se padezcan estas enfermedades en el futuro.

[5] Medicamento y agente de diagnóstico que comprende el polinucleótido antisentido

El polinucleótido antisentido de la presente invención que puede unirse de forma complementaria al ADN (denominado en lo sucesivo en la presente memoria "ADN(A1) de la presente invención") que codifica el polipéptido A1 de la presente invención o la proteína de la presente descripción para suprimir la expresión del ADN es poco tóxico y puede suprimir la función del polipéptido A1 de la presente invención o ADN(A1) de la presente invención *in vivo*. Por lo tanto, el polinucleótido antisentido puede usarse como un agente para aliviar y prevenir/tratar enfermedades, por ejemplo, hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia renal aguda, trastornos relacionados con el estrés [por ejemplo, (1) trastornos cardiovasculares (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio, arritmia, etc.), (2) trastornos respiratorios (por ejemplo, asma bronquial, síndrome de hiperventilación, etc.), (3) trastornos musculoesqueléticos (por ejemplo, artritis reumatoide, lumbago, migraña, cefalea de tensión, etc.), (4) diabetes mellitus, síntomas de la menopausia, dolor crónico, supresión inmune, trastornos alimentarios (por ejemplo, úlcera gástrica, colitis ulcerosa, etc.)], etc.; un agente supresor de la contracción uterina; un agente para prevenir/tratar diversos trastornos asociados con contracciones uterinas excesivas, incluyendo parto hipertónico, falsas contracciones, embarazo prolongado, contracciones uterinas tónicas, sufrimiento fetal, ruptura uterina, laceración cervical, alumbramiento prematuro, mioma uterino, anomalías uterinas, adenomiosis uterina, anomalías en la fuerza expulsiva, enfermedad inflamatoria crónica del útero, cuidados maternos durante embarazo múltiple, presentación anómala, síndrome de Prader-Willi, dismenorrea, etc.; un estimulante de la alimentación (apetito); anorexia; insomnio; enfermedad inmunitaria/inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis deformante, etc., preferentemente, como un agente para prevenir/tratar hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, enfermedad inmunitaria/inflamatoria, etc. y más preferentemente, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.

El polinucleótido antisentido de la presente invención que puede unirse de forma complementaria al ADN (denominado en lo sucesivo en la presente memoria "ADN(A2) de la presente invención") que codifica el polipéptido A2 de la presente invención para suprimir la expresión del ADN es poco tóxico y puede suprimir la función del polipéptido A2 de la presente invención o ADN(A2) de la presente invención *in vivo*. Por lo tanto, el polinucleótido antisentido puede usarse como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.

El polinucleótido antisentido de la presente invención que puede unirse de forma complementaria al ADN (denominado en lo sucesivo en la presente memoria "ADN(B) de la presente descripción") que codifica el polipéptido B de la presente descripción para suprimir la expresión del ADN es poco tóxico y puede suprimir la función del polipéptido B de la presente descripción o ADN(B) de la presente descripción *in vivo*. Por lo tanto, el polinucleótido antisentido puede usarse como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.

Cuando se usa el polinucleótido antisentido descrito anteriormente como el agente terapéutico/profiláctico descrito anteriormente, puede prepararse en preparaciones farmacéuticas por métodos públicamente conocidos, que se proporcionan para administración.

Por ejemplo, cuando se usa el polinucleótido antisentido, el polinucleótido antisentido puede administrarse solo; o después de que se inserte el polinucleótido antisentido en un vector apropiado tal como vector de retrovirus, vector de adenovirus, vector de virus asociado a adenovirus, etc., el producto puede administrarse a seres humanos u otro animal de sangre caliente (por ejemplo, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono, etc.) de una manera convencional. El polinucleótido antisentido también puede administrarse tal cual, o con adyuvantes para ayudar a su captación por pistola génica o a través de un catéter tal como un catéter con un hidrogel.

Una dosis del polinucleótido antisentido puede variar dependiendo de la enfermedad diana, sujeto al que se administra, vía para administración, etc. Por ejemplo, cuando el polinucleótido antisentido de la presente invención se administra por vía tópica al riñón para el fin de tratar la hipertensión, el polinucleótido antisentido se administra en general a un adulto (60 kg de peso corporal) en una dosis diaria de aproximadamente 0,1 a 100 mg.

Además, el polinucleótido antisentido también puede usarse como una sonda oligonucleotídica para diagnóstico para examinar la presencia del ADN de la presente invención en tejidos o células y estados de su expresión. Puede realizarse diagnóstico usando el polinucleótido antisentido del mismo modo que en el agente de diagnóstico génico

descrito anteriormente.

(ARNi, Ribozima)

También se describen en la presente memoria

- 5 (1) un ARN bicatenario que comprende una parte de ARN que codifica el polipéptido A1 de la presente invención;  
 (2) un medicamento que comprende el ARN bicatenario de acuerdo con (1);  
 (3) una ribozima que comprende una parte de ARN que codifica el polipéptido A1 de la presente invención;  
 (4) un medicamento que comprende la ribozima de acuerdo con (3);  
 (5) un ARN bicatenario que comprende una parte de ARN que codifica el polipéptido A2 de la presente invención;  
 (6) un medicamento que comprende el ARN bicatenario de acuerdo con (5);  
 10 (7) una ribozima que comprende una parte de ARN que codifica el polipéptido A2 de la presente invención;  
 (8) un medicamento que comprende la ribozima de acuerdo con (7);  
 (9) un ARN bicatenario que comprende una parte de ARN que codifica el polipéptido B de la presente descripción;  
 (10) un medicamento que comprende el ARN bicatenario de acuerdo con (9);  
 (11) una ribozima que comprende una parte de ARN que codifica el polipéptido B de la presente descripción; y  
 15 (12) un medicamento que comprende la ribozima de acuerdo con (11).

Estos ARN bicatenarios (ARNi; método de ARN de interferencia), ribozimas, etc., pueden suprimir la expresión del polinucleótido (por ejemplo, ADN) de la presente invención del mismo modo que en el polinucleótido antisentido de la presente invención, y pueden inhibir la actividad o función del polipéptido de la presente invención o el polinucleótido (por ejemplo, ADN) de la presente invención.

- 20 En consecuencia, el ARN bicatenario descrito en ARN (1) anteriormente y la ribozima descrita en (3) anteriormente pueden usarse como un agente para prevenir/tratar enfermedades, por ejemplo, hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia renal aguda, trastornos relacionados con el estrés [por ejemplo, (1) trastornos cardiovasculares (por ejemplo, angina de pecho, infarto de miocardio, arritmia, etc.), (2) trastornos respiratorios (por ejemplo, asma bronquial, síndrome de hiperventilación, etc.), (3) trastornos musculoesqueléticos (por ejemplo, artritis reumatoide, lumbago, migraña, cefalea de tensión, etc.) (4) diabetes mellitus, síntomas de la menopausia, dolor crónico, supresión inmune, trastornos alimentarios (por ejemplo, úlcera gástrica, colitis ulcerosa, etc.)], etc.; un agente supresor de la contracción uterina; un agente para aliviar y prevenir/tratar diversos trastornos asociados con contracciones uterinas excesivas, incluyendo parto hipertónico, falsas contracciones, embarazo prolongado, contracciones uterinas tónicas, sufrimiento fetal, ruptura uterina, laceración cervical, alumbramiento prematuro, mioma uterino, anomalías uterinas, adenomiosis uterina, anomalías en la fuerza expulsiva, enfermedad inflamatoria crónica del útero, cuidados maternos durante embarazo múltiple, presentación anómala, síndrome de Prader-Willi, dismenorrea, etc.; un estimulante de la alimentación (apetito); anorexia; insomnio; enfermedad inmunitaria/inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis deformante, etc., preferentemente, como un agente para prevenir/tratar hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, enfermedad inmunitaria/inflamatoria, etc. y más preferentemente, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.

Además, el ARN bicatenario descrito en (5) anterior y la ribozima descrita en (7) anterior pueden usarse como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.; (preferentemente, como un agente supresor de la producción de prolactina), etc.

- 40 Además, el ARN bicatenario descrito en (9) anterior y la ribozima descrita en (11) anterior pueden usarse como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.; (preferentemente, como un agente supresor de la producción de prolactina), etc.

El ARN bicatenario puede diseñarse basándose en una secuencia del polinucleótido de la presente invención y fabricarse por modificaciones de métodos públicamente conocidos (por ejemplo, Nature, [411](#). 494, 2001).

- 45 La ribozima puede diseñarse basándose en una secuencia del polinucleótido de la presente invención y fabricarse por modificaciones de métodos públicamente conocidos (por ejemplo, TRENDS in Molecular Medicine, 7, 221, 2001). Por ejemplo, la ribozima puede prepararse ligando una ribozima públicamente conocida a una parte del ARN que codifica el péptido de la presente invención. Una parte del ARN que codifica el péptido de la presente invención incluye una parte próxima a un sitio de escisión en el ARN de la presente invención, que puede escindirse por una  
 50 ribozima públicamente conocida (fragmento de ARN).

Cuando se usa el ARN bicatenario o ribozima descrita anteriormente como los agentes preventivos/terapéuticos descritos anteriormente, el ARN bicatenario o ribozima se prepara en una preparación farmacéutica del mismo modo que en el polinucleótido antisentido y la preparación puede proporcionarse para administración.

[6] Animal con ADN transgénico

- 55 La presente invención proporciona un mamífero no humano que porta el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención que es exógeno (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN exógeno

de la presente invención) o su ADN variante (en ocasiones denominado brevemente ADN variante exógeno de la presente invención).

Es decir, la presente invención proporciona:

- 5 (1) un mamífero no humano que porta el ADN exógeno de la presente invención o su ADN variante;  
 (2) el mamífero de acuerdo con (1), siendo el mamífero no humano un roedor;  
 (3) el mamífero de acuerdo con (2), siendo el roedor ratón o rata; y  
 (4) un vector recombinante que contiene el ADN exógeno de la presente invención o su ADN variante y capaz de expresarse en un mamífero.

10 El mamífero no humano que porta el ADN exógeno de la presente invención o su ADN variante (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente animal con ADN transgénico de la presente invención) puede producirse transfiriendo un ADN deseado a un óvulo no fertilizado, un óvulo fertilizado, un espermatozoide, una célula germinal que contiene una célula germinal primordial de la misma, etc., preferentemente en el estadio embriogénico en el desarrollo de un mamífero no humano (más preferentemente en el estadio de célula única o célula fertilizada y generalmente antes de la fase de 8 células), por medios tales como el método de fosfato cálcico,  
 15 el método de pulso eléctrico, el método de lipofección, el método de aglutinación, el método de microinyección, el método de pistola de partículas, el método de DEAE-dextrano, etc. Además, es posible transferir el ADN exógeno de la presente invención en una célula somática, un órgano vivo, una célula tisular, etc. por la transferencia de ADN y utilizar el transformante para cultivo celular, cultivo tisular, etc. Además, estas células pueden fusionarse con la célula germinal anteriormente descrita por un método de fusión celular públicamente conocido para preparar el  
 20 animal con ADN transgénico de la presente invención.

Los ejemplos de los mamíferos no humanos que pueden usarse incluyen bovino, cerdo, oveja, cabra, conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, ratones, ratas, etc. Sobre todo, se prefieren roedores, especialmente ratones (por ejemplo, cepa C57B1/6, cepa DBA2, etc. para una línea pura y para una línea cruzada, cepa B6C3F<sub>1</sub>, cepa BDF<sub>1</sub>, cepa B6D2F<sub>1</sub>, cepa BALB/c, cepa ICR, etc.), ratas (Wistar, SD, etc.) o similares, puesto que son relativamente  
 25 cortos en ontogenia y ciclo vital desde un punto de vista de producir modelos animales para enfermedades humanas.

“Mamífero” en un vector recombinante que puede expresarse en el mamífero incluye el mamífero no humano mencionado y ser humano.

30 El ADN exógeno de la presente invención se refiere al ADN de la presente invención que se aísla/extrae una vez de un mamífero, no el ADN de la presente invención poseído de forma inherente por un mamífero no humano.

El ADN mutante de la presente invención incluye mutantes resultantes de variación (por ejemplo, mutación, etc.) en la secuencia de bases del ADN original de la presente invención, específicamente ADN que resultan de la adición de bases, delección, sustitución con otras bases, etc. e incluye además ADN anómalo.

35 Se pretende que el ADN anómalo indique el ADN que expresa el polipéptido anómalo de la presente invención y se ejemplifica por dicho ADN que expresa un polipéptido capaz de suprimir las funciones del polipéptido normal de la presente invención.

40 El ADN exógeno de la presente invención puede ser uno cualquiera de los derivados de un mamífero de la misma especie que, o una especie diferente de, el mamífero como el animal diana. Al transfectar el ADN de la presente invención, generalmente es ventajoso usar el ADN como una construcción de ADN en la que el ADN se liga cadena abajo de un promotor capaz de expresar el ADN en el animal diana. Por ejemplo, en el caso de transfectar el ADN humano de la presente invención, puede prepararse un mamífero con ADN transgénico que expresa el ADN de la presente invención a un alto nivel, por microinyección de una construcción de ADN (por ejemplo, vector, etc.) ligada con el ADN humano de la presente invención en un óvulo fertilizado del mamífero no humano diana cadena abajo de  
 45 diversos promotores que son capaces de expresar el ADN derivado de diversos mamíferos (por ejemplo, conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, ratas, ratones, etc.) que porten el ADN de la presente invención altamente homólogo del ADN humano.

Como vectores de expresión para el polipéptido de la presente invención, hay plásmidos derivados de *Escherichia coli*, plásmidos derivados de *Bacillus subtilis*, plásmidos derivados de levadura, bacteriófagos tales como fago λ, retrovirus tales como virus de leucemia de Moloney, etc., y virus animales tales como virus vaccinia, baculovirus, etc.  
 50 De estos vectores, se usan preferentemente plásmidos derivados de *Escherichia coli*, plásmidos derivados de *Bacillus subtilis*, o plásmidos derivados de levadura, etc.

Los ejemplos de estos promotores para regular la expresión de ADN incluyen 1) promotores para ADN derivado de virus (por ejemplo, virus de simios, citomegalovirus, virus de leucemia de Moloney, virus JC, virus de cáncer de mama, poliovirus, etc.) y 2) promotores derivados de diversos mamíferos (ser humano, conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, ratas, ratones, etc.), por ejemplo, promotores de albúmina, insulina II, uroplaquina II, elastasa, eritropoyetina, endotelina, quinasa de creatina muscular, proteína de ácido fibrilar glial, glutatión S-transferasa, factor de crecimiento derivado de plaquetas β, queratinas K1, K10 y K14, colágeno de tipos I y II, subunidad βI de proteína  
 55

5 quinasa dependiente de AMP cíclico, distrofina, fosfatasa alcalina resistente a tartrato, factor natriurético auricular, tirosina quinasa receptora endotelial (generalmente abreviada como Tie2), adenosina trifosforilasa de sodio-potasio (Na, K-ATPasa), cadena ligera de neurofilamentos, metalotioneínas I y IIA, inhibidor tisular de metaloproteínasa I, antígeno de MHC de clase I (H-2L), H-ras, renina, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, peroxidasa tiroidea (TPO), factor de elongación de cadena peptídica  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ),  $\beta$  actina, cadenas pesadas de miosina  $\alpha$  y  $\beta$ , cadenas ligeras 1 y 2 de miosina, proteína básica de mielina, tiroglobulinas, Thy-1, inmunoglobulinas, región variable de cadena H (VNP), componente P de amiloide del suero, mioglobina, troponina C, actina  $\alpha$  de músculo liso, preproencefalina A, vasopresina, etc. Entre ellos, se prefieren promotores de citomegalovirus, promotores del factor de elongación de péptidos humanos  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ), promotores de  $\beta$  actina humanos y de aves, etc., que son capaces de alta expresión en el cuerpo completo.

10 Preferentemente, los vectores descritos anteriormente tienen una secuencia que termina la transcripción del ARN mensajero deseado en el animal con ADN transgénico (generalmente denominado un terminador); por ejemplo, se usan preferentemente una secuencia de cada ADN derivado de virus y diversos mamíferos, y terminador de SV40 del virus de simios, y similares.

15 Además, para el fin de aumentar la expresión del ADN exógeno deseado a un nivel mayor, la señal de corte y empalme y región potenciadora de cada ADN, una parte del intrón de un ADN eucariota también puede ligarse cadena arriba 5' de la región promotora, o entre la región promotora y la región de traducción, o cadena abajo 3' de la región de traducción, dependiendo de los fines.

20 La región de traducción para el polipéptido normal de la presente invención puede obtenerse usando como material de partida el ADN genómico completo o su parte de origen de hígado, riñón, células tiroideas o fibroblastos de ser humano o diversos mamíferos (por ejemplo, conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, ratas, ratones, etc.) o de diversas bibliotecas de ADN genómico disponibles en el mercado, o usando ADN complementario preparado por un método públicamente conocido a partir de ARN de origen de hígado, riñón, células tiroideas o fibroblastos como material de partida. Además, puede obtenerse un ADN anómalo exógeno usando ADN complementario preparado por un método públicamente conocido a partir de ARN de origen de fibroblasto humano como material de partida. Como alternativa, la región de traducción para una región de traducción polipeptídica normal obtenida por la célula o tejido descrito anteriormente puede hacerse variante por mutagénesis puntual.

25 La región de traducción puede prepararse por una técnica de ingeniería de ADN convencional, en la que el ADN se liga corriente abajo del promotor anteriormente mencionado y, si se desea, corriente arriba del sitio de terminación de la traducción, como una construcción de ADN capaz de expresarse en el animal transgénico.

30 El ADN exógeno de la presente invención se transfiere al estadio de ovocito fertilizado de tal manera que el ADN esté presente con certeza en todas las células germinales y células somáticas del mamífero diana. El hecho de que el ADN exógeno de la presente invención esté presente en las células germinales del animal preparado por transferencia de ADN significa que toda la descendencia del animal preparado mantendrá el ADN exógeno de la presente invención en todas las células germinales y células somáticas del mismo. La descendencia del animal que hereda el ADN exógeno de la presente invención también tiene el ADN exógeno de la presente invención en todas las células germinales y células somáticas del mismo.

