

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 759 374**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑳ N° d'enregistrement national : **97 01692**

⑤① Int Cl⁶ : C 07 K 14/705, C 07 K 16/28, C 12 N 15/12, 15/86, 5/
10, C 07 H 21/00, A 61 K 38/17

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.02.97.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.08.98 Bulletin 98/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM ETA-
BLISS PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

⑦② Inventeur(s) : ALLARD JULIEN, BARRON SONIA,
SOKOLOFF PIERRE et SCHWARTZ JEAN CHARLES.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ POLYPEPTIDE A ACTIVITE DE RECEPTEUR OB25 SPECIFIQUE DES CELLULES MYELINISANTES CHEZ LE
RAT, APPLICATION AU CRIBLAGE DE MEDICAMENTS ET MEDICAMENTS.

⑤⑦ Polypeptide ayant une activité de récepteur OB25 spé-
cifique des cellules myélinisantes chez le rat et séquence
codant pour ce polypeptide. Des hôtes cellulaires transfor-
més par des vecteurs dans lequel ont été insérés tout ou
partie desdites séquences expriment le polypeptide selon
l'invention.

Application du polypeptide selon l'invention à l'obtention
d'anticorps, à la réalisation de médicaments, de sondes nu-
cléotidiques de diagnostic et de sélection de médicaments,
au criblage de médicaments destinés, notamment au trai-
tement d'affections neurologiques ou métaboliques affectant
principalement les cellules productrices de la myéline.

FR 2 759 374 - A1



La présente invention concerne un polypeptide ayant une activité de récepteur spécifique des cellules myélinisantes chez le rat, dénommé récepteur OB25.

Elle concerne également la séquence nucléotidique codant pour ce polypeptide ainsi que des vecteurs comprenant ladite séquence et des hôtes cellulaires transformés susceptibles d'exprimer ledit polypeptide et notamment les gènes codant pour le récepteur contenant ou constitué par ledit polypeptide, ces hôtes cellulaires permettant d'étudier l'activité d'agoniste ou d'antagoniste dudit récepteur.

L'invention est encore relative à des sondes nucléotidiques susceptibles de se fixer par hybridation sur ladite séquence ou la séquence complémentaire, le transcrit ou les gènes codant pour ledit polypeptide et destinées au diagnostic et à la sélection de médicaments utilisables dans le traitement de maladies neurologiques ou métaboliques, notamment pour le traitement de maladies de la myéline, de maladies neuromusculaires.

L'invention a également trait à des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, dirigés contre ledit polypeptide.

Elle concerne aussi des moyens de criblage de candidats médicaments, permettant notamment d'étudier l'affinité de substances candidates pour ledit polypeptide.

Enfin, l'invention a trait à des médicaments destinés notamment au traitement d'affections neurologiques ou métaboliques affectant principalement les cellules productrices de la myéline, notamment la sclérose en plaques ou les gliomes, les maladies neuro-musculaires, contenant une substance ayant une affinité élevée pour ledit polypeptide à activité de récepteur spécifique des cellules myélinisantes chez le rat ou

encore des substances ayant une activité sur des cellules transfectées par une séquence codant pour ledit polypeptide.

Les maladies de la myélinisation peuvent être acquises suite à une inflammation ou à une infection, être d'origine nutritionnelle ou toxique, secondaires à une affection neuronale ou bien encore à déterminants
5 génétiques.

Les voies de traitement connues à ce jour pour les maladies de la myélinisation sont essentiellement symptomatiques (anti-inflammatoires).

Dans le traitement de ces maladies profondément handicapantes, l'un des objectifs est d'obtenir une stimulation de la synthèse et de la
10 production de myéline ou bien la multiplication ou la différenciation des cellules produisant la myéline (oligodendrocytes et cellules de Schwann). La réalisation de cet objectif se heurte au fait qu'il n'existe que très peu de facteurs connus susceptibles de moduler spécifiquement l'activité des
15 cellules productrices de myéline.

Les gènes impliqués dans la synthèse, l'enroulement ou la compaction de la myéline constituent, à l'évidence, des gènes candidats dans les affections démyélinisantes pour lesquelles une composante
génétique est évoquée ou avérée, et dont le locus reste à identifier.

Il y a donc un intérêt pour le diagnostic et le traitement des
20 maladies neuromusculaires, notamment des maladies de la myéline, à utiliser un récepteur exprimé sélectivement par les cellules productrices de myéline et ses ligands naturels ou synthétiques.

La présente invention répond à ce besoin en fournissant des
25 moyens utiles à des fins de diagnostic et de traitement des maladies de la myélinisation.

L'invention a ainsi pour objet un polypeptide ayant une activité de récepteur spécifique des cellules myélinisantes chez le rat, dénommé récepteur OB25.

5 Celui-ci est constitué par ou comprend tout ou partie de la séquence d'acides aminés de rat définie dans l'identificateur de séquence SEQ ID N° 2 ou une séquence homologue contenant le ou les sites faisant partie de ladite séquence peptidique dont la présence est nécessaire pour que le polypeptide ait les mêmes caractéristiques pharmacologiques que le récepteur OB25 ou pour qu'il soit reconnu par
10 des anticorps qui reconnaissent également la séquence d'acides aminés précitée.

Cette homologie peut être une homologie d'espèce ou une homologie correspondant à des mutations artificielles ou spontanées de nature ponctuelle et ne modifiant pas les propriétés essentielles du
15 polypeptide et notamment son activité sur le récepteur OB25.

Le polypeptide selon l'invention a été obtenu par criblage d'une banque d'ADN copie de bulbe olfactif de rat en utilisant des sondes nucléotidiques codant pour des récepteurs de la famille des récepteurs heptahéliques couplés aux protéines G.

20 De manière inattendue, les inventeurs ont établi que ledit polypeptide est sélectivement exprimé dans les cellules productrices de myéline, à savoir les cellules de Schwann et les oligodendrocytes et que son expression au cours du développement est en accord avec un rôle dans la myélinisation.

25 Le polypeptide selon l'invention peut être utilisé en étant isolé ou fixé sur des supports, d'une façon tout-à-fait classique, ou encore en étant

réuni à des séquences d'acides aminés sans relation avec le récepteur OB25.

La présente invention a également pour objet les acides nucléiques constitués par ou comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide selon l'invention, ainsi que les acides
5 nucléotidiques homologues.

Ayant établi la séquence codante du récepteur OB25 (donnée dans la liste de séquences annexée), les inventeurs ont constaté que celle-ci est homologue (82.8% d'identité en nucléotides) à une séquence obtenue
10 chez le Mouton, apparaissant dans la base Genbank sous le code d'accès N°U18405. Les informations accompagnant cette séquence n'indiquent qu'une structure compatible avec un couplage à une protéine G, mais aucune fonction ni utilisation pratique de cette séquence n'est suggérée.

15 De même, I. Masana et coll. (Receptors and Channels, 1995, 3 : 255-262) décrivent le clonage de l'ADNc de mouton correspondant à cette séquence et l'expression dans une cellule CHO dont le pouvoir de division en présence de sérum paraît accru. Cette réponse mitogène est commune à de nombreux récepteurs recombinants de la même
20 superfamille et ne suggère en rien la fonction ni l'utilisation pratique du récepteur exprimé dans ce système artificiel.

Une portion de la séquence codante du récepteur OB25 est également homologue (91.1% d'identité en nucléotides) à une séquence humaine (Code d'accès à Genbank N° HSC1CG081), obtenue par
25 séquençage systématique d'ADN complémentaires (Expressed Sequence Tags), sans que la correspondance avec un fragment de récepteur ni, a fortiori, qu'aucune fonction lui soit attribuée.

Des acides nucléiques selon l'invention sont notamment des acides nucléiques comprenant ou constitués par la séquence SEQ ID N° 1 de la liste de séquences annexée ou des fragments de celle-ci.

5 Parmi les acides nucléiques selon l'invention, ceux constitués par la séquence s'étendant du nucléotide en position 152 au nucléotide en position 1243 de la séquence SEQ ID N° 1 annexée sont particulièrement intéressants.

10 Les acides nucléiques homologues selon l'invention peuvent comporter des variations propres à la dégénérescence du code ainsi que des mutations localisées dans la mesure où les acides nucléiques variants s'hybrident avec les sondes susceptibles de s'hybrider, de façon spécifique, avec la séquence SEQ ID N° 1.

15 D'autres acides nucléiques homologues selon l'invention sont des acides nucléiques présentant une homologie d'espèce et qui sont tels qu'ils peuvent être identifiés et clonés par les méthodes classiques grâce à l'utilisation de sondes nucléotidiques constituées par ou comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 1 ou des séquences de Genebank N° U18405 ou N° HSC1CG081.

20 Ces acides nucléiques, une fois clonés, peuvent être séquencés de manière usuelle.

De telles séquences d'acides nucléiques homologues comprennent notamment les séquences d'origine ovine ou humaine constituées par ou contenant tout ou partie de la séquence Genebank N° U18405 ou de la séquence N° HSC1CG081.

25 Les acides nucléiques selon l'invention peuvent être obtenus par synthèse chimique classique d'acide nucléique, par répllication dans des vecteurs qui les contiennent ou par tout autre moyen, et notamment

multiplication par le procédé PCR à partir d'une faible quantité d'acide nucléique selon l'invention.