35 El mamífero no humano en el que se ha transferido el ADN exógeno normal de la presente invención puede pasarse como el animal que porta ADN en ambiente de cría habitual, confirmando que el ADN exógeno se conserva de forma estable por cruzamiento.

40 Por transferencia del ADN exógeno de la presente invención al estadio de ovocito fertilizado, el ADN se conserva en exceso en todas las células germinales y somáticas. El hecho de que el ADN exógeno de la presente invención esté presente en exceso en las células germinales del animal preparado después de transferir significa que el ADN de la presente invención está presente en exceso en todas las células germinales y células somáticas de las mismas. La descendencia del animal que hereda el ADN exógeno de la presente invención tiene el ADN de la presente invención en exceso en todas las células germinales y células somáticas de las mismas.

45 Es posible obtener animales homocigotos que tienen el ADN transferido en ambos cromosomas homólogos y criar machos y hembras del animal de modo que toda la descendencia tenga este ADN en exceso.

50 En un mamífero no humano que porta el ADN normal de la presente invención, el ADN normal de la presente invención se expresa a un alto nivel y puede con el tiempo desarrollar la hiperfunción del polipéptido de la presente invención promoviendo las funciones de ADN normal endógeno. Por lo tanto, el animal puede utilizarse como un modelo animal patológico para dicha enfermedad. Específicamente, usando el animal con ADN transgénico normal de la presente invención, se hace posible dilucidar la hiperfunción por el polipéptido de la presente invención y clarificar el mecanismo patológico de la enfermedad asociado con el polipéptido de la presente invención y determinar cómo tratar la enfermedad.

55 Además, puesto que un mamífero transfectado con el ADN normal exógeno de la presente invención muestra un síntoma creciente del polipéptido de la presente invención, el animal puede utilizarse para exploración de agentes

preventivos/terapéuticos para la enfermedad asociada con el polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, un mamífero transfectado con el ADN exógeno que codifica el polipéptido A1 de la presente invención (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN exógeno (A1) de la presente invención) muestra un síntoma creciente del polipéptido A1 de la presente invención, y está por lo tanto disponible también para un ensayo de agentes de exploración para prevenir/tratar las enfermedades asociadas con el polipéptido A1 de la presente invención (por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.). Un mamífero transfectado con el ADN exógeno que codifica el polipéptido A2 de la presente invención (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN exógeno (A2) de la presente invención) muestra un síntoma creciente del polipéptido A2 de la presente invención, y está por lo tanto disponible también para un ensayo de agentes de exploración para prevenir/tratar las enfermedades asociadas con el polipéptido A2 de la presente invención (por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.). Un mamífero transfectado con el ADN exógeno que codifica el polipéptido B de la presente descripción (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN exógeno (B) de la presente descripción) muestra un síntoma creciente del polipéptido B de la presente descripción, y está por lo tanto disponible también para un ensayo de agente de exploración para prevenir/tratar las enfermedades asociadas con el polipéptido B de la presente descripción (por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.)

Por otro lado, pueden pasarse mamíferos no humanos que tienen el ADN anómalo exógeno de la presente invención en condiciones de cría normales como el animal que porta ADN confirmando la conservación estable del ADN exógeno mediante cruzamiento. Además, el ADN exógeno objetivo puede utilizarse como un material de partida insertando el ADN en el plásmido descrito anteriormente. La construcción de ADN con un promotor puede prepararse usando técnicas de ingeniería de ADN convencionales. La transfección del ADN anómalo de la presente invención en el estadio de ovocito fertilizado se conserva para estar presente en todas las células germinales y somáticas de los mamíferos que van a exponerse. El hecho de que el ADN anómalo de la presente invención esté presente en las células germinales del animal después de transfección de ADN significa que toda la descendencia del animal preparado tiene el ADN anómalo de la presente invención en todas las células germinales y somáticas. Dicha descendencia a la que se ha pasado el ADN exógeno de la presente invención contiene el ADN anómalo de la presente invención en todas las células germinales y somáticas. Un animal homocigoto que tiene el ADN introducido en ambos cromosomas homólogos puede adquirirse y después apareando estos animales machos y hembras, puede criarse toda la descendencia para que tenga el ADN.

Puesto que el mamífero no humano que tiene el ADN anómalo de la presente invención expresa el ADN anómalo de la presente invención a un alto nivel, el animal puede provocar la inadaptabilidad del tipo inactivo de la función del polipéptido de la presente invención inhibiendo las funciones del ADN normal endógeno y puede utilizarse como su animal modelo de enfermedad. Por ejemplo, usando el animal al que se ha transferido ADN anómalo de la presente invención, es posible dilucidar el mecanismo de la inadaptabilidad de tipo inactiva de la función del polipéptido de la presente invención y estudiar un método para tratamiento de esta enfermedad.

Más específicamente, también se espera que el animal transgénico de la presente invención que expresa el ADN anómalo de la presente invención a un alto nivel actúe como un modelo experimental para la dilucidación del mecanismo de la inhibición funcional (efecto negativo dominante) de un polipéptido normal por el polipéptido anómalo de la presente invención en la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido de la presente invención.

Un mamífero al que se ha transfectado el ADN exógeno anómalo de la presente invención tiene un síntoma de la inadaptabilidad del tipo inactivo de la función del polipéptido de la presente invención, y está por lo tanto disponible también para ensayo de exploración de un agente para prevenir/tratar la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, un mamífero transfectado con ADN anómalo exógeno (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN anómalo exógeno (A1) de la presente invención) en el ADN que codifica el polipéptido A1 de la presente invención tiene un síntoma de la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido A1 de la presente invención y está por lo tanto disponible también para ensayo de exploración de un agente para prevenir/tratar trastornos en la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido A1 de la presente invención (por ejemplo, hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, esterilidad, etc.). Un mamífero transfectado con ADN anómalo exógeno (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN anómalo exógeno (A2) de la presente invención) en el ADN que codifica el polipéptido A2 de la presente invención tiene un síntoma de la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido A2 de la presente invención y está por lo tanto disponible también para ensayo de exploración de un agente para prevenir/tratar trastornos en la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido A2 de la presente invención (por ejemplo, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.). Un mamífero transfectado con ADN anómalo exógeno (denominado en lo sucesivo en la presente memoria brevemente ADN anómalo exógeno (B) de la presente descripción) en el ADN que codifica el polipéptido B de la presente descripción tiene un síntoma de la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido B de la presente descripción y está por lo tanto disponible también para ensayo de exploración de un agente para prevenir/tratar trastornos en la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido B de la presente descripción (por ejemplo, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.).

Otras aplicaciones potenciales de dos tipos de los animales transgénicos descritos anteriormente incluyen:

- 1) uso como una fuente celular para cultivo tisular;
- 2) dilucidación de la asociación con un péptido que se expresa específicamente o se activa por el polipéptido de la presente invención, a través de análisis directo de ADN o ARN en tejido del animal con ADN transgénico de la presente invención o por análisis del tejido peptídico expresado por el ADN;
- 3) investigación de la función de células derivadas de tejidos que se cultivan habitualmente solamente con dificultad, usando células de tejido que porta el ADN cultivado por una técnica de cultivo tisular convencional;
- 4) exploración con respecto a un fármaco que potencia las funciones de células usando las células descritas en 3) anterior; y
- 5) aislamiento y purificación del polipéptido variante de la presente invención y preparación de un anticuerpo para el mismo.

Además, pueden determinarse las condiciones clínicas de una enfermedad asociada con el polipéptido de la presente invención, incluyendo la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido de la presente invención usando el animal con ADN transgénico de la presente invención. Además, pueden obtenerse hallazgos patológicos de cada órgano en un modelo de enfermedad asociado con el polipéptido de la presente invención en más detalle, lo que conduce al desarrollo de un nuevo método para tratamiento así como la investigación y terapia de cualquier enfermedad secundaria asociada con la enfermedad.

También es posible obtener una célula transfectada con ADN libre retirando cada órgano del animal con ADN transgénico de la presente invención, picando el órgano y degradando con una polipeptidasa tal como tripsina, etc., seguido de establecimiento de la línea de cultivo o células cultivadas. Además, el animal con ADN transgénico de la presente invención puede actuar como identificación de células capaces de producir el polipéptido de la presente invención, y como estudios sobre la asociación con apoptosis, diferenciación o propagación o sobre el mecanismo de transducción de señal en estas propiedades para inspeccionar cualquier anomalía en los mismos. Por lo tanto, el animal con ADN transgénico de la presente invención puede proporcionar un material de investigación eficaz para el polipéptido de la presente invención y para dilucidar la función y efecto del mismo.

Para desarrollar compuestos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas con el polipéptido de la presente invención, incluyendo la inadaptabilidad de tipo inactivo de función del polipéptido de la presente invención, usando el animal con ADN transgénico de la presente invención, puede proporcionarse un método eficaz y rápido para explorar usando el método para inspección y el método para cuantificación, etc. descrito anteriormente. También es posible investigar y desarrollar un método para terapia de ADN para el tratamiento de enfermedades asociadas con el polipéptido de la presente invención, usando el animal con ADN transgénico de la presente invención o un vector capaz de expresar el ADN exógeno de la presente invención.

#### [7] Animal knockout

La presente invención proporciona una célula madre embrionaria de mamífero no humano que porta el ADN de la presente invención inactivado y un mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona:

- 1) una célula madre embrionaria no humana en la que el ADN de la presente invención está inactivado;
- 2) la célula madre embrionaria de acuerdo con 1), en la que el ADN se inactiva introduciendo un gen indicador (por ejemplo, gen de  $\beta$ -galactosidasa derivada de *Escherichia coli*),
- 3) la célula madre embrionaria de acuerdo con 1), que es resistente a neomicina;
- 4) la célula madre embrionaria de acuerdo con 1), en la que el mamífero no humano es un roedor;
- 5) la célula madre embrionaria de acuerdo con 4), en la que el roedor es un ratón;
- 6) un mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención, en el que ADN está inactivado;
- 7) el mamífero no humano de acuerdo con 6), en el que el ADN se inactiva insertando un gen indicador (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa derivada de *Escherichia coli*) en el mismo y el gen indicador es capaz de expresarse bajo el control de un promotor para el ADN de la presente invención.
- 8) el mamífero no humano de acuerdo con 6), que es un roedor;
- 9) el mamífero no humano de acuerdo con 8), en el que el roedor es un ratón; y
- 10) un método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad promotora para el ADN de la presente invención, que comprende administrar un compuesto de ensayo al mamífero de acuerdo con 7) y detectar la expresión del gen indicador.

La célula madre embrionaria de mamífero no humano en la que el ADN de la presente invención está inactivado se refiere a una célula madre embrionaria de mamífero no humano que suprime la capacidad del mamífero no humano para expresar el ADN mutando artificialmente el ADN de la presente invención, o el ADN no tiene capacidad sustancial para expresar el polipéptido A de la presente invención (denominado en lo sucesivo en la presente memoria en ocasiones el ADN knockout de la presente invención) inactivando sustancialmente las actividades del polipéptido A de la presente invención codificado por el ADN (denominado en lo sucesivo en la presente memoria simplemente célula ES).

Como el mamífero no humano, se aplican los mismos ejemplos que se han descrito anteriormente.

Las técnicas para mutar artificialmente el ADN de la presente invención incluyen delección de una parte o toda la secuencia de ADN e inserción de o sustitución con otro ADN, por ingeniería genética. Por estas variaciones, puede prepararse el ADN knockout de la presente invención, por ejemplo, desplazando la fase de lectura de un codón o alterando la función de un promotor o exón.

Específicamente, la célula madre embrionaria de mamífero no humano en la que se inactiva el ADN de la presente invención (denominado en lo sucesivo en la presente memoria simplemente célula ES con el ADN de la presente invención inactivado o la célula ES knockout de la presente invención) puede obtenerse, por ejemplo, aislando el ADN de la presente invención que posee el mamífero no humano deseado, insertando un fragmento de ADN que tenga una secuencia de ADN construida insertando un gen resistente a fármaco tal como un gen de resistencia a neomicina o un gen de resistencia a higromicina, o un gen indicador tal como lacZ (gen de  $\beta$ -galactosidasa) o cat (gen de cloranfenicol acetiltransferasa), etc. en su sitio de exón para desactivar de este modo las funciones del exón, o integrando el cromosoma del animal objeto, por ejemplo, mediante recombinación homóloga, una secuencia de ADN que termina la transcripción génica (por ejemplo, señal adicional de poliA, etc.) en el intrón entre exones para inhibir de este modo la síntesis de ARN mensajero completo y destruir con el tiempo el gen (denominado en lo sucesivo en la presente memoria simplemente un vector de dirección). Las células ES obtenidas de este modo para el análisis de hibridación de Southern con una secuencia de ADN en o cerca del ADN de la presente invención como una sonda, o para el análisis de PCR con una secuencia de ADN en el vector de dirección y otra secuencia de ADN cerca del ADN de la presente invención que no se incluye en el vector de dirección como cebadores, para seleccionar la célula ES knockout de la presente invención.

Las células ES parentales para inactivar el ADN de la presente invención por recombinación homóloga, etc. pueden ser de una cepa ya establecida como se ha descrito anteriormente, o pueden establecerse originalmente de acuerdo con una modificación del método conocido por Evans y Kaufman mencionado anteriormente. Por ejemplo en el caso de células ES de ratón, actualmente es práctica habitual usar células ES de la cepa 129. Sin embargo, puesto que su fondo inmunológico es poco conocido, puede usarse preferentemente el ratón C57BL/6 o el ratón BDF<sub>1</sub> (híbrido de F<sub>1</sub> entre C57BL/6 y DBA/2), en los que la baja disponibilidad de óvulos por C57BL/6 en el ratón C57BL/6 se ha mejorado cruzando con DBA/2, en lugar de obtener una línea pura de células ES con el fondo genético inmunológico claro y para otros fines. El ratón BDF<sub>1</sub> es ventajoso porque cuando se genera un ratón de modelo patológico usando células ES obtenidas del mismo, el fondo genético puede cambiarse al del ratón C57BL/6 retrocruzando con el ratón C57BL/6, puesto que su fondo es el del ratón C57BL/6, además de ser ventajoso porque la disponibilidad de óvulos por animal es alta y los óvulos son robustos.

Al establecer células ES, se usan habitualmente blastocitos a los 3,5 días después de fertilización. En la presente invención, los embriones se recogen preferentemente en el estadio de 8 células, después de cultivar hasta el estadio de blastocito, los embriones se usan para obtener eficazmente un gran número de embriones de estadio temprano.

Aunque las células ES usadas pueden ser de cualquier sexo, las células ES macho son generalmente más convenientes para generación de una quimera de línea celular germinal y por lo tanto se prefieren. Es deseable identificar los sexos tan pronto como sea posible también para ahorrar tiempo de cultivo laborioso.

Los métodos para identificación del sexo de la célula ES incluyen el método en el que un gen en la región determinante del sexo en el cromosoma Y se amplifica por el procedimiento de PCR y se detecta. Cuando se usa este método, una colonia de células ES (aproximadamente 50 células) es suficiente para análisis de determinación del sexo, cuyo análisis de cariotipo, por ejemplo método de bandas G, requiere aproximadamente 10<sup>6</sup> células; por lo tanto, la primera selección de células ES en el estadio temprano de cultivo puede basarse en identificación de sexo, y las células macho pueden seleccionarse pronto, lo que ahorra una cantidad significativa de tiempo en el estadio temprano de cultivo.

Puede conseguirse segunda selección mediante, por ejemplo, confirmación del número de cromosoma por el método de bandas G. Habitualmente es deseable que el número de cromosoma de las células ES obtenidas sea 100% del número normal. Sin embargo, cuando es difícil obtener las células que tengan el número normal de cromosomas debido a operación física etc. en el establecimiento celular, es deseable que la célula ES se clone de nuevo a una célula normal (por ejemplo, en células de ratón que tienen el número de cromosomas 2n = 40) después de que el gen de las células ES se suprime.

Aunque la línea de células madre embrionarias obtenida de este modo muestra un potencial de crecimiento muy alto, debe subcultivarse con gran cuidado, puesto que tiende a perder su capacidad ontogénica. Por ejemplo, la línea de células madre embrionarias se cultiva a aproximadamente 37 °C en un incubador de dióxido de carbono (preferentemente aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de aire, o aproximadamente 5% de oxígeno, aproximadamente 5% de dióxido de carbono y 90% de aire) en presencia de LIF (1-10000 U/ml) en células alimentadoras apropiadas tales como fibroblastos STO, tratados con una solución de tripsina/EDTA (normalmente tripsina aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,5%/EDTA aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mM, preferentemente tripsina aproximadamente 0,1%/EDTA 1 mM) en el momento de pase para obtener células únicas separadas que después se siembran en células alimentadoras recién preparadas. Este

paso se realiza normalmente cada 1 a 3 días; es deseable que las células se supervisen en el pase y se abandonen las células que se descubra que son morfológicamente anómalas en cultivo, si las hubiera.

Permitiendo a las células ES alcanzar una alta densidad en monocapas o formar agregados celulares en suspensión en condiciones apropiadas, es posible diferenciarlas espontáneamente en diversos tipos celulares, por ejemplo, músculos parietales y viscerales, músculo cardíaco, o similares (M. J. Evans y M. H. Kaufman, *Nature*, 292, 154, 1981; G R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 7634, 1981; T. C. Doetschman *et al.*, *Journal of Embryology Experimental Morphology*, 87, 27, 1985). Las células deficientes en expresión del ADN de la presente invención, que se pueden obtener de las células ES diferenciadas de la presente invención, son útiles para estudiar las funciones del polipéptido A de la presente invención de forma citológica o por biología molecular.

- 5
- 10 El mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención puede identificarse a partir de un animal normal midiendo la cantidad de ARNm en el animal objeto por un método públicamente conocido, y comparando indirectamente los grados de expresión.

Como el mamífero no humano, se aplican los mismos ejemplos mencionados anteriormente.

- 15 Con respecto al mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención, el ADN de la presente invención puede hacerse knockout transfectando un vector diana, preparado como se ha descrito anteriormente, a células madre embrionarias de mamífero no humano u oocitos de las mismas, y realizando recombinación homóloga en la que una secuencia de ADN de vector de dirección, en la que el ADN de la presente invención se inactiva por transfección, se reemplaza con el ADN de la presente invención en un cromosoma de una célula madre embrionaria de mamífero no humano o embrión de la misma.

- 20 Las células knockout con el ADN de la presente invención alterado pueden identificarse por análisis de hibridación de Southern con un fragmento de ADN en o cerca del ADN de la presente invención como una sonda, o por análisis de PCR usando una secuencia de ADN en el vector de dirección y otra secuencia de ADN que no está incluida en el vector de dirección como cebador. Cuando se usan células madre embrionarias de mamífero no humano, se clona una línea celular en la que el ADN de la presente invención se inactiva por recombinación homóloga; la línea celular clonada resultante se inyecta en, por ejemplo, un embrión o blastocito de mamífero no humano, en un estadio apropiado tal como el estadio de 8 células. Los embriones quiméricos resultantes se trasplantan al útero del mamífero no humano pseudoembarazado. El animal resultante es un animal quimérico compuesto tanto de células que tienen el locus normal del ADN de la presente invención como de las que tienen un locus mutado artificialmente del ADN de la presente invención.
- 25

- 30 Cuando algunas células germinales del animal quimérico tienen un locus mutado del ADN de la presente invención, un individuo, cuyo tejido completo está compuesto de células que tienen un locus mutado del ADN de la presente invención puede seleccionarse de una serie de descendencia obtenida cruzando entre dicho animal quimérico y un animal normal, por ejemplo, por identificación de color del pelaje, etc. Los individuos obtenidos de este modo son normalmente deficientes en expresión heterocigota del polipéptido A de la presente invención. Los individuos deficientes en expresión homocigota del polipéptido A de la presente invención pueden obtenerse de descendencia del entrecruzamiento entre los heterocigotos.
- 35

- 40 Cuando se usa un oocito u óvulo, puede inyectarse una solución de ADN, por ejemplo, al pronúcleo por microinyección para obtener de este modo un mamífero no humano transgénico que tenga un vector de dirección introducido en un cromosoma del mismo. A partir de tales mamíferos no humanos transgénicos, pueden obtenerse los que tienen una mutación en el locus del ADN de la presente invención por selección basada en recombinación homóloga.

Como se ha descrito anteriormente, los individuos en los que el ADN de la presente invención se hace knockout permiten la cría en condiciones de cría ordinarias, después se ha demostrado que los individuos obtenidos por su cruce son knockout.

- 45 Además, el sistema genital puede obtenerse y mantenerse por métodos convencionales. Es decir, cruzando animales macho y hembra que tienen cada uno el ADN inactivado, pueden obtenerse animales homocigotos que tienen el ADN inactivado en ambos loci. Los homocigotos obtenidos de este modo pueden criarse de modo que se produzca un animal normal y dos o más homocigotos a partir de un animal madre para obtener eficazmente tales homocigotos. Cruzando heterocigotos macho y hembra, proliferan y se crían homocigotos y heterocigotos que tienen el ADN inactivado.
- 50

La célula madre embrionaria de mamífero no humano en la que el ADN de la presente invención está inactivado es muy útil para preparar un mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención.

- 55 Puesto que el mamífero no humano en el que el ADN de la presente invención está inactivado carece de diversas actividades biológicas derivadas del polipéptido A de la presente invención, dicho animal puede ser un modelo de enfermedad sospechoso de actividades biológicas inactivadas del polipéptido A de la presente invención y por lo tanto ofrece un estudio eficaz para investigar causas de y terapia para estas enfermedades.

[7a] Método para explorar compuestos que tienen efectos terapéuticos/profilácticos en enfermedades provocadas por deficiencia, daños, etc. del ADN de la presente invención.

5 El mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención puede emplearse para la exploración de compuestos que tienen efectos terapéuticos/profilácticos para enfermedades provocadas por deficiencia, daños, etc. del ADN de la presente invención.

Es decir, se describe en la presente memoria un método para explorar un compuesto o su sal que tiene efectos terapéuticos/preventivos para enfermedades provocadas por deficiencia, daños, etc. del ADN de la presente invención, que comprende administrar un compuesto de ensayo al mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención y supervisar/medir un cambio producido en el animal.

10 Como el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención, que puede emplearse para el método de exploración, se aplican los mismos ejemplos que se han proporcionado anteriormente en la presente memoria.

15 Los ejemplos de los compuestos de ensayo incluyen péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos de tejidos animales, plasma sanguíneo y similares y estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o compuestos públicamente conocidos.

20 Específicamente, el mamífero no humano deficiente en la expresión del ADN de la presente invención se trata con un compuesto de ensayo, se realiza comparación con un animal intacto para control y se usan cambios en cada órgano, tejido, enfermedades, etc. del animal como un índice para evaluar los efectos terapéuticos/profilácticos del compuesto de ensayo.

25 Para tratar un animal para ensayar con un compuesto de ensayo, por ejemplo, se aplica administración oral, inyección intravenosa, etc. y el tratamiento se selecciona apropiadamente dependiendo de las condiciones del animal de ensayo, propiedades del compuesto de ensayo, etc. Además, puede seleccionarse una cantidad de un compuesto de ensayo administrado dependiendo de la vía de administración, propiedad del compuesto de ensayo y similares.

30 Por ejemplo, cuando se explora un compuesto que tiene efectos terapéuticos/profilácticos en enfermedades tales como obesidad (por ejemplo, mastocitosis maligna, obesidad exógena, obesidad hiperinsulinar, obesidad hiperplásmica, adiposidad hipofisaria, obesidad hipoplásmica, obesidad hipotiroidea, obesidad hipotalámica, obesidad sintomática, obesidad infantil, obesidad de la parte superior del cuerpo, obesidad alimentaria, obesidad hipogonadal, mastocitosis sistémica, obesidad sencilla, obesidad central, etc.), hiperfagia, etc. usando el mamífero no humano deficiente en la expresión del ADN de la presente invención en el que el ADN que codifica el polipéptido A1 de la presente invención está inactivado, el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención se somete a un tratamiento con carga de azúcar. Después, se administra un compuesto de ensayo antes o después del tratamiento con carga de azúcar y se mide el nivel de azúcar en sangre, cambio de peso corporal, etc. del animal con el paso del tiempo.

35 En el método de exploración anterior, cuando se proporciona un compuesto de ensayo a un animal para ensayar y se descubre que reduce el nivel de azúcar en sangre del animal en al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto que tiene efectos terapéuticos/profilácticos en las enfermedades descritas anteriormente.

40 Además, cuando se explora un compuesto que tiene efectos terapéuticos/profilácticos en enfermedades tales como deficiencia en liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc. usando el mamífero no humano deficiente en la expresión del ADN de la presente invención en el que el ADN que codifica el polipéptido A2 de la presente invención está inactivado, el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención se proporciona al mamífero no humano deficiente en la expresión del ADN de la presente invención. Después se supervisan las diferencias en el desarrollo de deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc. o diferencias en el nivel de prolactina en sangre, etc. del grupo al que no se administró compuesto de ensayo con el paso del tiempo.

45 En el método de exploración anterior, cuando se proporciona un compuesto de ensayo a un animal para ensayar y se descubre que reduce el nivel de prolactina en sangre del animal en al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto que tiene efectos terapéuticos/profilácticos en las enfermedades descritas anteriormente.

55 Además, cuando se explora un compuesto que tiene efectos terapéuticos/profilácticos en enfermedades tales como deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc. usando el mamífero no humano deficiente en la expresión del ADN de la

5 presente invención en el que el ADN que codifica el polipéptido B de la presente descripción está inactivado, el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención se administra al mamífero no humano deficiente en la expresión del ADN de la presente invención. Después se supervisan diferencias de desarrollo de deficiencia de liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.) hipertiroidismo, etc. o diferencias en el nivel de prolactina en sangre, etc. del grupo al que no se administró compuesto de ensayo con el paso del tiempo.

10 En el método de exploración anterior cuando se proporciona un compuesto de ensayo a un animal para ensayar y se descubre que reduce el nivel de prolactina en sangre del animal en al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30% y más preferentemente al menos aproximadamente 50%, el compuesto de ensayo puede seleccionarse como un compuesto que tiene efectos terapéuticos/profilácticos en las enfermedades descritas anteriormente.

15 El compuesto obtenido usando el método de exploración anterior es un compuesto seleccionado de los compuestos de ensayo descritos anteriormente y tiene efectos terapéuticos/profilácticos en las enfermedades provocadas por deficiencia, daños, etc. del polipéptido A de la presente invención y puede por lo tanto usarse como un medicamento tal como un agente seguro y poco tóxico para tratar/prevenir estas enfermedades. Además, también pueden usarse compuestos derivados del compuesto obtenido usando la exploración.

20 El compuesto obtenido por la exploración anterior puede formar sus sales, y sales con ácidos fisiológicamente aceptables (por ejemplo, ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos) o pueden usarse bases (por ejemplo, sales de metales alcalinos), etc. como sales del compuesto, prefiriéndose particularmente sales de adición de ácidos fisiológicamente aceptables. Son ejemplos de tales sales, sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico), sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico), y similares.

25 Un medicamento que comprende el compuesto obtenido por el método de exploración anterior o sus sales puede fabricarse del mismo modo que en la fabricación del medicamento que comprende el polipéptido A de la presente invención descrito anteriormente.

La preparación farmacéutica obtenida de este modo es segura y poca tóxica y puede administrarse a seres humanos u otros mamíferos (por ejemplo, rata, ratón, cobaya, conejo, oveja, cerdo, bovino, caballo, gato, perro, mono, etc.).

30 La dosis del compuesto o su sal para administrar varía dependiendo de la enfermedad diana, sujeto al que se administre, vía de administración, etc. Por ejemplo, cuando el compuesto se administra por vía oral, el compuesto generalmente se administra al paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con obesidad en una dosis diaria de aproximadamente 0,1 a 100 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a 50 mg, más preferentemente de aproximadamente 1,0 a 20 mg. Para administración parenteral, una dosis única del compuesto varía dependiendo del sujeto al que se administre, enfermedad diana, etc. Cuando el compuesto se administra al paciente adulto (como 35 60 kg de peso corporal) con obesidad en forma de, por ejemplo, una preparación inyectable, es generalmente ventajoso administrar el compuesto por vía intravenosa en una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 20 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 10 mg. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente por cada 60 kg de peso.

40 [7b] Método para explorar un compuesto que promueve o inhibe la actividad de un promotor para el ADN de la presente invención

45 Se describe en la presente memoria el método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe las actividades de un promotor para el ADN de la presente invención, que comprende administrar un compuesto de ensayo a un mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención y detectar expresión del gen indicador.

En el método de exploración descrito anteriormente, el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención se selecciona del mamífero no humano mencionado deficiente en expresión del ADN de la presente invención, como un animal en el que el ADN de la presente invención se inactiva introduciendo un gen indicador y el gen indicador puede expresarse bajo el control de un promotor para el ADN de la presente invención.

50 Los mismos ejemplos del compuesto de ensayo se aplican a compuestos específicos usados para la exploración.

Como el gen indicador, se aplican los mismos ejemplos específicos descritos anteriormente, y se emplean preferentemente  $\beta$ -galactosidasa (lacZ), gen de fosfatasa alcalina soluble, gen de luciferasa y similares.

55 Puesto que un gen indicador está presente bajo el control de un promotor para el ADN de la presente invención en el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención en el que el ADN de la presente invención se sustituye con el gen indicador, la actividad de promotor puede detectarse siguiendo la expresión de una sustancia codificada por el gen indicador.

Cuando una parte de la región de ADN que codifica el polipéptido A de la presente invención se sustituye con, por ejemplo, gen de  $\beta$ -galactosidasa (lacZ) derivado de *Escherichia coli*, se expresa  $\beta$ -galactosidasa en un tejido en el que el polipéptido A de la presente invención debería expresarse originalmente, en lugar del polipéptido A de la presente invención. Por lo tanto, el estado de expresión del polipéptido A de la presente invención puede supervisarse fácilmente *in vivo* de un animal tiñendo con un reactivo, por ejemplo, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-gal), que es un sustrato para  $\beta$ -galactosidasa. Específicamente, un ratón deficiente en el polipéptido A de la presente invención, o su sección tisular se fija con glutaraldehído, etc. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), el sistema se hace reaccionar con una solución de tinción que contiene X-gal a temperatura ambiente o aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 30 minutos a una hora. Después de terminar la reacción de  $\beta$ -galactosidasa lavando la preparación tisular con solución EDTA/PBS 1 mM, se supervisa el color formado. Como alternativa, puede detectarse ARNm que codifica lacZ de una manera convencional.

El compuesto o su sal obtenida usando el método de exploración mencionado anteriormente es un compuesto, que se selecciona de los compuestos de ensayo descritos anteriormente y promueve o inhibe la actividad promotora para el ADN de la presente invención.

El compuesto obtenido por el método de exploración anterior puede usarse en forma de sales con ácidos (por ejemplo, ácidos inorgánicos, etc.) o bases (por ejemplo, ácidos orgánicos, etc.) fisiológicamente aceptables, preferentemente en forma de sales de adición de ácidos fisiológicamente aceptables. Son ejemplos de tales sales, sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico), sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico) y similares.

El compuesto o su sal que promueve la actividad promotora para el ADN que codifica el polipéptido A1 de la presente invención puede promover la expresión del polipéptido A1 de la presente invención para promover la función de dicho péptido, y es útil de este modo como un medicamento tal como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, hipotensión, obesidad (por ejemplo, mastocitosis maligna, obesidad exógena, obesidad hiperinsular, obesidad hiperplásmica, adiposidad hipofisaria, obesidad hipoplásmica, obesidad hipotiroidea, obesidad hipotalámica, obesidad sintomática, obesidad infantil, obesidad de la parte superior del cuerpo, obesidad alimentaria, obesidad hipogonadal, mastocitosis sistémica, obesidad sencilla, obesidad central, etc.), hiperfagia, trastornos del sueño [por ejemplo, insomnio primario, trastornos de los ritmos circadianos (por ejemplo, cambio de las condiciones físicas provocado por trabajo de tres turnos, síndrome de cambio de zona horaria (desfase horario), etc.)], letargo, esterilidad, depresión de temporada, disfunción reproductora, enfermedades endocrinas, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, diversos trastornos relacionados con la edad, trastorno circulatorio cerebral (por ejemplo, apoplejía, etc.), lesión craneal, lesión de la médula espinal, epilepsia, ansiedad, depresión, trastorno maniaco depresivo, esquizofrenia, alcoholismo, enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis, arritmia, síndrome premenstrual, glaucoma, cáncer, SIDA, diabetes mellitus, etc.

El compuesto o su sal que promueve la actividad promotora para el ADN que codifica el polipéptido A2 de la presente invención puede promover la expresión del polipéptido A2 de la presente invención para promover la función de dicho péptido, y es por lo tanto útil como un medicamento tal como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, deficiencia en liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc.

El compuesto o su sal que promueve la actividad promotora para el ADN que codifica el polipéptido B de la presente descripción puede promover la expresión del polipéptido B de la presente descripción para promover la función de dicho péptido, y es por lo tanto útil como un medicamento tal como un agente para prevenir/tratar, por ejemplo, deficiencia en liberación de prolactina (por ejemplo, hipofunción ovárica, subdesarrollo espermático, síntomas de la menopausia, etc.), hipertiroidismo, etc.

Además, el compuesto o su sal que inhibe la actividad promotora para el ADN que codifica el polipéptido A1 de la presente invención puede inhibir la expresión del polipéptido A1 de la presente invención para inhibir la función de dicho péptido, y es por lo tanto útil como un estimulante de la alimentación (apetito); como un medicamento tal como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, enfermedad inflamatoria/inmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis deformante, etc.), etc.

Además, el compuesto o su sal que inhibe la actividad promotora para el ADN que codifica el polipéptido A2 de la presente invención puede inhibir la expresión del polipéptido A2 de la presente invención para inhibir la función de dicho péptido, y es por lo tanto útil como un medicamento tal como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, tumor de la hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactorrea, hiperpituitarismo, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastorno de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc.; (preferentemente, como un agente supresor de la producción de prolactina), etc.

Además, el compuesto o su sal que inhibe la actividad promotora para el ADN que codifica el polipéptido B de la presente descripción puede inhibir la expresión del polipéptido B de la presente descripción para inhibir la función de dicho péptido, y es por lo tanto útil como un medicamento tal como un agente seguro y poco tóxico para prevenir/tratar, por ejemplo, tumor de la hipófisis, tumor del diencefalo, trastorno menstrual, enfermedad autoinmune, prolactinoma, esterilidad, impotencia, amenorrea, lactorrea, acromegalia, síndrome de Chiari-Frommel, síndrome de Argonz-del Castillo, síndrome de Forbes-Albright, linfoma, síndrome de Sheehan, trastorno de espermatogénesis, hipotiroidismo, etc.; (preferentemente, como un agente supresor de producción de prolactina), etc.

Además, puede emplearse también compuesto derivado de los compuestos obtenidos por la exploración anterior.

Puede fabricarse un medicamento que comprende el compuesto o su sal obtenido por el método de exploración mencionado anteriormente de una manera similar al método para preparar el medicamento que comprende el polipéptido A de la presente invención o su sal descrito anteriormente.

La preparación farmacéutica obtenida de este modo es segura y poco tóxica, y puede administrarse a ser humano u otro mamífero (por ejemplo, rata, ratón, cobaya, conejo, oveja, cerdo, bovino, caballo, gato, perro, mono, etc.).