L'invention a également pour objet les vecteurs recombinants, utilisables pour le clonage ou pour l'expression des acides nucléiques, et
5 contenant un acide nucléique selon l'invention, tel que des plasmides, des phages ou virus contenant la séquence selon l'invention en un site non essentiel pour la réplication.

Les vecteurs selon l'invention peuvent contenir, le cas échéant, les éléments nécessaires pour l'expression dans un hôte cellulaire tels que
10 promoteur, codon d'initiation, terminateur, séquence signal ou séquence d'ancrage ou tout autre élément utile à la régulation.

L'invention a également pour objet les hôtes cellulaires transformés par un vecteur selon l'invention et susceptibles d'exprimer le polypeptide selon l'invention de façon à présenter à la surface membranaire un ou
15 plusieurs sites spécifiques du vecteur OB25.

Ces hôtes peuvent être des cellules en culture telles que CHO (Chinese Hamster Ovary), COS ou encore PC12.

L'invention a encore pour objet l'utilisation des acides nucléiques selon l'invention pour cloner puis séquencer des séquences d'acides
20 nucléiques ovine ou humaine et notamment les gènes des récepteurs ovin et humain présentant chez le mouton ou l'homme une activité correspondant à celle du récepteur OB25 chez le rat.

La détermination de ces séquences permet, par recombinaison génétique, d'exprimer les récepteurs ovin ou humain et de les utiliser pour
25 l'induction d'anticorps et le criblage de médicaments pour le traitement d'affections neurologiques ou métaboliques affectant principalement les

cellules productrices de la myéline, telles que la sclérose en plaques ou les gliomes, ou des maladies neuromusculaires.

L'invention a aussi pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le récepteur OB25.

5 Ces anticorps sont obtenus par induction à partir d'un polypeptide selon l'invention, comprenant la totalité ou une partie de la séquence donnée en annexe, ou de toutes autres séquences comprenant des sites polypeptidiques suffisamment proche de ladite séquence pour que les anticorps ainsi fabriqués reconnaissent cette dernière.

10 Ces anticorps peuvent être obtenus par injections sous-cutanées répétées d'un mélange d'adjuvant de Freund et d'un polypeptide selon l'invention ou d'un fragment de ce polypeptide fusionné ou couplé avec une protéine courante telle que sérum albumine, ovalbumine.

15 Les anticorps selon l'invention sont utiles, par exemple, pour diagnostiquer par réaction anticorps-antigène mise en évidence à l'aide d'une technique de révélation classique, une prolifération de cellules exprimant le récepteur OB25 ou la présence d'un anticorps endogène dans une maladie auto-immune.

20 L'invention a pour objet des sondes nucléotidiques susceptibles de se fixer par hybridation sur la séquence complémentaire, le transcrit ou le gène codant pour le polypeptide.

25 Les sondes sont constituées d'une partie ou de la totalité de la séquence donnée en annexe, ou de toutes autres séquences homologues, telles que ces dernières hybrideraient avec la séquence en annexe.

Les sondes sont utilisées de façon classique en étant mise en contact, dans les conditions usuelles, avec des préparations présentant

des acides nucléiques suspectés de présenter une anomalie. Elles peuvent aussi être utilisées, par exemple, pour détecter une expression pathologique du récepteur OB25 en révélant la présence de son ARN messenger.

5 Le polypeptide et les acides nucléiques selon l'invention peuvent être utilisés pour le diagnostic et la mise au point de médicaments destinés au traitement d'affections de la myéline chez l'homme comme il est décrit ci-après.

10 L'invention fournit ainsi un procédé de criblage de médicaments destinés au traitement d'affections neurologiques ou métaboliques affectant principalement les cellules productrices de la myéline, telles que la sclérose en plaques ou les gliomes, ou des maladies neuromusculaires.

15 Le criblage d'un médicament peut utiliser la capacité de la molécule candidate à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un polypeptide selon l'invention.

20 Il consiste, par exemple, à mettre en contact, dans un milieu convenable, la molécule candidate avec les membranes d'un hôte cellulaire transformé par un vecteur comprenant un insert codant pour un tel polypeptide et susceptible d'exprimer ledit polypeptide de façon à présenter à la surface membranaire un ou plusieurs sites spécifiques du récepteur OB25, de manière telle que la liaison spécifique du ligand candidat puisse être évaluée ou indirectement estimée, par exemple en détectant l'éventuel complexe ligand-polypeptide.

25 Ce procédé peut également comprendre la mesure d'une réponse induite par la liaison avec la cellule, telle que par exemple la production

d'AMP cyclique de façon à permettre de différencier les molécules qui se comportent comme des agonistes ou comme des antagonistes.