La dosis del compuesto o su sal varía dependiendo de la enfermedad diana, sujeto al que se administra, vía para administración, etc.; por ejemplo, cuando el compuesto que promueve la actividad promotora para el ADN de la presente invención se administra por vía oral, la dosis es normalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 50 mg, más preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 20 mg por día para el paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con obesidad. En la administración parenteral, una dosis única del compuesto varía dependiendo del sujeto al que se administra, enfermedad diana, etc. pero cuando el compuesto que promueve la actividad promotora para el ADN de la presente invención se administra al paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con obesidad en forma de, por ejemplo, preparación inyectable, es ventajoso administrar el compuesto por vía intravenosa a una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente por cada 60 kg de peso.

Por otro lado, cuando el compuesto que inhibe la actividad promotora para el ADN de la presente invención se administra por vía oral, la dosis normalmente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 50 mg, más preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 20 mg por día para el paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con anorexia. En la administración parenteral, una dosis única del compuesto varía dependiendo del sujeto al que se administre, enfermedad diana, etc. Cuando el compuesto que inhibe la actividad promotora para el ADN de la presente invención se administra en forma de, por ejemplo, preparación inyectable, es ventajoso administrar el compuesto por vía intravenosa al paciente adulto (como 60 kg de peso corporal) con anorexia en una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Para otras especies animales, puede administrarse la dosis correspondiente por cada 60 kg de peso.

Como se ha descrito anteriormente, el mamífero no humano deficiente en expresión del ADN de la presente invención es extremadamente útil para explorar el compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad de un promotor para el ADN de la presente invención y puede contribuir en gran medida a la dilucidación de causas para diversas enfermedades sospechosas de deficiencia en expresión del ADN de la presente invención y para el desarrollo de agente profiláctico/terapéutico para estas enfermedades.

Además, puede prepararse un llamado animal transgénico (animal con gen transferido) usando el ADN que contiene una región promotora del polipéptido de la presente invención, ligando genes que codifican diversas proteínas corriente abajo e inyectando los mismos en oocitos de un animal. Es posible después sintetizar el polipéptido en el mismo de forma específica y estudiar su actividad *in vivo*. Cuando se liga un gen indicador apropiado con el sitio del promotor anterior y se establece una línea celular que expresa el gen, el sistema resultante puede utilizarse como sistema de estudio para un compuesto molecular bajo que tiene la acción de promover o inhibir específicamente la productividad *in vivo* de la proteína de la presente invención en sí misma.

A lo largo de la memoria de los dibujos, cuando las bases, aminoácidos, etc. se muestran por sus códigos, estos códigos se indican de acuerdo con la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB o por los códigos habituales en la técnica, de los cuales se proporcionan a continuación ejemplos. Para aminoácidos que puedan tener el isómero óptico se presenta la forma L a no ser que se indique de otro modo.

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

A: adenina  
T: timina  
G: guanina

	C: citosina
	Y: timina o citosina
	N: timina, citosina, adenina o guanina
	R: adenina o guanina
5	M: citosina o adenina
	W: timina o adenina
	S: citosina o guanina
	ARN: ácido ribonucleico
	ARNm: ácido ribonucleico mensajero
10	dATP: desoxiadenosin trifosfato
	dTTP: desoxitimidin trifosfato
	dGTP: desoxiguanosin trifosfato
	dCTP: desoxicitidin trifosfato
15	ATP: adenosin trifosfato
	EDTA: ácido etilendiamintetraacético
	SDS: dodecil sulfato sódico
	TFA: ácido trifluoroacético
	EIA: inmunoensayo enzimático
	Gly o G: glicina
20	Ala o A: alanina
	Val o V: valina
	Leu o L: leucina
	Ile o I: isoleucina
25	Ser o S: serina
	Thr o T: treonina
	Cys o C: cisteína
	Met o M: metionina
	Glu o E: ácido glutámico
	Asp o D: ácido aspártico
30	Lis o K: lisina
	Arg o R: arginina
	His o H: histidina
	Phe o F: fenilalanina
	Tyr o Y: tirosina
35	Trp o W: triptófano
	Pro o P: prolina
	Asn o N: asparagina
	Gln o Q: glutamina
40	pGlu: ácido piroglutámico
	Me: grupo metilo
	Et: grupo etilo
	Bu: grupo butilo
	Ph: grupo fenilo
45	TC: grupo tiazolidin-4(R)-carboxamido
	Bom: benciloximetilo
	NMP: N-metilpirrolidona
	PAM: fenilacetamidometilo

Los sustituyentes, grupos protectores y reactivos usados frecuentemente en la presente memoria se presentan con los códigos siguientes.

50	Tos: p-toluenosulfonilo
	HONB: 1-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxiimida
	Bzl: bencilo
	Z: benciloxicarbonilo
	Br-Z: 2-bromobenciloxicarbonilo
55	Cl-Z: 2-clorobenciloxicarbonilo
	Boc: t-butoxicarbonilo
	HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
	DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida
	TFA: ácido trifluoroacético
60	Fmoc: N-9-fluorenil metoxicarbonilo
	DNP: dinitrofenol
	Bom: t-butoximetilo
	Trt: tritilo
	BSA: albúmina de suero bovino

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

E64: (L-3-trans-carboxiran-2-carbonil) L-leucil-agmatina

GDP: guanosin-5'-difosfato

5 MEM $\alpha$ : Medio Mínimo Esencial alfa

Fura-2AM: pentacetoximetil 1-[6-amino-2-(5-carboxi-2-oxazolil)-5-benzofuraniloxi]-2-(2-amino-5-metilfenoxi)-etano-N,N,N',N'-tetraacetato

HBSS: sal equilibrada de Hanks

10 Fluo-3AM: pentacetoximetil 1-[2-amino-5-(2,7-dicloro-6-hidroxi-3-oxi-9-xantenil)fenoxi]-2-(2-amino-5-metilfenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetato

HEPES: cido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]jetanosulfnico

MeBzl: 4-metilbencilo

NMP: N-metilpirrolidona

15 Los números de identificación de secuencia en la lista de secuencias de la memoria indican las siguientes secuencias:

[SEC ID N: 1]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de neuromedina S humana

[SEC ID N: 2]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de neuromedina S de rata

20 [SEC ID N: 3]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de neuromedina S de ratón

[SEC ID N: 4]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de proteína precursora de neuromedina S humana.

[SEC ID N: 5]

25 Esta muestra la secuencia de aminoácidos de proteína precursora de neuromedina S de rata.

[SEC ID N: 6]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de proteína precursora de neuromedina S de ratón.

[SEC ID N: 7]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de péptido 34 N terminal de neuromedina S humana.

30 [SEC ID N: 8]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de péptido 37 N terminal de neuromedina S humana.

[SEC ID N: 9]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de péptido 34 N terminal de neuromedina S de rata.

[SEC ID N: 10]

35 Esta muestra la secuencia de aminoácidos de péptido 37 N terminal de neuromedina S de rata.

[SEC ID N: 11]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de péptido 34 N terminal de neuromedina S de ratón.

[SEC ID N: 12]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de péptido 37 N terminal de neuromedina S de ratón.

40 [SEC ID N: 13]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica neuromedina S humana.

[SEC ID N: 14]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica neuromedina S de rata.

[SEC ID N°: 15]

Esta muestra la secuencia de bases del ADN que codifica neuromedina S de ratón.

[SEC ID N°: 16]

5 Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica proteína precursora de neuromedina S humana.

[SEC ID N°: 17]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica proteína precursora de neuromedina S de rata.

[SEC ID N°: 18]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica proteína precursora de neuromedina S de ratón.

10 [SEC ID N°: 19]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica péptido 34 N terminal de neuromedina S humana.

[SEC ID N°: 20]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica péptido 37 N terminal de neuromedina S humana.

[SEC ID N°: 21]

15 Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica péptido 34 N terminal de neuromedina S de rata.

[SEC ID N°: 22]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica péptido 37 N terminal de neuromedina S de rata.

[SEC ID N°: 23]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica péptido 34 N terminal de neuromedina S de ratón.

20 [SEC ID N°: 24]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica péptido 37 N terminal de neuromedina S de ratón.

[SEC ID N°: 25]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de TGR 1 humano.

[SEC ID N°: 26]

25 Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica TGR 1 humano.

[SEC ID N°: 27]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de TGR 1 de rata.

[SEC ID N°: 28]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica TGR 1 de rata.

30 [SEC ID N°: 29]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de TGR 1 de ratón.

[SEC ID N°: 30]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica TGR 1 de ratón.

[SEC ID N°: 31]

35 Esta muestra la secuencia de aminoácidos de FM-3 humana.

[SEC ID N°: 32]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica FM-3 humana.

[SEC ID N°: 33]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de FM-3 de rata.

[SEC ID N°: 34]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica FM-3 de rata.

5 [SEC ID N°: 35]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de FM-3 de ratón.

[SEC ID N°: 36]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que codifica FM-3 de ratón.

[SEC ID N°: 37]

10 Esta muestra la secuencia de aminoácidos de ADN que codifica péptido 33 N terminal de neuromedina U humana.

[SEC ID N°: 38]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de ADN que codifica péptido 36 N terminal de neuromedina U humana.

[SEC ID N°: 39]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de ADN que codifica péptido 33 N terminal de neuromedina U de rata.

15 [SEC ID N°: 40]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de ADN que codifica péptido 36 N terminal de neuromedina U de rata.

[SEC ID N°: 41]

Esta muestra la secuencia de aminoácidos de ADN que codifica péptido 33 N terminal de neuromedina U de ratón.

[SEC ID N°: 42]

20 Esta muestra la secuencia de aminoácidos de ADN que codifica péptido 36 N terminal de neuromedina U de ratón.

[SEC ID N°: 43]

Esta muestra la secuencia de bases del cebador 1 usado para PCR en el EJEMPLO 1 posterior.

[SEC ID N°: 44]

Esta muestra la secuencia de bases del cebador 2 usado para PCR en el EJEMPLO 1 posterior.

25 [SEC ID N°: 45]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que contiene ADN que codifica proteína precursora de neuromedina S humana obtenida por PCR en el EJEMPLO 1 posterior.

[SEC ID N°: 46]

Esta muestra la secuencia de bases del cebador 3 usado para PCR en el EJEMPLO 2 posterior.

30 [SEC ID N°: 47]

Esta muestra la secuencia de bases del cebador 4 usado para PCR en el EJEMPLO 2 posterior.

[SEC ID N°: 48]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que contiene ADN que codifica proteína precursora de neuromedina S de rata obtenida por PCR en el EJEMPLO 2 posterior.

35 [SEC ID N°: 49]

Esta muestra la secuencia de bases del cebador 5 usado para PCR en el EJEMPLO 3 posterior.

[SEC ID N°: 50]

Esta muestra la secuencia de bases del cebador 6 usado para PCR en el EJEMPLO 3 posterior.

[SEC ID N°: 51]

Esta muestra la secuencia de bases de ADN que contiene ADN que codifica proteína precursora de neuromedina S de ratón obtenida por PCR en el EJEMPLO 3 posterior.

5 [SEC ID N°: 52]

Esta muestra la secuencia de bases de cebador usado para RT-PCR en el EJEMPLO 10 posterior.

[SEC ID N°: 53]

Esta muestra la secuencia de bases de cebador usado para RT-PCR en el EJEMPLO 10 posterior.

[SEC ID N°: 54]

10 Esta muestra la secuencia de bases del oligonucleótido usado como una sonda para la hibridación *in situ* en el EJEMPLO 11 posterior.

### Ejemplos

La presente invención se describirá en más detalle haciendo referencia a EJEMPLOS posteriores pero no se considera limitada a los mismos.

15 La neuromedina S, péptido N terminal de neuromedina S y péptido N terminal de neuromedina U se denominan en ocasiones NMS, NSNP y NUNP, respectivamente.

### Ejemplo 1

Clonación de gen que codifica proteína precursora de neuromedina S humana

20 Usando como molde ADNc Marathon Ready derivado de cerebro completo humano (Clontech), se llevó a cabo PCR usando ADN Polimerasa Pyrobest (TaKaRa) así como cebador 1 (SEC ID N°: 43) y cebador 2 (SEC ID N°: 44). Como resultado se obtuvo la secuencia de bases mostrada en SEC ID N°: 45.

25 En la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 45, estaba presente una fase de traducción desde el codón de inicio ATG al codón de terminación TGA. La secuencia de aminoácidos de una proteína traducida a partir de esta fase de traducción se muestra en SEC ID N°: 4. En SEC ID N°: 4, estaban presentes las secuencia de Lys-Arg, de cuya proteína precursora se supone que se escinde un péptido fisiológicamente activo (Rouille, Y, *et al.*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 322, 1995), la secuencia peptídica representada por SEC ID N°: 1, que es similar a neuromedina U (Minamino, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 1078, 1985) y las secuencias peptídicas representadas por SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8. La presencia de la secuencia de señal de amidación Gly-Arg en el extremo carboxilo terminal de SEC: 1 (Rouille, Y, *et al.*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 322, 1995) sugirió que el aminoácido carboxilo terminal Asn en SEC ID N°: 1 estaría en forma de una amida. Esta secuencia peptídica representada por SEC ID N°: 1 se nombró neuromedina S humana (en ocasiones denominada NMS humana en la memoria). Las secuencias peptídicas representadas por SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 se nombraron péptido 34 N terminal de neuromedina S humana (en ocasiones denominada NSNP-34 humana en la memoria) y péptido 37 N terminal de neuromedina S humana (denominado en ocasiones NSNP-37 humano en la memoria), respectivamente.

35

### Ejemplo 2

Clonación de gen que codifica proteína precursora de neuromedina S de rata

40 Usando como un molde ADNc Marathon Ready derivado de cerebro completo de rata (Clontech), se llevó a cabo PCR usando ADN Polimerasa Pyrobest (TaKaRa) así como cebador 3 (SEC ID N°: 46) y cebador 4 (SEC ID N°: 47). Como resultado se obtuvo la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 48.

45 En la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 48, estaba presente una fase de traducción desde el codón de inicio ATG al codón de terminación TAG. La secuencia de aminoácidos de una proteína traducida a partir de esta fase de traducción se representa por SEC ID N°: 5. En SEC ID N°: 5, estaban presentes la secuencia de Lys-Arg, de cuya proteína precursora se supone que se escinde un péptido fisiológicamente activo (Rouille, Y, *et al.*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 322, 1995), la secuencia peptídica representada por SEC ID N°: 2, que es similar a neuromedina U (Minamino, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 1078, 1985) y las secuencias peptídicas representadas por SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10. La presencia de la secuencia de señal de amidación Gly-Arg en el extremo carboxilo terminal de SEC: 2 (Rouille, Y, *et al.*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 322, 1995) sugirió que el aminoácido carboxilo terminal Asn en SEC ID N°: 2 estaría en forma de una amida. Esta secuencia peptídica representada por SEC ID N°: 2 se nombró neuromedina S de rata (denominada en ocasiones

50

NMS de rata en la memoria). Las secuencias peptídicas representadas por SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10 se nombraron péptido 34 N terminal de neuromedina S de rata (en ocasiones denominado NSNP-34 de rata en la memoria) y péptido 37 N terminal de neuromedina S de rata (en ocasiones denominado NSNP-37 de rata en la memoria), respectivamente.

### 5 Ejemplo 3

Clonación de gen que codifica proteína precursora de neuromedina S de ratón

Usando un ADNc molde preparado a partir de ARNm derivado de hipotálamo de ratón, se llevó a cabo PCR usando ADN Polimerasa Pyrobest (TaKaRa), cebador 5 (SEC ID N°: 49) y cebador 6 (SEC ID N°: 50). Como resultado, se obtuvo la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 51.

10 En la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 51, estaba presente una fase de traducción desde el codón de inicio ATG al codón de terminación TAG. La secuencia de aminoácidos de una proteína traducida a partir de esta fase de traducción se representa por SEC ID N°: 6. En SEC ID N°: 6, estaban presentes la secuencia de Lys-Arg, de cuya proteína precursora se supone que se escinde un péptido fisiológicamente activo (Rouille, Y, *et al.*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 322, 1995), la secuencia peptídica representada por SEC ID N°: 3, que es similar a  
15 neuromedina U (Minamino, N., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 1078, 1985) y después las secuencias peptídicas representadas por SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 12. La presencia de la secuencia de señal de amidación Gly-Arg en el extremo carboxilo terminal de SEC: 3 (Rouille, Y, *et al.*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 322, 1995) sugirió que el aminoácido carboxilo terminal Asn en SEC ID N°: 3 estaría en forma de una amida. Esta  
20 secuencia peptídica representada por SEC ID N°: 3 se nombró neuromedina S de ratón (denominada en ocasiones NMS de ratón en la memoria descriptiva). Las secuencias peptídicas representadas por SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 12 se nombraron péptido 34 N terminal de neuromedina S de ratón (denominado en ocasiones NSNP-34 de ratón en la memoria) y péptido 37 N terminal de neuromedina S de ratón (en ocasiones denominado NSNP-37 de ratón en la memoria), respectivamente.

### Ejemplo 4

25 Preparación de células CHO que expresan FM-3 humana o TGR1 humano

Se clonó FM-3 humana (número de referencia de GenBank BC036543; las bases 209<sup>a</sup> a 1420<sup>a</sup>) y TGR1 (número de referencia de GenBank AF242874; las bases 1<sup>a</sup> a 1240<sup>a</sup>) en vector pcDNA3.1 (Invitrogen) y después se transfectoron en células CHO. La línea celular de expresión estable que mostró el cambio más significativo de nivel de iones Ca intracelular inducido por neuromedina U humana se usó para experimentos.

### 30 Ejemplo 5

Actividad de aumento del nivel de iones Ca intracelular de células CHO que expresan FM-3 humana o TGR1 humano por NMS

35 El ensayo de movilización de calcio (Kojima, M, *et al.*, *Nature*, 402, 656, 1999) se realizó en el sistema FLIPR (Molecular Device) y el valor máximo de cambios del nivel de fluorescencia se convirtió en un valor de actividad. Se disolvió una muestra en tampón de ensayo complementado con BSA 1%. Como resultado, se mostró un aumento específico y fuerte dependiente de concentración de NMS humana de los niveles de iones Ca intracelulares, en comparación con células que expresaban FM-3 humana o TGR1 humano, lo que indica que la CE<sub>50</sub> fue de  $6,5 \times 10^{-11}$  M (FM-3) y  $9,1 \times 10^{-11}$  M (TGR1), respectivamente. Se obtuvieron resultados similares cuando se usó NMS de rata.

### 40 Ejemplo 6

Actividad de unión al receptor de [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>0</sup>]-NMS radiomarcada en la fracción de membrana de células CHO que expresan FM-3 o TGR1 humano.

45 El ensayo de unión al receptor se realizó por una mejora del método de Gottschall, *et al.* (Gottschall, P. E., *et al.*, *Endocrinology*, L27, 272., 1990). Se preparó una fracción de membrana celular en bruto a partir de células CHO que expresaban FM-3 humana o TGR1 humano. Además, la NMS humana ([Tyr<sup>0</sup>]-NMS) añadida con Tyr en el extremo N terminal se marcó de forma radioactiva con <sup>125</sup>I y después se purificó en HPLC. La fracción de membrana celular en bruto (10 µg) y el péptido radiomarcado (50 pM) se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas en un tampón complementado con CHAPS 0,05% y BSA 1% en presencia de un péptido competitivo. El producto de  
50 reacción se filtró para separar el péptido radiomarcado unido del no unido. La radiactividad se midió con un contador de centelleo líquido TopCount (Packard). Como resultado, NMS humana mostró afinidad de CI<sub>50</sub> =  $1,2 \times 10^{-9}$  M por FM-3 humana y afinidad de CI<sub>50</sub> =  $1,0 \times 10^{-10}$  M por TGR1 humano.

Los resultados anteriores revelan que NMS es un ligando endógeno para FM-3 o TGR1.

### Ejemplo 7

#### Actividad contráctil de NMS en el recto de pollo

De acuerdo con el método de Currie *et al.* (Currie, M. G., *et al.*, Science, 221, 71, 1983), se preincubó recto de pollo nuevo a 37 °C en 3 ml de solución de Krebs-Henseleit y se proporcionó una solución de NMS de rata preparada por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 14 y disuelta en solución salina fisiológica. Después se midió la contracción del recto. Como resultado, NMS mostró una actividad contráctil significativa en el recto de pollo a una dosis de 10 pmoles.

#### Ejemplo 8

##### Actividad hipertensiva por administración transvenosa de NMS a rata

Después del método de Minamino, *et al.* (Minamino, N., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 130, 1078, 1985), se situó un catéter en la arteria carótida de ratas Sprague-Dawley anestesiadas con pentobarbital (50 mg/kg) para supervisar la presión arterial continuamente. Se disolvió NMS de rata preparada por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 14 en 0,1 ml de solución salina fisiológica, que se administró a través del catéter situado en la arteria carótida. Como resultado, la NMS aumentó significativamente la presión sanguínea de ratas a una dosis de 3 nmoles/kg por administración transvenosa.

#### Ejemplo 9

##### Efecto en el consumo de alimentos por administración central de NMS

Se situó un catéter en el ventrículo lateral de ratas Wistar (macho, 8 semanas de edad) y se alojaron en condiciones controladas con acceso libre a su dieta, mientras que se acostumbraron a procedimientos experimentales (22°, luz encendida de 7:00 a 19:00). Se disolvió NMS de rata preparada por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 14 en 10 µl de solución salina fisiológica, que se administró al ventrículo lateral a través del catéter. (1) Para consumo de alimentos durante la fase de oscuridad, se administró NMS a las 18:00 y se midió su consumo de alimentos durante 19:00 a 7:00. Además, (2) se administró NMS a ratas en ayunas durante 14 horas a las 9:00 e inmediatamente después se midió el consumo de alimentos durante 2 horas. Como resultado, (1) NMS suprimió significativamente el consumo de alimentos de forma dependiente de dosis durante la fase de oscuridad y su efecto mostró el máximo a 1 nmol. (2) Con respecto al consumo de alimentos de 2 horas de ratas en ayunas, NMS suprimió significativamente el consumo de alimentos a 0,5 nmoles.

#### Ejemplo 10

##### Análisis de distribución tisular de NMS en ratas por RT-PCR

Se obtuvo ARN total de cada tejido de ratas Wistar de 8 semanas de edad. Cada parte del cerebro se obtuvo por el método de Murakami y Takahashi (Murakami, N. y Takahashi, K., Brain Res., 276, 297, 1983). El ARN obtenido se trató con DNasa y se sometió a transcripción inversa usando Superscript II (Invitrogen). Se llevó a cabo PCR cuantitativa usando kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) y Sistema LightCycler (Roche). Los cebadores usados para la cuantificación son 5'-CTCATCTGTGGTCTGCAAAGAG-3' (SEC ID N°: 52) y 5'-GCATACAGAAGCAGTAGATGAC-3' (SEC ID N°: 53). Se usó ADNc de NMS de rata de cantidad conocida para preparar la curva patrón. También se determinó el nivel de expresión de ARNm de GAPDH de rata y se usó como un patrón interno.

Como resultado, el ARNm de NMS de rata se expresó fuertemente en el sistema nervioso central, bazo y testículo, mientras que la expresión fue a un nivel bajo en la hipófisis o intestino delgado. En el sistema nervioso central, la expresión fue especialmente fuerte en el hipotálamo, en el que el ARNm se expresó casi específicamente en el núcleo supraquiasmático.

#### Ejemplo 11

##### Análisis de distribución de expresión por hibridación in situ y cambio en el nivel de expresión en el núcleo supraquiasmático

De acuerdo con el procedimiento previamente presentado (Ozaki, Y., *et al.*, Endocrinology, 143, 4320, 2002), se procesó un corte de sección coronal de 12 µm de cerebro de rata completo para hibridación in situ usando sonda oligonucleotídica marcada con <sup>35</sup>S (5-TGAGGAGGGGATCTGTAGCATACAGAAGCA-3') (SEC ID N°: 54). Después de lavar, el producto se reveló por autorradiografía. La radiactividad se determinó cuantitativamente con un analizador de imágenes MCID (Imaging Research) usando <sup>14</sup>C como el patrón. El sitio en el que se expresó NMS se analizó en las secciones coronal y sagital usando cerebelo de rata completo y como resultado, se observó expresión específica en el núcleo supraquiasmático, que coincidió con los resultados de análisis de expresión por PCR en tiempo real. Se observó expresión de ARNm de NMS de rata en el área ventrolateral del núcleo supraquiasmático.

Puesto que el núcleo supraquiasmático está implicado en la regulación de los ritmos circadianos, el ritmo de expresión de NMS se analizó de forma cuantitativa. Como resultado, el ritmo de expresión de NMS que era más

fuerte en ZT11 y débil en ZT17 se observó con ratas mantenidas en condiciones de luz/oscuridad (luz encendida de 7:00 a 19:00) (tiempo de Zeitgeber, ZT, ZT0, luz encendida; ZT12, luz apagada). Este ritmo de expresión desapareció con ratas alojadas durante 2 días en condiciones de oscuridad constante.

### Ejemplo 12

- 5 Desplazamiento de fase de los ritmos circadianos en la actividad locomotora espontánea por NMS a través de administración intracerebroventricular

Se usaron ratas Wistar Macho (300-350 g) para el experimento de desplazamiento de fase de ritmos circadianos. Se realizó administración intracerebroventricular de acuerdo con el método de Ida *et al.* (Ida, T., *et al.*, (1999) Brain Res., 821, 526, 1999). La actividad locomotora espontánea se midió por el método de Nakahara *et al.* (Nakahara, K., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 318, 156, 2004). El desplazamiento de fase del ritmo de actividad locomotora espontánea se calculó basándose en la distancia entre las líneas dibujadas al representar un retardo en el tiempo de aparición diaria de la actividad locomotora espontánea durante al menos 10 días antes y después de la administración intracerebroventricular de NMS o solución salina fisiológica. El momento de aparición de actividad locomotora espontánea se designó como CT12 (tiempo circadiano 12). Los datos de respuesta a fase se evaluaron usando ANOVA de una vía seguido de ensayo de comparaciones múltiples de Scheffe. Al inmunotefñir para proteína c-Fos, las ratas se mantuvieron en condiciones de oscuridad constante durante 2 semanas y se realizó administración intracerebroventricular de 1 nmol de NMS de rata preparada por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 14 y disuelta en solución salina fisiológica o solución salina fisiológica en CT6. A los 90 minutos después de la administración, se perfundió paraformaldehído 2% en las ratas. Se realizó inmunotinción para proteína c-Fos de acuerdo con el método de Date *et al.* (Date, Y., *et al.*, Proc. Natl. Acad Sci USA, 96, 748, 1999). Se realizó la perfusión intra-núcleo supraquiasmático por una mejora del método de Piggins *et al.* (Piggins, H. D., *et al.*, J. Neurosci., 15, 5612, 1995). Se permitió que las ratas actuaran libremente en condiciones de oscuridad constante durante 2 semanas. Después se implantó a cada rata una cánula guía de acero inoxidable de calibre 26 en las coordenadas estereotácticas por Paxinos y Watson (Paxinos, G. y Watson, C, The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, Nueva York, Estados Unidos, 1998) para alcanzar el núcleo supraquiasmático. Se disolvió NMS de rata preparada por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 14 en 1 µl de solución salina fisiológica y se inyectó usando un inyector de acero inoxidable de calibre 31, que se insertó para extenderse 1 mm por debajo del final de la cánula guía. La actividad locomotora espontánea se registró durante 2 semanas antes y después de la administración, respectivamente, de acuerdo con el método de Nakahara *et al.* (Nakahara, K., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 318, 156, 2004). A la conclusión del experimento, la localización exacta de la cánula se determinó histológicamente como sigue. Las ratas recibieron 1 µl de tinta china para marcar el sitio administrado y después se decapitaron. El cerebro se congeló inmediatamente y se cortó en un criostato en secciones coronales de 20 µm, seguido de tinción con Cristal Violeta. Las secciones se analizaron comparando con el atlas del cerebro de ratas correspondiente de Paxinos y Watson (Paxinos, G. y Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, Nueva York, Estados Unidos, 1998). Cuando los datos obtenidos para localización estaban a más de 200 µm fuera del límite externo del núcleo supraquiasmático, los datos se excluyeron de análisis adicional.

En el núcleo supraquiasmático, se expresó ARNm de TGR1 de forma más abundante que ARNm de FM-3 pero se expresaron dos receptores para NMS. Por lo tanto, se examinaron los efectos de NMS en los ritmos circadianos de la actividad locomotora espontánea por administración intracerebroventricular en ratas mantenidas en condiciones de oscuridad constante. La administración de 1 nmol de NMS de rata en CT3-9 proporcionó avances en la fase de actividad locomotora espontánea, mientras que la administración en CT22-24 provocó retardos en la fase. No se observó desplazamiento de fase en ningún otro momento. Las curvas de respuesta de fase por NMS cambiaron significativamente (ANOVA,  $F(14, 28) = 2,549$ ,  $P < 0,05$ ). Estos resultados dependían tanto de fase como de la dosis. La administración de solución salina fisiológica no provocó ningún cambio en la fase en las mismas condiciones. La duración del ritmo circadiano no se vio afectada en ningún momento por la administración intracerebroventricular de NMS. Además, la expresión de proteína c-Fos (un marcador para activación neuronal) aumentó en el núcleo supraquiasmático después de la administración intracerebroventricular de NMS, en comparación con ratas de control a las que se administró solución salina fisiológica. En particular, la proteína c-Fos se expresó en el área ventrolateral del núcleo supraquiasmático. Para examen adicional de los efectos de NMS en la función del núcleo supraquiasmático, se microinyectó directamente NMS en el núcleo supraquiasmático. La NMS administrada al núcleo indujo avances y retardos de fase en CT6 y CT23 en los ritmos circadianos de la actividad locomotora espontánea, respectivamente, del mismo modo que en la administración intracerebroventricular. La administración de solución salina fisiológica no proporcionó ningún efecto. Estos datos sugirieron que NMS endógena muestra fuertes efectos en la función del núcleo supraquiasmático.

### Ejemplo 13

Actividad liberadora de prolactina de NUNP y NSNP

Se supervisaron los cambios del nivel en sangre de prolactina por administración central. Se realizó administración central a ratas conscientes del mismo modo que en el EJEMPLO 9. El animal recibió NUNP-36 de rata o NSNP-37 de rata preparados por el procedimiento del EJEMPLO 14 y disueltos en solución salina fisiológica y después se

decapitaron, seguido de recogida de sangre en 20 minutos o recogida de sangre a través de la vena de la cola en cada momento después de la administración del péptido. La prolactina se midió usando kit RIA (Amersham). También se examinó un efecto directo en células anteriores de la hipófisis. Las células anteriores de la hipófisis se prepararon a partir de ratas Wistar (5 semanas de edad, macho), se incubaron en una placa de 96 pocillos durante 2 días y se usaron para el experimento. Después de añadirse NUNP-36 de rata o NSNP-37 de rata, se recuperó el sobrenadante de cultivo 30 minutos después y se midió el nivel de prolactina.

Veinte minutos después de la administración central de 1 nmol de NUNP-36 de rata o NSNP-37 de rata, se recogió sangre y se midió el nivel de hormonas en sangre. Como resultado, NUNP-36 de rata aumentó significativamente el nivel de prolactina en sangre, en comparación con el grupo de solución salina fisiológica (solución salina,  $7,35 \pm 1,53$  ng/ml; NUNP 1 nmol,  $68,74 \pm 10,4$  ng/ml). NSNP-37 de rata también aumentó significativamente el nivel de prolactina, aunque débilmente ( $27,34 \pm 5,63$  ng/ml). Por otro lado, el nivel de hormona estimulante del tiroides en sangre se redujo significativamente por la administración de NUNP-36 de rata o NSNP-37 de rata (solución salina,  $7,37 \pm 0,85$  ng/ml; NUNP 1 nmol,  $4,92 \pm 0,22$  ng/ml; NSNP 1 nmol,  $5,37 \pm 0,51$  ng/ml). Además, se observó un aumento significativo del nivel de hormona estimulante del folículo en sangre por administración de NUNP-36 de rata (solución salina,  $8,08 \pm 1,10$  ng/ml; NUNP 1 nmol,  $12,26 \pm 0,95$  ng/ml; NSNP 1 nmol,  $10,64 \pm 0,72$  ng/ml). En otros niveles de hormonas en sangre (hormona del crecimiento, hormona luteinizante, corticosterona), hubo una tendencia a aumentar el nivel de hormona del crecimiento pero no se observó ningún cambio significativo.

Puesto que se observó un nivel de prolactina en sangre notable con NUNP-36 de rata administrado de forma central, se estudió la dependencia de dosis y tiempo. Como resultado, se observó un aumento significativo del nivel de prolactina desde 10 minutos después de la administración a 1 nmol y 0,2 nmoles y el nivel alcanzó el máximo en 20 minutos.

Se estudió además si había un efecto indirecto o directo sobre la hipófisis, usando el sistema de cultivo primario para células de hipófisis anterior. La prolactina en el sobrenadante de cultivo aumentó dependiendo del nivel de TRH pero no se observó ningún cambio con NUNP-36 de rata. Por esta razón, se especuló que el aumento del nivel de prolactina en sangre por NUNP-36 de rata administrado de forma central actuaría en el sistema de regulación de liberación de prolactina en el cerebro.

#### Ejemplo 14

##### Síntesis de NMS, NSNP y NUNP

Se llevó a cabo síntesis de neuromedina S humana, de rata y de ratón (SEC ID N°: 1, 2 y 3), péptido 34 N terminal de neuromedina S humana, de rata y de ratón (SEC ID N°: 7, 9 y 11), péptido 37 N terminal de neuromedina S humana, de rata y de ratón (SEC ID N°: 8, 10 y 12), péptido 33 N terminal de neuromedina U humana, de rata y de ratón (SEC ID N°: 37, 39 y 41) y péptido 36 N terminal de neuromedina U humana, de rata y de ratón (SEC ID N°: 38, 40 y 42), descritos en el presente EJEMPLO, por la síntesis de fase sólida de Fmoc usando un sintetizador peptídico 431A (Applied Biosystems), de acuerdo con el protocolo adjunto. Después de completar la síntesis, la resina se lavó en metanol, se secó y se agitó en una cantidad apropiada de mezcla desbloqueante (composición: fenol cristalino, 1,5 g; agua, 1 ml; tianisol, 1 ml; 1,2-etanoditiol, 0,5 ml; TFA, 20 ml) durante 3 horas para separar de este modo el grupo protector. Después de lavar con dietil éter, el compuesto sintetizado se disolvió en un volumen apropiado de TFA 0,1% y la solución se aplicó a cromatografía en columna SPW-C-ODS (Chemco) para eliminar contaminantes. Se purificó el péptido sintético purificado de forma aproximada hasta un pico único por HPLC de fase inversa usando  $\mu$ BONDASHERE 15  $\mu$ C<sub>18</sub>-300Å. La estructura del péptido sintético obtenido finalmente se identificó usando MALDI-TOF MS (Voyager-DE Pro, Applied) y un secuenciador peptídico (494cLC, Applied Biosystems).

#### Ejemplo 15

##### Actividad supresora de liberación de prolactina por NMS

Se supervisaron los cambios en el nivel de prolactina en sangre por administración central de NMS. Se realizó administración central a ratas conscientes como en el EJEMPLO 9. Se recogió sangre por decapitación 20 minutos después de la administración del péptido. Se ensayó la prolactina usando kit RIA (Amersham).

Después de que se administrara por vía central 1 nmol de NMS de rata preparado por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 14 y disuelto en solución salina fisiológica, se determinaron los niveles de hormonas en sangre. Como resultado, el nivel de prolactina en sangre se redujo significativamente en el grupo de NMS en comparación con el grupo de solución salina fisiológica (solución salina,  $13,1 \pm 1,8$  ng/ml; NMS 1 nmol,  $3,6 \pm 1,2$  ng/ml,  $p < 0,0001$ ). Los resultados mostraron que NMS suprimía la liberación de prolactina por administración central.