Dans ce but de criblage, on peut également utiliser un procédé déterminant l'affinité du récepteur OB25 pour des ligands déterminés, dans lequel on cultive l'hôte cellulaire transformé exprimant le polypeptide correspondant, après quoi on met la culture cellulaire en contact avec le ligand déterminé et on vérifie s'il se forme une liaison spécifique entre l'hôte cellulaire et le ligand, notamment par des tests de radioliasion de préférence, de mesure de taux de production ou de libération d'un indicateur convenable tel que l'AMP cyclique, ou ions intracellulaires, ces derniers tests permettant de distinguer et de définir les agonistes et leur caractère partiel, ainsi que les antagonistes.

L'invention fournit aussi un procédé de criblage de ligands marqués, tels que ligands radioactifs ou fluorescents dans lequel on mesure la liaison spécifique de ligands candidats avec la membrane d'une cellule transformée par un vecteur comprenant un insert codant pour un polypeptide et susceptible d'exprimer ledit polypeptide de façon à exprimer à la surface membranaire un ou plusieurs sites spécifiques de ce polypeptide de manière telle que la liaison spécifique du ligand candidat puisse être évaluée ou indirectement estimée.

On peut également utiliser un hôte cellulaire transformé comme précédemment décrit, pour exprimer et présenter dans sa membrane le récepteur OB25 pour identifier le ligand endogène du récepteur OB25. Ce ligand peut être utilisé pour synthétiser des analogues pour servir à la mise au point ou au criblage de médicaments interagissant avec le récepteur OB25. Le ligand endogène peut être utilisé pour générer des

anticorps utilisables en diagnostic ou thérapeutique pour diminuer son action sur les cellules productrices de myéline.

L'invention a ainsi pour objet un procédé d'identification de tissus ou cellules exprimant spontanément à leur surface membranaire le polypeptide, tel que lesdits tissus ou cellules puissent servir à la mise au point de médicaments ou ligands marqués.

L'invention a encore pour objet des médicaments contenant, dans une dose prévue pour être administrée, une quantité thérapeutiquement efficace d'une substance active sur un polypeptide ayant une activité de récepteur OB25, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

On peut ainsi prévoir l'injection d'anticorps dirigés contre les polypeptides selon l'invention ou des homologues de ceux-ci, notamment chez le mouton ou chez l'homme, comme défini précédemment.

On peut également prévoir l'administration de médicaments sélectionnés par les procédés de criblage décrits ci-dessus.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture de la description suivante donnée à titre illustratif et non limitatif.

20 1. Clonage du récepteur OB25.

On a criblé une banque d'ADN copie de bulbe olfactif de Rat (Stratagene, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux) dans des conditions de stringence basse avec un mélange de sondes ADN marquées au ^{32}P codant pour les récepteurs heptahéliques de la dopamine, le récepteur D_2 de rat (nucléotides 172-1191), le récepteur D_2 de Xénope (nucléotides 76-1273), le récepteur D_3 (nucléotides 196-1242) et le récepteur D_4 de rat (nucléotides 306-635 et 985-1125). Sept clones correspondant à une

nouvelle et même séquence codante ont été isolés. La séquence nucléotidique du clone OB25 comporte 1543 bases, code pour un récepteur de 364 acides aminés dont les homologues avec l'ensemble des récepteurs connus permettent de conclure qu'il fait partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G.

2. Expression du récepteur OB25 dans les cellules CHO.

10 Le vecteurs d'expression dérivent du plasmide SV-D2 (Sokoloff, et al., Nature, 347 :146-151, 1990). Pour exprimer le récepteur OB25, le fragment de restriction HindIII-BamHI du pSVD2 est remplacé par un fragment HindIII-BamHI du plasmide Bluescript OB25 issu du criblage de la banque de d'ADN copie. Cette construction est cultivée puis le plasmide extrait et purifié (Birnboim, Enzymol., 100:243-255, 1983). Des 15 cellules d'Ovaire de Hamster Chinois déficientes en dihydrofolate réductase sont alors transfectées en utilisant la DOTAP (Boehringer, Mannheim). Les transfectants stables sont sélectionnés dans un milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sans hypoxanthine et sans 20 thymidine.

3. Expression du récepteur OB25 dans les cellules PC12.

Le vecteur d'expression est constitué du fragment HindIII-XbaI du plasmide Bluescript contenant la séquence du récepteur OB25 inséré 25 dans le plasmide Rc/CMV (Invitrogen, San Diego) préalablement digéré par les enzymes HindIII et XbaI. Les cellules PC12 sont transfectées par électroporation (Potter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:7161-7165,

1984), puis sélectionnées dans un milieu de culture contenant de la néomycine.