#### Aplicabilidad industrial

(1) (i) El polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado o su péptido parcial, y (iii) el compuesto o su sal que promueve

- la actividad del polipéptido mencionado, su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, posee, por ejemplo, una actividad contráctil del tracto digestivo, actividad contráctil del músculo liso, actividad hipertensiva, actividad supresora del consumo de alimentos, actividad supresora de liberación de prolactina, etc., se asocian con avances y retardos de fase en los ritmos circadianos y por lo tanto son útiles para prevenir/tratar, por ejemplo, hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, esterilidad, etc.
- (2) (i) El anticuerpo para el polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6, o su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria de un polinucleótido que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado o su péptido parcial, o una parte de la secuencia de bases, y (iii) el compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido mencionado, su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, son útiles para prevenir/tratar, por ejemplo, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.
- (3) (i) El polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o su péptido parcial, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado o su péptido parcial, y (iii) el compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido mencionado, o su péptido parcial, o una sal del mismo, tienen la actividad liberadora de prolactina, etc. y son útiles para prevenir/tratar, por ejemplo, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.
- (4) (i) El anticuerpo para el polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o su péptido parcial, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria de un polinucleótido que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado o su péptido parcial, o una parte de la secuencia de bases, y (iii) el compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido mencionado, su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, son útiles para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.
- (5) (i) El polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado o su péptido parcial, y (iii) el compuesto o su sal que promueve la actividad del polipéptido mencionado, o su péptido parcial, o una sal del mismo, tienen la actividad liberadora de prolactina, etc. y son útiles para prevenir/tratar, por ejemplo, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, etc.
- (6) (i) El anticuerpo para el polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial, o una sal del mismo, (ii) el polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria o sustancialmente complementaria de un polinucleótido que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado o su péptido parcial, o una parte de la secuencia de bases, y (iii) el compuesto o su sal que inhibe la actividad del polipéptido mencionado, su péptido parcial o una sal del mismo, son útiles para prevenir/tratar, por ejemplo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.
- (7) (i) El polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6, su péptido parcial o su amida, o una sal del mismo, y/o (ii) la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29, su péptido parcial, o una sal de la misma y/o (iii) la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, su péptido parcial o una sal de la misma, son útiles para explorar agentes para prevenir/tratar, por ejemplo, hipotensión, obesidad, letargo, síndrome de cambio de zona horaria, esterilidad, hipertensión, anorexia, síntomas de la menopausia, insomnio, etc.
- (8) El polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o su péptido parcial o una sal del mismo, es útil para prevenir/tratar, por ejemplo, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.
- (9) (i) El polipéptido que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 o SEC ID N°: 42, o su péptido parcial o una sal del mismo, es útil para explorar agentes para la prevención/tratamiento de, por ejemplo, síntomas de la menopausia, hipertiroidismo, esterilidad, hipotiroidismo, etc.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Japón representado por el Presidente del Centro Cardiovascular Nacional

Takeda Pharmaceutical Company Limited

5 <120> Un nuevo polipéptido y uso del mismo

<130> PCT05-0094

<150> JP2004-374029

<151> 24-12-2004

<160> 54

10 <210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Leu Gln Arg Gly Ser Gly Thr Ala Ala Val Asp Phe Thr Lys Lys

5

10

15

Asp His Thr Ala Thr Trp Gly Arg Pro Phe Phe Leu Phe Arg Pro Arg

20

25

30

Asn

15

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

20 <400> 2

Leu Pro Arg Leu Leu His Thr Asp Ser Arg Met Ala Thr Ile Asp Phe

5

10

15

Pro Lys Lys Asp Pro Thr Thr Ser Leu Gly Arg Pro Phe Phe Leu Phe

20

25

30

Arg Pro Arg Asn

35

25 <210> 3

<211> 36

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Leu Pro Arg Leu Leu Arg Leu Asp Ser Arg Met Ala Thr Val Asp Phe  
 5 10 15  
 Pro Lys Lys Asp Pro Thr Thr Ser Leu Gly Arg Pro Phe Phe Leu Phe  
 20 25 30  
 Arg Pro Arg Asn  
 35

<210> 4  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys His Leu Arg Pro Gln Phe Pro Leu Ile Leu Ala Ile Tyr Cys  
 5 10 15  
 Phe Cys Met Leu Gln Ile Pro Ser Ser Gly Phe Pro Gln Pro Leu Ala  
 20 25 30  
 Asp Pro Ser Asp Gly Leu Asp Ile Val Gln Leu Glu Gln Leu Ala Tyr  
 35 40 45  
 Cys Leu Ser Gln Trp Ala Pro Leu Ser Arg Gln Pro Lys Asp Asn Gln  
 50 55 60  
 Asp Ile Tyr Lys Arg Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Thr Gln Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Thr His Pro Val Lys Thr Gly Phe Pro Pro Val His Pro Leu Met His  
 85 90 95  
 Leu Ala Ala Lys Leu Ala Asn Arg Arg Met Lys Arg Ile Leu Gln Arg  
 100 105 110  
 Gly Ser Gly Thr Ala Ala Val Asp Phe Thr Lys Lys Asp His Thr Ala  
 115 120 125  
 Thr Trp Gly Arg Pro Phe Phe Leu Phe Arg Pro Arg Asn Gly Arg Asn  
 130 135 140  
 Ile Glu Asp Glu Ala Gln Ile Gln Trp  
 145 150

10 <210> 5  
 <211> 152  
 <212> PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 5

Met Lys His Pro Phe Pro Gln Phe Pro Pro Ile Leu Val Ile Tyr Cys  
                             5                            10                            15  
 Phe Cys Met Leu Gln Ile Pro Ser Ser Gly Ala Ser Pro Pro Leu Ala  
                             20                            25                            30  
 Gly Pro Pro Asp Gly Leu Asp Ala Val Asp Pro Glu Arg Leu Ala His  
                             35                            40                            45  
 Phe Leu Asn Gln Arg Glu Thr Cys Ser Asn Gln Pro Lys Glu Ser Arg  
                             50                            55                            60  
 Asp Val Tyr Lys Arg Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Ala Trp Lys Ser  
   65                            70                            75                            80  
 Thr His Pro Val Asn Ser Glu Phe Ala Pro Val His Pro Leu Met Arg  
                             85                            90                            95  
 Leu Ala Ala Lys Leu Pro Ser Arg Arg Met Lys Arg Leu Pro Arg Leu  
                             100                            105                            110  
 Leu His Thr Asp Ser Arg Met Ala Thr Ile Asp Phe Pro Lys Lys Asp  
                             115                            120                            125  
 Pro Thr Thr Ser Leu Gly Arg Pro Phe Phe Leu Phe Arg Pro Arg Asn  
                             130                            135                            140  
 Gly Arg Tyr Thr Asp Lys Val Gln  
                             145                            150

5 <210> 6  
    <211> 153  
    <212> PRT  
    <213> Mus musculus  
    <400> 6

```

Met Lys His Pro Leu Pro His Tyr Ser Pro Ile Leu Phe Ile Tyr Cys
              5              10              15
Phe Cys Met Leu Gln Ile Pro Ser Ser Gly Ala Ser Pro Pro Leu Ala
              20              25              30
Asp Ser Pro Asp Gly Leu Asp Ile Val Asp Pro Glu Arg Leu Ala Tyr
              35              40              45
Phe Leu Lys Gln Arg Glu Ile His Ser Asn Gln Pro Lys Glu Asn Gln
              50              55              60
Asp Val Tyr Lys Arg Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Thr Arg Lys Pro
        65              70              75              80
Thr His Pro Val Ser Ala Glu Phe Ala Pro Val His Pro Leu Met Arg
              85              90              95
Leu Ala Ala Lys Leu Ala Ser Arg Arg Met Lys Arg Leu Pro Arg Leu
              100             105             110
Leu Arg Leu Asp Ser Arg Met Ala Thr Val Asp Phe Pro Lys Lys Asp
              115             120             125
Pro Thr Thr Ser Leu Gly Arg Pro Phe Phe Leu Phe Arg Pro Arg Asn
              130             135             140
Gly Arg Tyr Thr Asp Asn Asn Phe Gln
145              150
    
```

5 <210> 7  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

```

Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Thr Gln Glu Ala Thr His Pro Val Lys
              5              10              15
Thr Gly Phe Pro Pro Val His Pro Leu Met His Leu Ala Ala Lys Leu
              20              25              30
Ala Asn
    
```

10 <210> 8  
 <211> 37  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens  
 <400> 8

```

Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Thr Gln Glu Ala Thr His Pro Val Lys
              5                   10                   15

Thr Gly Phe Pro Pro Val His Pro Leu Met His Leu Ala Ala Lys Leu
              20                   25                   30

Ala Asn Arg Arg Met
                35
    
```

5 <210> 9  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 9

```

Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Ala Trp Lys Ser Thr His Pro Val Asn
              5                   10                   15

Ser Glu Phe Ala Pro Val His Pro Leu Met Arg Leu Ala Ala Lys Leu
              20                   25                   30

Pro Ser
    
```

10 <210> 10  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

15 <400> 10

```

Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Ala Trp Lys Ser Thr His Pro Val Asn
              5                   10                   15

Ser Glu Phe Ala Pro Val His Pro Leu Met Arg Leu Ala Ala Lys Leu
              20                   25                   30

Pro Ser Arg Arg Met
                35
    
```

20 <210> 11  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 11

Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Thr Arg Lys Pro Thr His Pro Val Ser  
 5 10 15  
 Ala Glu Phe Ala Pro Val His Pro Leu Met Arg Leu Ala Ala Lys Leu  
 20 25 30  
 Ala Ser

<210> 12  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <400> 12

Phe Leu Phe His Tyr Ser Arg Thr Arg Lys Pro Thr His Pro Val Ser  
 5 10 15  
 Ala Glu Phe Ala Pro Val His Pro Leu Met Arg Leu Ala Ala Lys Leu  
 20 25 30  
 Ala Ser Arg Arg Met  
 35

<210> 13  
 <211> 99  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13

attctgcagc gaggtctggg gactgctgca gtggacttca ccaagaagga tcacactgcg 60  
 acctggggac gacccttttt ccttttcagg cccaggaat 99

<210> 14  
 <211> 108  
 15 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 14

ctaccgcgat tgctgcacac agattccagg atggctacta tagacttccc taagaaggat 60  
 cctaccacca gcttggggcg gccatttttc cttttcagge ctaggaat 108

<210> 15  
 <211> 108  
 20 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 15

ctgccgcgat tgctgcgect cgattccagg atggctactg tggacttccc taagaaggat 60  
 cctactacca gcctggggag gccatttttc cttttcagge ctaggaat 108

25

ES 2 399 831 T3

<210> 16  
 <211> 459  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 16

atgaaacatc ttcgtcccca gttccctctc atcttggcca tctactgctt ctgcatgcta 60  
 cagatccct cctcaggatt tcctcaacct ttagctgac cttcagatgg cttggatatt 120  
 gtgcagcttg agcagctggc atattgtctg agtcagtggg caectcttcc tcgccaacct 180  
 aaggataatc aagacatata caaaaggttt ttgtttcact actccagaac tcaggaggca 240  
 acacatccag ttaaaactgg gttcctcca gtgcatectc taatgcacct ggctgccaag 300  
 ctgccaaca ggcggatgaa gagaattctg cagcgaggct cggggactgc tgcagtggac 360  
 ttcaccaaga aggatcacac tgcgacctgg ggacgacct ttttctttt caggcccagg 420  
 aatggaagaa acattgaaga tgaggcccag attcagtgg 459

<210> 17  
 <211> 456  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus

10

<400> 17

atgaaacatc cgttccctca gttccctcca atcctggtea tctactgctt ctgtatgcta 60  
 cagatccct cctcaggagc ttctccacct ttagctggte ctctgatgg tttggatgct 120  
 gtggaccag agcgactggc aactttctg aaccagaggg aaacatgttc taaccaacct 180  
 aaggaaagcc gggatgtata caaaaggttt ttatttcaact actcccagac ttggaagtgc 240  
 acacatccag ttaactccga gtttgetecc gtccatccat tgatgcgctt ggccgccaag 300  
 cttcccagca gaaggatgaa aagactaccg cgattgctgc acacagatc caggatggct 360  
 actatagact tccctaagaa ggatcctacc accagcttgg ggcggccatt tttcttttc 420  
 aggccatgga atggaagata cactgacaaa gtccag 456

<210> 18  
 <211> 459  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

15

<400> 18

atgaaacacc cgtcccccac ctattctcca atcctgttca tctactgctt ctgtatgcta 60  
 cagatccct cctcaggagc ttcccacct ttagctgatt ctcccagcg cttggatatt 120  
 gtggatcctg agcgactggc atactttctg aagcagaggg aaatacatc taaccaacct 180  
 aaggaaaacc aggatgtata caaaaggttt ttatttcaact actccagaac tcggaaacca 240

acacatccag ttagegetga gtttgctcog gtccatccat tgatgcgect ggctgccaaag 300  
 ctgccagca gaaggatgaa aagactgcog cgattgctgc gcctcgattc caggatggct 360  
 actgtggact tcctaagaa ggatcctact accagcctgg ggaggccatt tttcctttc 420  
 aggcctagga atggaagata caccgacaac aacttccag 459

<210> 19  
 <211> 102  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 19

ttttgtttc actactccag aactcaggag gcaacacatc cagttaaac tgggttct 60  
 ccagtgcac ctctaagca cctggctgcc aagctcgcca ac 102

<210> 20  
 <211> 111  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20

ttttgtttc actactccag aactcaggag gcaacacatc cagttaaac tgggttct 60  
 ccagtgcac ctctaagca cctggctgcc aagctcgcca acaggcggat g 111

<210> 21  
 <211> 102  
 <212> ADN  
 15 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 21

ttttatttc actactccog agcttggag tcgacacatc cagttaactc cgagtttget 60  
 cccgtccatc cattgatgog cctggccgoc aagcttccca gc 102

<210> 22  
 <211> 111  
 <212> ADN  
 20 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 22

ttttatttc actactccog agcttggag tcgacacatc cagttaactc cgagtttget 60  
 cccgtccatc cattgatgog cctggccgoc aagcttccca gcagaaggat g 111

<210> 23  
 <211> 102  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 30 <400> 23

ttttatttc actactccag aactcgaaa ccaacacatc cagttagcgc tgagtttgct 60  
ccggtccatc cattgatgcg cctggctgcc aagctcgcca gc 102

<210> 24  
<211> 111  
<212> ADN  
5 <213> Mus musculus  
<400> 24

ttttatttc actactccag aactcgaaa ccaacacatc cagttagcgc tgagtttgct 60  
ccggtccatc cattgatgcg cctggctgcc aagctcgcca gcagaaggat g 111

<210> 25  
<211> 415  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 25

Met Ser Gly Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Lys Leu Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr  
                   20                    25                    30  
 Leu Ala Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Val Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val  
                   50                    55                    60  
 Leu Val Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Asn Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu  
                   85                    90                    95  
 Leu Gly Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe  
                   100                    105                    110  
 Leu Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr  
                   115                    120                    125  
 Val Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg  
                   130                    135                    140  
 Tyr Val Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg  
 145                    150                    155                    160  
 Arg Arg Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu  
                   165                    170                    175  
 Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe  
                   180                    185                    190  
 Pro Asn Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys  
                   195                    200                    205  
 Pro Met Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe  
                   210                    215                    220

Tyr Leu Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala  
 225                   230                   235                   240  
 Leu Arg Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala  
                   245                   250                   255  
 Asn Ile Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val  
                   260                   265                   270  
 Leu Val Leu Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg  
                   275                   280                   285  
 Leu Phe Phe Ser Phe Val Glu Glu Trp Ser Glu Ser Leu Ala Ala Val  
                   290                   295                   300  
 Phe Asn Leu Val His Val Val Ser Gly Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ser  
 305                   310                   315                   320  
 Ala Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala  
                   325                   330                   335  
 Ala Phe Gln Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln  
                   340                   345                   350  
 His Asp Pro Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu  
                   355                   360                   365  
 Cys His Phe Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Pro Cys  
                   370                   375                   380  
 Gln Ser Ser Met His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu  
 385                   390                   395                   400  
 Gln Met Ser Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr  
                   405                   410                   415

<210> 26  
 <211> 1245  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 26

atgtcaggga tggaaaaact tcagaatgct tcttggatct accagcagaa actagaagat 60  
 ccattccaga aacacctgaa cagcaccgag gagtatctgg ccttcctctg cggacctcgg 120  
 cgcagccact tcttctccc cgtgtctgtg gtgtatgtgc caatttttgt ggtgggggtc 180  
 attggcaatg tcttgggtgt cctgggtgatt ctgcagcacc aggctatgaa gacgcccacc 240  
 aactactacc tcttcagcct ggcggtctct gacctcctgg tcttgetcct tggaatgccc 300  
 ctggagggtct atgagatgtg gcgcaactac cctttcttgt tggggcccgt gggtctctac 360  
 ttcaagacgg cctcttttga gaccgtgtgc ttgcctcca tcttcagcat caccaccgtc 420  
 agcgtggagc gctacgtggc cactctacac ccgttccgcg ccaaactgca gagcaccggg 480  
 cgccgggccc tcaggatcct cggcatcgtc tggggcttct ccgtgctctt ctccctgccc 540  
 aacaccagca tccatggcat caagttccac tacttcccca atgggtccct ggtcccaggt 600  
 tcggccacct gtacggtcac caagcccacg tggatctaca atttcatcat ccaggtcacc 660  
 tcttctctat tctacctcct ccccatgact gtcacacgtg tctctacta cctcatggca 720  
 ctcagactaa agaaagacaa atctcttgag gcagatgaag ggaatgcaaa tattcaaaga 780  
 ccctgcagaa aatcagtcac caagatgctg tttgtcttgg tcttagtggt tgctatctgt 840  
 tgggccccgt tccacattga ccgactcttc ttcagctttg tggaggagtg gaggtaatcc 900  
 ctggctgctg tgttcaacct cgtccatgtg gtgtcagggt tcttcttcta cctgagctca 960  
 gctgtcaacc ccattatcta taacctactg tctcgcgct tccaggcagc attccagaat 1020  
 gtgatctctt ctttccacaa acagtggtcac tcccagcatg acccacagtt gccacctgcc 1080  
 cagcgggaaca tcttcttgac agaatgccac tttgtggagc tgaccgaaga tataggtccc 1140  
 caattcccat gtcagtcac ccatgcacac tctcacctcc caacagccct ctctagttaa 1200  
 cagatgtcaa gaacaaacta tcaaagcttc cactttaaca aaacc 1245