4. Expression au cours du développement.

- 5 Des hybridations in situ sont pratiquées chez le rat à différents stades du développement. Pour cela, on utilise des coupes (10 μ M) fixés au paraformaldéhyde 4% pendant 40 min. Ces coupes sont hybridées avec une ribosonde codant pour la séquence inverse complémentaire du fragment PstI, située dans la partie 5' de la séquence de l'ARN messenger
- 10 du récepteur OB25, marquée avec de l'UTP-³³P (Simmons, et al., J. Histotechnol., 12:169-181, 1989). Après l'hybridation, les coupes sont exposées 3 semaines contre des films β -max.

Pour connaître les variations au cours du développement du récepteur OB25, des ARN messagers sont préparés à partir de cerveau de rats à

15 différent âges postnataux (RNABLE®, Eurobio, Les Ullis). Des échantillons (10 μ g) sont dénaturés, soumis à une électrophorèse sur agarose, transférés sur des membranes de nitrocellulose puis hybridées en utilisant un fragment de 520 pb marqué au ³²P obtenu par amplification par PCR de la partie 5' de la séquence d'ADN codant pour le récepteur.

- 20 L'expression du transcrit croit du 1^{er} au 21^{ème} jour après la naissance puis diminue légèrement et se maintient. Cette augmentation du transcrit est parallèle à la phase de myélinisation. La MBP, la PLP et la CNPase, marqueurs spécifiques de la myéline, ont un développement temporel pratiquement identique (Kanfer, et al., J. Mol. Neurosci., 1:39-46, 1989).
- 25 Le développement spatial se fait selon un gradient caudo-rostral, identique une fois de plus à celui de la MBP.

5. Expression du récepteur chez l'adulte.

L'hybridation simple montre que le récepteur est uniquement localisé dans la substance blanche au niveau central. Des expériences de colocalisation ont utilisé une 2^{ème} sonde codant pour un marqueur des oligodendrocytes, la protéine basique de la myéline, marquée par de l'UTP-DIG et révélée par la phosphatase alcaline (Miller, et al., J. Histochem. and Cytochem., 41:1741-1750, 1993). Le récepteur OB25 apparaît localisé exclusivement dans les oligodendrocytes. Il apparaît aussi au niveau périphérique dans la racine des nerfs moteurs, l'isle du rein, le thymus.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Polypeptide à activité de récepteur OB25 spécifique des cellules myélinisantes chez le rat, application au criblage de médicaments et médicaments

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1543 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADnc

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: récepteur OB25 chez le rat

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 152..1243

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CACGAGCAGC CGCCCCGCGT CTCCTGCCCT TTGCCAGGC TTTCAGTTCC TCCTAGCATG	60
ACTGAGATCT GACCAGCCGA CTCACGAGTT GCTTCTTGTG CCACCACTGC AGTGCTGGGG	120
CCTCTTCATC GCTCCAAACT ACAGCACTGT C ATG GCA GCT GCC TCT ACT TCC	172
Met Ala Ala Ala Ser Thr Ser	
1 5	
AGC CCT GTG ATT TCA CAG CCC CAG TTC ACA GCC ATG AAC GAA CAA CAG	220
Ser Pro Val Ile Ser Gln Pro Gln Phe Thr Ala Met Asn Glu Gln Gln	
10 15 20	
TGC TTC TAC AAC GAG TCT ATC GCC TTC TTC TAT AAC CGG AGT GGA AAG	268

Cys	Phe	Tyr	Asn	Glu	Ser	Ile	Ala	Phe	Phe	Tyr	Asn	Arg	Ser	Gly	Lys		
	25					30					35						
TAT	CTA	GCC	ACA	GAA	TGG	AAC	ACT	GTG	AGC	AAG	CTG	GTG	ATG	GGA	CTG		316
Tyr	Leu	Ala	Thr	Glu	Trp	Asn	Thr	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Met	Gly	Leu		
	40				45					50					55		
GGC	ATC	ACT	GTC	TGC	GTG	TTC	ATC	ATG	CTG	GCC	AAT	CTA	CTG	GTC	ATG		364
Gly	Ile	Thr	Val	Cys	Val	Phe	Ile	Met	Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Met		
				60					65					70			
GTG	GCA	ATT	TAC	GTC	AAC	CGC	CGC	TTC	CAT	TTC	CCT	ATT	TAT	TAC	TTG		412
Val	Ala	Ile	Tyr	Val	Asn	Arg	Arg	Phe	His	Phe	Pro	Ile	Tyr	Tyr	Leu		
			75					80						85			
ATG	GCC	AAC	CTG	GCT	GCT	GCA	GAC	TTC	TTC	GCT	GGA	CTG	GCC	TAC	TTC		460
Met	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Phe	Phe	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe		
		90					95					100					
TAC	CTG	ATG	TTC	AAC	ACG	GGA	CCT	AAT	ACC	CGG	AGA	CTG	ACC	GTG	AGC		508
Tyr	Leu	Met	Phe	Asn	Thr	Gly	Pro	Asn	Thr	Arg	Arg	Leu	Thr	Val	Ser		
	105					110					115						
ACA	TGG	CTT	CTC	CGG	CAG	GGC	CTC	ATC	GAC	ACC	AGC	CTG	ACG	GCT	TCT		556
Thr	Trp	Leu	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Ile	Asp	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Ser		
	120				125					130					135		
GTG	GCC	AAC	CTG	CTG	GCC	ATT	GCC	ATC	GAG	AGG	CAC	ATC	ACA	GTT	TTC		604
Val	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Ile	Ala	Ile	Glu	Arg	His	Ile	Thr	Val	Phe		
					140				145						150		
CGA	ATG	CAG	CTC	CAT	ACA	CGA	ATG	AGC	AAC	CGA	CGT	GTG	GTG	GTG	GTG		652
Arg	Met	Gln	Leu	His	Thr	Arg	Met	Ser	Asn	Arg	Arg	Val	Val	Val	Val		
			155					160						165			
ATT	GTA	GTC	ATC	TGG	ACT	ATG	GCC	ATT	GTG	ATG	GGT	GCC	ATA	CCC	AGT		700
Ile	Val	Val	Ile	Trp	Thr	Met	Ala	Ile	Val	Met	Gly	Ala	Ile	Pro	Ser		
		170					175					180					
GTG	GGC	TGG	AAC	TGC	ATC	TGT	GAT	ATC	GAT	CAT	TGT	TCC	AAC	ATG	GCG		748
Val	Gly	Trp	Asn	Cys	Ile	Cys	Asp	Ile	Asp	His	Cys	Ser	Asn	Met	Ala		
	185					190					195						
CCC	CTC	TAC	AGT	GAC	TCC	TAC	TTA	GTC	TTC	TGG	GCC	ATT	TTC	AAC	CTG		796
Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Ser	Tyr	Leu	Val	Phe	Trp	Ala	Ile	Phe	Asn	Leu		
					205					210					215		
GTG	ACC	TTT	GTG	GTC	ATG	GTG	GTT	CTC	TAC	GCT	CAC	ATC	TTT	GGC	TAT		844
Val	Thr	Phe	Val	Val	Met	Val	Val	Leu	Tyr	Ala	His	Ile	Phe	Gly	Tyr		
				220					225					230			
GTT	CGC	CAG	AGG	ACT	ATG	AGA	ATG	TCC	CGG	CAT	AGT	TCT	GGA	CCC	AGG		892
Val	Arg	Gln	Arg	Thr	Met	Arg	Met	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Gly	Pro	Arg		
			235					240						245			
AGG	AAT	CGG	GAC	ACC	ATG	ATG	AGC	CTT	CTG	AAG	ACT	GTG	GTC	ATT	GTG		940
Arg	Asn	Arg	Asp	Thr	Met	Met	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Val	Val	Ile	Val		
			250					255						260			

CTG GGT GCC TTT ATT GTC TGC TGG ACT CCG GGA TTG GTC TTG CTA CTG 988
 Leu Gly Ala Phe Ile Val Cys Trp Thr Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu
 265 270 275

CTC GAT GTG TGT TGC CCG CAG TGC GAT GTC CTG GCC TAT GAG AAG TTC 1036
 Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp Val Leu Ala Tyr Glu Lys Phe
 280 285 290 295

TTC CTC CTC CTG GCC GAG TTC AAC TCT GCT ATG AAC CCC ATC ATC TAC 1084
 Phe Leu Leu Leu Ala Glu Phe Asn Ser Ala Met Asn Pro Ile Ile Tyr
 300 305 310

TCC TAC CGC GAC AAA GAG ATG AGC GCC ACC TTC AGG CAG ATC CTG TGT 1132
 Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Met Ser Ala Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys
 315 320 325

TGC CAG CGC AAC GAG AAC CCC AAC GGC CCC ACG GAA GGC TCT GAC AGC 1180
 Cys Gln Arg Asn Glu Asn Pro Asn Gly Pro Thr Glu Gly Ser Asp Ser
 330 335 340

TCG GCC TCC TCC CTC AAC CAC ACT ATT CTG GCT GGA GTT CAC AGC AAT 1228
 Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile Leu Ala Gly Val His Ser Asn
 345 350 355