<210> 27  
 <211> 395  
 <212> PRT  
 5 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 27

Met Gly Lys Leu Glu Asn Ala Ser Trp Ile His Asp Pro Leu Met Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Tyr Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu Ala His Leu Cys Gly Pro Lys

	20		25		30
Arg Ser Asp Leu Ser Leu Pro Val Ser Val Ala Tyr Ala Leu Ile Phe					
	35		40		45
Leu Val Gly Val Met Gly Asn Leu Leu Val Cys Met Val Ile Val Arg					
	50		55		60
His Gln Thr Leu Lys Thr Pro Thr Asn Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala					
65		70		75	80
Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly Met Pro Leu Glu Ile Tyr					
		85		90	95
Glu Met Trp His Asn Tyr Pro Phe Leu Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr					
	100		105		110
Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser					
	115		120		125
Val Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr Val Ala Ile Val His Pro Phe					
	130		135		140
Arg Ala Lys Leu Glu Ser Thr Arg Arg Arg Ala Leu Arg Ile Leu Ser					
145		150		155	160
Leu Val Trp Ser Phe Ser Val Val Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile					
		165		170	175
His Gly Ile Lys Phe Gln His Phe Pro Asn Gly Ser Ser Val Pro Gly					
	180		185		190
Ser Ala Thr Cys Thr Val Thr Lys Pro Met Trp Val Tyr Asn Leu Ile					
	195		200		205
Ile Gln Ala Thr Ser Phe Leu Phe Tyr Ile Leu Pro Met Thr Leu Ile					
	210		215		220
Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Gly Leu Arg Leu Lys Arg Asp Glu Ser					
225		230		235	240
Leu Glu Ala Asn Lys Val Ala Val Asn Ile His Arg Pro Ser Arg Lys					
		245		250	255
Ser Val Thr Lys Met Leu Phe Val Leu Val Leu Val Phe Ala Ile Cys					
	260		265		270

Trp Thr Pro Phe His Val Asp Arg Leu Phe Phe Ser Phe Val Glu Glu  
 275 280 285  
 Trp Thr Glu Ser Leu Ala Ala Val Phe Asn Leu Ile His Val Val Ser  
 290 295 300  
 Gly Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ser Ala Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Ser Arg Arg Phe Arg Ala Ala Phe Arg Asn Val Val Ser Pro  
 325 330 335  
 Thr Cys Lys Trp Cys His Pro Arg His Gln Pro Gln Gly Pro Pro Ala  
 340 345 350  
 Gln Lys Ile Ile Phe Leu Thr Glu Cys His Leu Met Glu Leu Thr Glu  
 355 360 365  
 Asp Ala Gly Pro Gln Phe Pro Gly Gln Ser Ser Ile His Asn Thr Asn  
 370 375 380  
 Leu Thr Met Ala Pro Cys Ala Gly Glu Val Pro  
 385 390 395

<210> 28  
 <211> 1185  
 <212> ADN  
 5 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 28

atgggaaaac ttgaaaatgc ttctggate cacgatccac tcatgaagta cttgaacagc 60  
 acagaggagt acttggccca cctgtgtgga cccaagcgca gtgacctatc cettccgggtg 120  
 tctgtggcct atgcgctgat cttcctgggtg ggggtaatgg gcaatcttct ggtgtgcatg 180  
 gtgattgtcc gacatcagac tttgaagaca cccaccaact actatctctt cagettggca 240  
 gtctcagatc tgctggctct gctcttgggg atgcctctgg aatctacga gatgtggcac 300  
 aattaccctt tctgttccgg gcctgtggga tgotacttca agacagcctt cttcgagact 360  
 gtgtgctttg cctcattct cagtgtcacc acggttagcg tagagcgcta tgtggccatt 420  
 gtccaccctt tccgagccaa gctggagagc acgcggcgac gggccctcag gatcctcagc 480

ctagtctgga gcttctctgt ggtcttttct ttgccaata ccagcatcca tggcatcaag 540  
 ttccagcaact ttcccaacgg gtccctccgta cctggetcag ccacctgcac agtcaccaaa 600  
 cccatgtggg tgtataactt gatcatccaa gctaccagct tcctctteta catcctecca 660  
 atgaccctca tcagcgtcct ctactacctc atggggctca ggctgaagag agatgaatcc 720  
 cttgaggcga acaaagtggc tgtgaatatt cacagaccct ctagaaagtc agtcaccaag 780  
 atgctgtttg tcttggctct cgtgtttgcc atctgctgga ccccttcca tgtggaccgg 840  
 ctctttctca gctttgtgga agagtggaca gagtccctgg ctgctgtggt caacctcacc 900  
 catgtggtat caggtgtctt cttttatctg agctccgagg tcaaccccat tatctataac 960  
 ctctgtctc ggcgcttccg ggccgccttt cgaaatgtg tctcccctac ctgcaaatgg 1020  
 tgccateccc ggcatcagcc acagggacct ccagcccaga agatcatctt cttgacagaa 1080  
 tgtcacctca tggagctgac agaggatgca ggccccagt tccttggtca gtcaccacc 1140  
 cacaacacca accttaccat ggccccctgt gcgggagagg tacca 1185

<210> 29  
 <211> 395  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <400> 29

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

Glu Leu Trp His Asn Tyr Pro Phe Leu Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr  
 100 105 110  
 Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser  
 115 120 125  
 Val Thr Thr Val Ser Ile Glu Arg Tyr Val Ala Ile Val His Pro Phe  
 130 135 140  
 Arg Ala Lys Leu Glu Ser Thr Arg Arg Arg Ala Leu Arg Ile Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Val Trp Ser Phe Ser Val Val Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile  
 165 170 175  
 His Gly Ile Lys Phe Gln Gln Phe Pro Asn Gly Ser Ser Val Pro Gly  
 180 185 190  
 Ser Ala Thr Cys Thr Val Thr Lys Pro Met Trp Val Tyr Asn Phe Ile  
 195 200 205  
 Ile Gln Ala Thr Ser Phe Leu Phe Tyr Ile Leu Pro Met Thr Leu Ile  
 210 215 220  
 Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Gly Leu Arg Leu Lys Arg Asp Glu Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ala Asp Lys Val Thr Val Asn Ile His Arg Pro Ser Arg Lys  
 245 250 255  
 Ser Val Thr Lys Met Leu Phe Val Leu Val Leu Val Phe Ala Ile Cys  
 260 265 270  
 Trp Thr Pro Phe His Val Asp Arg Leu Phe Phe Ser Phe Val Asp Glu  
 275 280 285  
 Trp Thr Glu Ser Leu Ala Ala Val Phe Asn Leu Ile His Val Val Ser  
 290 295 300  
 Gly Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ser Ala Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Ser Arg Arg Phe Arg Ala Ala Phe Arg Asn Val Val Ser Pro  
 325 330 335  
 Ser Cys Lys Trp Cys His Pro Gln His Arg Pro Gln Gly Pro Pro Ala

	340		345		350										
Gln	Lys	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Cys	His	Leu	Val	Glu	Leu	Thr	Glu
	355		360		365										
Asp	Ala	Gly	Pro	Gln	Phe	Pro	Cys	Gln	Ser	Ser	Ile	His	Asn	Thr	Gln
	370		375		380										
Leu	Thr	Thr	Val	Pro	Cys	Val	Glu	Glu	Val	Pro					
	385		390		395										

<210> 30  
 <211> 1185  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5

<400> 30

```

atgggaaaac ttgaaaatgc ttctggatc cactgattctc tcatgaagta cttgaacagc 60
acagaggagt acttggccta cctgtgtgga cccaagcgea gtgacctatc cctccagtg 120
tctgtggtct atgcgctgat ctctgtggtg ggggtgatag gcaatcttct ggtgtgcctg 180
gtgattgecc gacatcagac ttggaagaca cccaccaact actatctctt cagcttggca 240
gtctcagact tgctggtect gctcttaggt atgccactgg aggtctacga gttgtggcac 300
aattatecct tectgtttgg gccggtggga tgetacttca agacagccct cttegagaact 360
gtgtgctttg cctccattct cagtgtcacc acggttagca ttgagcgcta cgtggccatt 420
gtccatccat tccgagccaa gctggagagc acacggcgac gggccctcag gatcctcagc 480
ctagtctgga gcttctctgt ggtcttttct ttgcccaaca ccagcatcca tggcatcaag 540
ttccagcagt tteccaacgg gtctctcgtg cccggetctg ccacctgeac agtcacccaaa 600
cccattgtgg tgtataactt catcatccaa gctacctctt tctcttctta catcctcccg 660
atgacctca tcagcgtcct ctactatctc atggggctca ggctgaagag agatgaatct 720
cttgaggcag acaaagtgac tgtgaatatt cacagacct ccagaaaate agtcaccaag 780
atgctgtttg tcttggtect cgtgtttgct atctgttggc cccctttcca tgtggacagg 840
ctcttcttca gctttgtgga cgagtggact gactccctgg ctgctgtgtt caacctcctc 900
cacgtggtat cagggtgtctt tttctatctg agctccgctg tcaaccccat tatatataac 960
ctcctgtctc ggcgcttccg ggcggccttt cggaatgttg tctctccttc ctgcaaatgg 1020
    
```

tgccatcccc agcatcgccc acaggggcct ccagcccaga aggttatctt cttgacagaa 1080  
 tgccaccttg tggagctgac agaggatgcg ggccccagt tcccttgtea gtcacccatc 1140  
 cacacacccc aacttaccac cgtcccctgt gttgaagagg tacca 1185

<210> 31

<211> 426

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 31

Met Thr Pro Leu Cys Leu Asn Cys Ser Val Leu Pro Gly Asp Leu Tyr  
 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15  
 Pro Gly Gly Ala Arg Asn Pro Met Ala Cys Asn Gly Ser Ala Ala Arg  
 . . . . . 20 . . . . . 25 . . . . . 30  
 Gly His Phe Asp Pro Glu Asp Leu Asn Leu Thr Asp Glu Ala Leu Arg  
 . . . . . 35 . . . . . 40 . . . . . 45  
 Leu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Gln Thr Glu Leu Phe Met Pro Ile Cys  
 . . . . . 50 . . . . . 55 . . . . . 60  
 Ala Thr Tyr Leu Leu Ile Phe Val Val Gly Ala Val Gly Asn Gly Leu  
 . . . . . 65 . . . . . 70 . . . . . 75 . . . . . 80  
 Thr Cys Leu Val Ile Leu Arg His Lys Ala Met Arg Thr Pro Thr Asn  
 . . . . . 85 . . . . . 90 . . . . . 95  
 Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Val  
 . . . . . 100 . . . . . 105 . . . . . 110  
 Gly Leu Pro Leu Glu Leu Tyr Glu Met Trp His Asn Tyr Pro Phe Leu  
 . . . . . 115 . . . . . 120 . . . . . 125  
 Leu Gly Val Gly Gly Cys Tyr Phe Arg Thr Leu Leu Phe Glu Met Val  
 . . . . . 130 . . . . . 135 . . . . . 140  
 Cys Leu Ala Ser Val Leu Asn Val Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr  
 . . . . . 145 . . . . . 150 . . . . . 155 . . . . . 160  
 Val Ala Val Val His Pro Leu Gln Ala Arg Ser Met Val Thr Arg Ala

	165		170		175
His Val Arg Arg Val Leu Gly Ala Val Trp Gly Leu Ala Met Leu Cys					
	180		185		190
Ser Leu Pro Asn Thr Ser Leu His Gly Ile Gln Gln Leu His Val Pro					
	195		200		205
Cys Arg Gly Pro Val Pro Asp Ser Ala Val Cys Met Leu Val Arg Pro					
	210		215		220
Arg Ala Leu Tyr Asn Met Val Val Gln Thr Thr Ala Leu Leu Phe Phe					
225		230		235	240
Cys Leu Pro Met Ala Ile Met Ser Val Leu Tyr Leu Leu Ile Gly Leu					
	245		250		255
Arg Leu Arg Arg Glu Arg Leu Leu Leu Met Gln Glu Ala Lys Gly Arg					
	260		265		270
Gly Ser Ala Ala Ala Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Arg Leu Gln Gln His					
	275		280		285
Asp Arg Gly Arg Arg Gln Val Thr Lys Met Leu Phe Val Leu Val Val					
	290		295		300
Val Phe Gly Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ala Asp Arg Val Met Trp					
305		310		315	320
Ser Val Val Ser Gln Trp Thr Asp Gly Leu His Leu Ala Phe Gln His					
	325		330		335
Val His Val Ile Ser Gly Ile Phe Phe Tyr Leu Gly Ser Ala Ala Asn					
	340		345		350
Pro Val Leu Tyr Ser Leu Met Ser Ser Arg Phe Arg Glu Thr Phe Gln					
	355		360		365
Glu Ala Leu Cys Leu Gly Ala Cys Cys His Arg Leu Arg Pro Arg His					
	370		375		380
Ser Ser His Ser Leu Ser Arg Met Thr Thr Gly Ser Thr Leu Cys Asp					
385		390		395	400
Val Gly Ser Leu Gly Ser Trp Val His Pro Leu Ala Gly Asn Asp Gly					
	405		410		415

Pro Glu Ala Gln Gln Glu Thr Asp Pro Ser

420

425

<210> 32  
 <211> 1278  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 32

```

atgactcctc tctgectcaa ttgctctgtc ctccctggag acctgtacce agggggtgca 60
aggaacccca tggcttgcaa tggcagtgcg gccagggggc actttgacce tgaggacttg 120
aacctgactg acgaggcact gagactcaag tacctggggc cccagcagac agagctgttc 180
atgccatct gtgccacata cctgctgata ttcgtgggtg gcgctgtggg caatgggctg 240
acctgtctgg tcatcctgcg ccacaaggcc atgcgcacgc ctaccaacta ctacctctc 300
agcctggccg tgtcggacct gctgggtctg ctgggtgggc tgeccctgga gctctatgag 360
atgtgcaca actaccctt cctgctgggc gttgggtgct gctatttccg cacgctactg 420
tttgagatgg tctgcctggc ctcagtgtc aacgtcactg ccoctgagcgt ggaacgctat 480
gtggcctgg tgcacccact ccaggccagg tccatggtga cgcgggcca tgtgcgccga 540
gtgcttgggg ccgtctgggg tcttgccatg ctctgtctcc tgcccaaacac cagcctgcac 600
ggcatccagc agctgcaagt gccctgccgg ggeccagtgc cagactcagc tgtttgcatg 660
ctggtccgcc cacgggacct ctacaacatg gtagtgcaga ccaccgcgt gctctctctc 720
tgctgcca tgccatcat gagcgtgtc tacctgtca ttgggctgcg actgeggcgg 780
gagaggctgc tgetcatgca ggaggccaag ggcaggggct ctgcagcagc caggtccaga 840
tacacctgca ggetccagca gcacgatcgg ggccggagac aagtgaccaa gatgetgtt 900
gtcctggteg tgggttttg catctgtctg gccccgttcc acgcogaccg cgtcatgtgg 960
agcgtcgtgt cacagtggac agatggcctg cacctggcct tccagcacgt gcacgtcatc 1020
tccggcatct tcttctacct gggctcggcg gccaaaccog tgctctatag cctcatgtcc 1080
agccgttcc gagagacctt ccaggaggcc ctgtgcctcg gggcctgctg ccctgcctc 1140
agacccgcc acagctcca cagcctcagc aggatgacca caggcagcac cctgtgtgat 1200
gtgggctccc tgggcagctg ggtccacccc ctggctggga acgatggccc agaggcgcag 1260
caagagaccg atccatcc 1278
    
```

<210> 33  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

10

<400> 33

Met Leu Ser Pro Asn Ala Ser Thr Gly Leu Leu Ser Cys Asn Asp Ser  
                                   5                                  10                                  15  
 Glu Phe Lys Glu His Phe Asp Leu Glu Asp Leu Asn Leu Thr His Glu  
                                   20                                  25                                  30  
 Asp Leu Arg Leu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Gln Val Lys Gln Phe Leu  
                                   35                                  40                                  45  
 Pro Ile Cys Val Thr Tyr Leu Leu Ile Phe Val Val Gly Thr Leu Gly  
                                   50                                  55                                  60  
 Asn Gly Leu Thr Cys Thr Val Ile Leu Arg Gln Lys Ala Met His Thr  
                                   65                                  70                                  75                                  80  
 Pro Thr Asn Phe Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val  
                                   85                                  90                                  95  
 Leu Leu Val Gly Leu Pro Leu Glu Leu Tyr Glu Met Gln His Asn Tyr  
                                   100                                  105                                  110  
 Pro Phe Gln Leu Gly Ala Gly Gly Cys Tyr Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
                                   115                                  120                                  125  
 Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Val Leu Asn Val Thr Ala Leu Ser Val  
                                   130                                  135                                  140  
 Glu Arg Tyr Val Ala Val Val His Pro Leu Gln Ala Lys Ser Val Met  
                                   145                                  150                                  155                                  160  
 Thr Arg Thr His Val Arg Arg Met Leu Gly Ala Ile Trp Val Phe Ala  
                                   165                                  170                                  175  
 Ile Leu Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Leu His Gly Leu Ser Pro Leu  
                                   180                                  185                                  190