GAC CAC TCT GTG GTT TAGAAGGAAG CCAGCCGGCC TTTGTGGATT TGTGAACCCC 1283
 Asp His Ser Val Val
 360

ACCCCTACCCG CATTGCCAGG GCAAGGTGGG GCGCCAGAGG AGACGAAGAC ACTCCTGTAC 1343

TTAACACTAA CCAATGGCAG TATTTGTCCC TAGACCCAAG AGACTTTAGG ATGAACTTGC 1403

TTGGTAGCCC CCATCTTCTC CTTTGAAAA GAGAAGGGGA CCGTCTTGCA GTGGAATTCA 1463

GAAACGGACT CTGGGGAGAC CGTGTATGTA GCCTTCACTA ACTAGACTTA AAAGATTTTA 1523

TGTGTTTGG CCTAAGCCAG 1543

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 364 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Ala Ala Ser Thr Ser Ser Pro Val Ile Ser Gln Pro Gln Phe
 1 5 10 15

Thr Ala Met Asn Glu Gln Gln Cys Phe Tyr Asn Glu Ser Ile Ala Phe
 20 25 30

Phe Tyr Asn Arg Ser Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Glu Trp Asn Thr Val
 35 40 45

Ser Lys Leu Val Met Gly Leu Gly Ile Thr Val Cys Val Phe Ile Met
 50 55 60

Leu Ala Asn Leu Leu Val Met Val Ala Ile Tyr Val Asn Arg Arg Phe
 65 70 75 80

His Phe Pro Ile Tyr Tyr Leu Met Ala Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe
 85 90 95

Phe Ala Gly Leu Ala Tyr Phe Tyr Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Asn
 100 105 110

Thr Arg Arg Leu Thr Val Ser Thr Trp Leu Leu Arg Gln Gly Leu Ile
 115 120 125

Asp Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Asn Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 130 135 140

Glu Arg His Ile Thr Val Phe Arg Met Gln Leu His Thr Arg Met Ser
 145 150 155 160

Asn Arg Arg Val Val Val Val Ile Val Val Ile Trp Thr Met Ala Ile
 165 170 175

Val Met Gly Ala Ile Pro Ser Val Gly Trp Asn Cys Ile Cys Asp Ile
 180 185 190

Asp His Cys Ser Asn Met Ala Pro Leu Tyr Ser Asp Ser Tyr Leu Val
 195 200 205

Phe Trp Ala Ile Phe Asn Leu Val Thr Phe Val Val Met Val Val Leu
 210 215 220

Tyr Ala His Ile Phe Gly Tyr Val Arg Gln Arg Thr Met Arg Met Ser
 225 230 235 240

Arg His Ser Ser Gly Pro Arg Arg Asn Arg Asp Thr Met Met Ser Leu
 245 250 255

Leu Lys Thr Val Val Ile Val Leu Gly Ala Phe Ile Val Cys Trp Thr
 260 265 270

Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp
 275 280 285

Val Leu Ala Tyr Glu Lys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Glu Phe Asn Ser
 290 295 300

Ala Met Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Met Ser Ala
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys Cys Gln Arg Asn Glu Asn Pro Asn Gly
 325 330 335

Pro Thr Glu Gly Ser Asp Ser Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile
 340 345 350

Leu Ala Gly Val His Ser Asn Asp His Ser Val Val
 355 360

REVENDEICATIONS

1. Polypeptides ayant une activité de récepteur OB25, spécifique des cellules myélinisantes chez le rat, constitués par ou comprenant tout ou partie de la séquence de 364 acides aminés de rat définie dans
5 l'identificateur de séquence SEQ ID N° 2 de la liste de séquence annexée ou une séquence homologue contenant le ou les sites faisant partie de ladite séquence dont la présence est nécessaire pour que ledit polypeptide ait les mêmes caractéristiques pharmacologiques que le récepteur OB25 ou pour qu'il soit reconnu par des anticorps qui
10 reconnaissent également la séquence d'acides aminés précitée.

2. Acides nucléiques contenant ou constitués par tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide selon la revendication 1, ainsi que les acides nucléiques homologues.
15

3. Acides nucléiques comprenant ou constitués par la séquence codante SEQ ID N° 1 ou des fragments de celle-ci.

4. Acides nucléiques selon la revendication 3, constitués par la séquence
20 s'étendant du nucléotide en position 152 au nucléotide en position 1243 de la séquence SEQ ID N° 1.

5. Vecteur recombinant, utilisable pour le clonage ou l'expression des acides nucléiques, contenant un acide nucléique selon l'une quelconque
25 des revendications 2 à 4.