Tyr Val Pro Cys Arg Gly Pro Val Pro Asp Ser Val Thr Cys Thr Leu  
 195 200 205  
 Val Arg Pro Gln Phe Phe Tyr Lys Leu Val Ile Gln Thr Thr Ile Leu  
 210 215 220  
 Leu Phe Phe Cys Leu Pro Met Val Thr Ile Ser Val Leu Tyr Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Ile Gly Leu Arg Leu Arg Arg Glu Arg Met Leu Leu Gln Glu Glu Val  
 245 250 255  
 Lys Gly Arg Ile Ser Ala Ala Ala Arg Gln Ala Ser His Arg Ser Ile  
 260 265 270  
 Gln Leu Arg Asp Arg Glu Arg Arg Gln Val Thr Lys Met Leu Ile Ala  
 275 280 285  
 Leu Val Ile Val Phe Gly Thr Cys Trp Val Pro Phe His Ala Asp Arg  
 290 295 300  
 Leu Met Trp Ser Met Val Ser His Trp Thr Asp Gly Leu Arg Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Phe Gln Ser Val His Leu Ala Ser Gly Val Phe Leu Tyr Leu Gly Ser  
 325 330 335  
 Ala Ala Asn Pro Glu Leu Tyr Asn Leu Met Ser Thr Arg Phe Arg Glu  
 340 345 350  
 Ser Phe Arg Glu Thr Leu Gly Leu Gly Thr Arg Cys Cys His Arg His  
 355 360 365  
 Gln Pro Arg His Asp Ser His Ser His Leu Arg Leu Thr Thr Val Ser  
 370 375 380  
 Thr Leu Cys Asp Arg Asn Ser Arg Asp Val Pro Leu Ala Glu Asn Arg  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Gly Cys Glu Gln Glu Thr Asp Pro Pro Glu  
 405 410

- <210> 34
- <211> 1236
- <212> ADN
- <213> Rattus norvegicus

<400> 34

```

atgctctccc caaatgettc aacgggcctc ttgtcctgca atgacagtga gttcaaggag      60
cactttgacc ttgaggacct gaaccttact catgaggacc tgaggctgaa gtaacttggg      120
ccacagcagg taaaacaatt tttgeccatc tgtgtcacgt acctgttgat cttegtagt      180
ggcactctgg gcaacggggt gacctgcacc gtcatectgc gccagaaggc aatgcacacg      240
cccaccaact tctacctctt cagtctcgcg gigtccgatt tgctgggtgct cctgggtggc      300
ttgeccctgg aactttatga gatgcagcac aattaccat tccagctggg tgcaggtggc      360
tgttacttcc ggatactgct tttggagact gtctgcctgg cttcagtgtc caatgtcaca      420
gccctaagtg tggagcgtta tgtggccgtg gtgcacccac tccaagccaa gctctgtgatg      480
acacggaccc atgtgcgcog catgttggga gccatctggg tettegetat tctcttctct      540
ctgeccaaca ccagettaca tggectcagt ccaactctatg taccctgceg ggggccgggtg      600
cccgattcag ttacgtgtac gctgggtgct cccagttct tctacaagtt ggtaatacag      660
acgaccatac tgctcttctt ctgtctgccc atggtcacca tcagtgtgct gtaectgctc      720
attgggctga ggctgcggag ggagaggatg ttgctccaag aggaggtcaa gggcaggata      780
tctgcagcag ccaggcaggc ctcccacaga agtattcagc ttcgagatag ggaacgcaga      840
caggtgacca agatgctaat tgctctgggt atagtatttg gcacctgctg ggttccattc      900
catgctgacc gtctcatgtg gagtatggtg tcccattgga ctgacggcct gcgcctggcc      960
ttccagtctg tgcacctgc ttctgggtgc ttcttgtacc tgggtcagc ggctaacccg     1020
gagctctaca acctcatgtc cactcgcttc cgagagtctt tccgggaaac cctgggcctt     1080
gggacacggt gctgtcatcg ccaccaaccg cgtcacgact cccatagcca ccttaggttg     1140
accacagtca gcacctgtg tgacaggaac agcagggatg taccctggc tgagaacagg     1200
gatccagggt gtgagcaaga gacagacct cctgaa                                  1236

```

<210> 35

<211> 405

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Met Val Cys Asn Ile Ser Glu Phe Lys Trp Pro Tyr Gln Pro Glu Asp  
5 10 15  
Leu Asn Leu Thr Asp Glu Ala Leu Arg Leu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln  
20 25 30  
Gln Met Lys Gln Phe Val Pro Ile Cys Val Thr Tyr Leu Leu Ile Phe  
35 40 45  
Val Val Gly Thr Leu Gly Asn Gly Leu Thr Cys Thr Val Ile Leu Arg  
50 55 60  
Asn Lys Thr Met Arg Thr Pro Thr Asn Phe Tyr Leu Phe Ser Leu Ala  
65 70 75 80  
Val Ser Asp Met Leu Val Leu Leu Val Gly Leu Pro Leu Glu Leu Tyr  
85 90 95  
Glu Met Gln Gln Asn Tyr Pro Phe Gln Leu Gly Ala Ser Ala Cys Tyr  
100 105 110  
Phe Arg Ile Leu Leu Leu Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Val Leu Asn  
115 120 125  
Val Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Val Ala Val Val Arg Pro Leu  
130 135 140  
Gln Ala Lys Ser Val Met Thr Arg Ala His Val Arg Arg Met Val Gly  
145 150 155 160  
Ala Ile Trp Val Leu Ala Thr Leu Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Leu  
165 170 175  
His Gly Leu Ser Gln Leu Thr Val Pro Cys Arg Gly Pro Val Pro Asp  
180 185 190  
Ser Ala Ile Cys Ser Leu Val Gly Pro Met Asp Phe Tyr Lys Leu Val  
195 200 205  
Val Leu Thr Thr Ala Leu Leu Phe Phe Cys Leu Pro Met Val Thr Ile  
210 215 220  
Ser Val Leu Tyr Leu Leu Ile Gly Leu Arg Leu Arg Arg Glu Arg Met  
225 230 235 240

Leu Leu Gln Val Glu Val Lys Gly Arg Lys Thr Ala Ala Thr Gln Glu  
 245 250 255  
 Thr Ser His Arg Arg Ile Gln Leu Gln Asp Arg Gly Arg Arg Gln Val  
 260 265 270  
 Thr Lys Met Leu Phe Ala Leu Val Val Val Phe Gly Ile Cys Trp Ala  
 275 280 285  
 Pro Phe His Ala Asp Arg Ile Met Trp Ser Leu Val Tyr Gly His Ser  
 290 295 300  
 Thr Glu Gly Leu His Leu Ala Tyr Gln Cys Val His Ile Ala Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Phe Phe Tyr Leu Gly Ser Ala Ala Asn Pro Val Leu Tyr Ser Leu  
 325 330 335  
 Met Ser Thr Arg Phe Arg Glu Thr Phe Leu Gln Ala Leu Gly Leu Gly  
 340 345 350  
 Thr Gln Cys Cys His Arg Arg Gln Pro Tyr His Gly Ser His Asn His  
 355 360 365  
 Ile Arg Leu Thr Thr Gly Ser Thr Leu Cys Asp Val Gly His Arg Asn  
 370 375 380  
 Ser Arg Asp Glu Pro Leu Ala Val Asn Glu Asp Pro Gly Cys Gln Gln  
 385 390 395 400  
 Glu Thr Asp Pro Ser  
 405

<210> 36  
 <211> 1215  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5

<400> 36

ctggtctgca atatcagtga gttcaagtgg ccctatcaac ctgaggatct gaaccttacc 60  
 gatgaggecc tgaggctgaa gtatttgggg ccacagcaga tgaacagtt tgtcccate 120

tgtgtcacgt acctgetgat cttcgtggtg ggcactctgg gcaacgggct gacctgcacc 180  
 gtcacctgc gcaacaagac tatg'gcacg cccaccaact tetacctctt cagcctcgt 240  
 gtgtccgata tgctggtgct cctgggtggc ttgcctctgg agctttatga gatgcagcaa 300  
 aattaccegt tccagctggg tgcgagtgcc tgctacttcc gaatactgct cttagagacc 360  
 gtctgcctag cttcagtget caatgtcaca gccctgagtg tggagcgtta tgtggccgtg 420  
 gtgcgcccac tccaagccaa gtctgtgatg acacgggccc atgtgcgccc catggtgggg 480  
 gccatctggg tctcgtctac tctctctctc ctgcccaaca ccagcctgca tggcctcagt 540  
 caactaactg tgcctgccc ggggcccgtg cccgactcag ctatatgttc gctggtgggt 600  
 cccatggact tctacaagtt ggtggtactg actaccgcac tgctcttctt ctgtctgccc 660  
 atggtcacca tcagtgtget gtatctgctc attgggctgc ggctgcccag ggagaggatg 720  
 ttgctccaag tggagggtcaa gggcaggaaa accgcagcaa cccaggagac ctcccacaga 780  
 aggattcagc tgcaagatag gggacggaga caggtgacca agatgctgtt tgcactgggt 840  
 gtggtattcg gcatctgctg ggetccattc catgctgacc gtatcatgtg gacccctggtg 900  
 tatggacact caacggaagg cctgcacctg gctaccagt gtgtccacat tgcctctggc 960  
 atctctctct atctcggtc agcagccaac ccggtgctct acagcctcat gtctactcgc 1020  
 ttccgagaga ccttctgca agccctgggc cttggaacct agtgetgtca tcgcccacaa 1080  
 ccctatcatg gctcccataa ccacatcagg ttgaccacag gcagcaccct gtgtgacgtg 1140  
 ggccacagga acagcagga cgaacctctg gctgtgaatg aggatccagg gtgtcagcaa 1200  
 gagacagacc cctcc 1215

<210> 37  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Leu Phe His Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Gly Asn Ser Asn Val  
                                   5                                  10                                  15  
 Val Ser Ser Val Val His Pro Leu Leu Gln Leu Val Pro His Leu His  
                                   20                                  25                                  30  
 Glu

<210> 38  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 399 831 T3

Phe Leu Phe His Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Gly Asn Ser Asn Val  
                                   5                                  10                                  15  
 Val Ser Ser Val Val His Pro Leu Leu Gln Leu Val Pro His Leu His  
                                   20                                  25                                  30  
 Glu Arg Arg Met  
                                   35

<210> 39  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 5 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 39

Phe Leu Phe His Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Gly Asn Ser Asn Val  
                                   5                                  10                                  15  
 Val Ser Ser Val Val His Pro Leu Leu Gln Leu Val Pro Gln Leu His  
                                   20                                  25                                  30  
 Glu

<210> 40  
 <211> 36  
 10 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 40

Phe Leu Phe His Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Gly Asn Ser Asn Val  
                                   5                                  10                                  15  
 Val Ser Ser Val Val His Pro Leu Leu Gln Leu Val Pro Gln Leu His  
                                   20                                  25                                  30  
 Glu Arg Arg Met  
                                   35

<210> 41  
 <211> 33  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 41

Phe Leu Phe His Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Gly Asn Ser Asn Val

5

10

15

Val Ser Ser Val Val His Pro Leu Leu Gln Leu Val Pro Gln Leu His

20

25

30

Glu

<210> 42

<211> 36

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 42

Phe Leu Phe His Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Gly Asn Ser Asn Val

5

10

15

Val Ser Ser Val Val His Pro Leu Leu Gln Leu Val Pro Gln Leu His

20

25

30

Glu Arg Arg Met

35

<210> 43

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

15 <400> 43

tggccagcaa ggagaaacca gac 23

<210> 44

<211> 21'

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 44

cagatccagc ttctttcac c 21

25 <210> 45

<211> 508

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 45

tggccagcaa ggagaaacca gactctcaca atgaaacatc ttcgtcccca gttccctctc 60  
 atcttggcca tctactgctt ctgcatgcta cagattccct cctcaggatt tectcaacct 120  
 ttagctgac cttcagatgg cttggatatt gtgcagcttg agcagctggc atattgtctg 180  
 agtcagtggg cacctctttc tcgccaacct aaggataatc aagacatata caaaaggttt 240  
 ttgtttcaact actccagaac tcaggaggca acacatccag ttaaaactgg gtttctcca 300  
 gtgcatctc taatgcacct ggctgccaag ctgccaaca ggcggatgaa gagaattctg 360  
 cagcgaggct cggggactgc tgcagtggac ttcaccaaga aggatcacac tgcgacctg 420  
 ggacgacct ttttctttt caggcccagg aatggaagaa acattgaaga tgaggccag 480  
 attcagtggg gaaagaaagc tggatctg 508

<210> 46  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cebador

<400> 46  
 ctcatctgtg gtctgcaaag ag 22

10

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cebador

<400> 47  
 ctccaagat gcacactgtc tt 22

20

<210> 48  
 <211> 540  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 48

ctcatctgtg gtctgcaaag agaagccaga gcttgaagat gaaacatccg ttcctcagt 60  
 tccctccaat cctggtcata tactgcttct gtatgtaca gatccctcc tcaggagctt 120  
 ctccaccttt agctggctct cctgatgggt tggatgctgt ggaccagag cgactggcac 180  
 actttctgaa ccagagggaa acatgttcta accaacctaa ggaaagccgg gatgtataca 240  
 aaaggTTTT atttactac tcccgagctt ggaagtcgac acatccagtt aactccgagt 300  
 ttgctcccgT ccatccattg atgogcctgg ccgccaagct tcccagcaga aggatgaaaa 360  
 gactaccgCG attgctgcac acagattcca ggatggctac tatagacttc cctaagaagg 420  
 atcctaccac cagcttgggg cggccatTTT tccttttcag gcctaggaat ggaagataca 480  
 ctgacaaagt ccagtagacg gcaagaatcc tatgtcacia gacagtgtgc atctttggag 540

<210> 49  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cebador

<400> 49  
 ctgtgtctg caaagagaat cc 22

10

<210> 50  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

15

<400> 50  
 ctcaaaggc gcacaccgtc tg 22

20

<210> 51  
 <211> 538  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 51

ctgtgtctg caaagagaat ccagagcttg aagatgaaac acccgtccc cactattct 60  
 ccaatcctgt tcatctactg ettctgtatg ctacagattc cctcctcagg agcttcccc 120  
 ccttagctg attctcccga cggttggat attgtggatc ctgagcgact ggcatacttt 180  
 ctgaagcaga gggaaataca ttctaacc aa cctaaggaaa accaggatgt atacaaaagg 240  
 tttttattt actactccag aactcggaaa ccaacacatc cagttagcgc tgagtttct 300  
 ccggtccatc cattgatggc cctggctgcc aagctcgcca gcagaaggat gaaaagactg 360  
 ccgcatgac tgcgcctega ttccaggatg gctactgtgg acttccctaa gaaggatcct 420  
 actaccagcc tggggaggcc attttctctt ttcaggccta ggaatggaag atacaccgac 480  
 aacaactcc agtagacagc aagagtccca tgtcaccaga cgggtgtcgc ctttggag 538

# ES 2 399 831 T3

<210> 52  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador

<400> 52  
ctcatctgtg gtctgcaaag ag 22

10 <210> 53  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador

15 <400> 53  
gcatacagaa gcagtagatg ac 22

<210> 54  
<211> 30  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sonda

<400> 54  
tgaggagggg atctgtagca tacagaagca 30

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3, o su amida, o una sal del mismo.
- 5 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, o su amida, o una sal del mismo.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 2, o su amida, o una sal del mismo.
4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 3, o su amida, o una sal del mismo.
- 10 5. Un polinucleótido, que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, que es un ADN.
7. El ADN de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 15.
8. Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5.
- 15 9. Un transformante no humano, que se transforma con el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 8.
10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6; su amida, o una sal del mismo.
11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 4, o una sal del mismo.
- 20 12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 5, o una sal del mismo.
13. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6, o una sal del mismo.
- 25 14. Un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10.
15. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, que es un ADN.
16. El ADN de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 o SEC ID N°: 18.
17. Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14.
- 30 18. Un transformante no humano, que se transforma con el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 17.
19. Un polipéptido, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o una sal del mismo.
20. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12, o una sal del mismo.
- 35 21. Un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19.
22. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 21, que es un ADN.
23. El ADN de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23 o SEC ID N°: 24.
- 40 24. Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 21.
25. Un transformante no humano, que se transforma con el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 24.
26. Un método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende usar dicho polipéptido, su amida o una sal del mismo.
27. El método de exploración de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende usar (i) el polipéptido de acuerdo

- con la reivindicación 1, su amida, o una sal del mismo, y (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29, o una sal de la misma.
28. El método de exploración de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende usar una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25, o una sal de la misma.
- 5 29. El método de exploración de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende usar (i) el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, su amida, o una sal del mismo, y (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, o una sal de la misma.
30. El método de exploración de acuerdo con la reivindicación 29, en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 31, o una sal de la misma.
- 10 31. Un kit para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende dicho polipéptido, su amida, o una sal del mismo.
32. El kit de exploración de acuerdo con la reivindicación 31, que comprende además una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29, o una sal de la misma.
- 15 33. El kit de exploración de acuerdo con la reivindicación 31, que comprende además una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 35, o una sal de la misma.
34. Un método para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende usar dicho polipéptido o una sal del mismo.
35. Un kit para explorar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende dicho polipéptido o una sal del mismo.
- 20 36. Un medicamento que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 10, o su amida, o una sal del mismo.
37. Un medicamento que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 o 14.
38. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 36 o 37, que es un agente para su uso en prevención/tratamiento de hipotensión, obesidad, letargo o síndrome de cambio de zona horaria.
- 25 39. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 36 o 37, que es un agente para su uso en la prevención/tratamiento de esterilidad.
40. Un medicamento que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, o una sal del mismo.
41. Un medicamento que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 21.
- 30 42. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 40 o 41, que es un agente para su uso en la prevención/tratamiento de síntomas de la menopausia o hipertiroidismo.
43. Un anticuerpo para el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 10, o su amida, o una sal del mismo.
44. Un polinucleótido antisentido, que comprende la secuencia de bases completa complementaria del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 o 14.
45. Un anticuerpo para el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, o su amida, o una sal del mismo.
- 35 46. Un polinucleótido antisentido que comprende la secuencia de bases completa complementaria del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 21.
47. Un animal transgénico no humano que porta el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, 14 o 21, que es exógeno.
- 40 48. El vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 17 y 24, que es exógeno, y capaz de expresarse en un animal no humano.
49. Una célula madre embrionaria de mamífero no humano, en la que el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, 14 o 21 está inactivado.
50. Un mamífero no humano deficiente en expresión del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, 14 o 21, en el que dicho polinucleótido está inactivado.