6. Hôtes cellulaires transformés par un vecteur selon la revendication 5 et susceptible d'exprimer la séquence codant pour la synthèse d'un polypeptide selon la revendication 1.
- 5 7. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre un polypeptide selon la revendication 1.
8. Sondes nucléotidiques comprenant ou constituées par tout ou partie de la séquence nucléotidique donnée à l'identificateur de séquence SEQ ID
10 N° 1, ou des séquences homologues pouvant s'hybrider avec ladite séquence ou la séquence complémentaire, le transcrit ou le gène codant pour un polypeptide selon la revendication 1.
9. Sondes selon la revendication 8, pour le diagnostic ou le traitement
15 d'affections neurologiques ou métaboliques, affectant principalement les cellules produisant la myéline comme la sclérose en plaques ou les gliomes.
10. Procédé de criblage de médicaments destinés aux traitements
20 d'affections neurologiques ou métaboliques affectant principalement les cellules productrices de la myéline ou d'affections neuromusculaires, dans lequel on met en contact, dans un milieu convenable, une molécule candidate avec les membranes d'un hôte cellulaire transformé par un vecteur comprenant un insert codant pour un polypeptide selon la
25 revendication 1 et susceptible d'exprimer ledit polypeptide de façon à présenter à la surface membranaire un ou plusieurs sites spécifiques de

ce polypeptide, l'éventuel complexe ligand-polypeptide qui se forme étant alors détecté.

5 11. Procédé de criblage de médicaments destinés aux traitements d'affections neurologiques ou métaboliques, affectant principalement les cellules produisant la myéline comme la sclérose en plaques ou les gliomes, dans lequel on mesure une réponse induite par la liaison d'une molécule candidate avec une cellule, transformée par un vecteur comprenant un insert codant pour un polypeptide selon la revendication 1
10 et susceptible d'exprimer ledit polypeptide de façon à présenter à la surface membranaire un ou plusieurs sites spécifiques de ce polypeptide de telle manière que la mesure d'un signal, tel que la production d'AMP cyclique, permette de différencier les molécules qui se comportent comme des antagonistes ou des agonistes.

15

12. Procédé de criblage de ligands marqués, tels que ligands radioactifs ou fluorescents dans lequel on mesure la liaison spécifique de ligands candidats avec la membrane d'une cellule transformée par un vecteur comprenant un insert codant pour un polypeptide selon la revendication
20 1 et susceptible d'exprimer ledit polypeptide de façon à exprimer à la surface membranaire un ou plusieurs sites spécifiques de ce polypeptide de manière telle que la liaison spécifique du ligand candidat puisse être évaluée ou indirectement estimée.

25 13. Procédé d'identification de tissus ou cellules exprimant spontanément à leur surface membranaire le polypeptide selon la revendication 1, tel

que lesdits tissus ou cellules puissent servir à la mise au point de médicaments ou ligands marqués selon les revendications 10 à 12.

- 5 14. Médicament contenant, dans une dose prévue pour être administrée, une quantité thérapeutiquement efficace d'une substance active sur un polypeptide ayant une activité de récepteur OB25, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JONATHAN H. HECHT ET AL.: "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY., vol. 135, no. 4, novembre 1996, LER UNIVERSITY PRESS US, pages 1071-1083, XP002046888 * abrégé * * page 1073, colonne de gauche, alinéa 7 - colonne de droite, alinéa 2 * * page 1073, colonne de droite, dernier alinéa - page 1075, colonne de gauche, alinéa 2; figure 2 * * page 1080, colonne de droite, alinéa 3 - page 1081, colonne de droite, alinéa 2 *	1-14
X	WO 96 39436 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 12 décembre 1996 * page 7, alinéa 2 - page 9, alinéa 1 * * page 9, dernier alinéa - page 33, alinéa 4 * * séquences SEQ ID NO.: 1 et 2 *	1,2,5-14
X	WO 97 00952 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 9 janvier 1997 * page 1, ligne 34 - page 2, ligne 7 * * page 4, ligne 28 - page 9, ligne 23 * * séquences SEQ ID NO. 1 et 2 *	1,2,5-9, 12-14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N C07K C12Q G01N A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 novembre 1997		Montero Lopez, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P/MC13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	M.I. MASANA ET AL.: "Cloning and characterization of a new member of the G-protein coupled receptor EDG family" RECEPTORS AND CHANNELS, vol. 3, 1995, pages 255-262, XP000610109 * abrégé * * page 256, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 3; figure 1 * * page 257, colonne de gauche, alinéa 3 - page 260, colonne de droite, alinéa 4 * ---	1,2,5-8
D,X	Base de données EMBL entrée OA405 Code d'accès U18405; 28 Décembre 1994 MASANA M.I. ET AL.: "Cloning and characterization of a new member of the G-protein coupled receptor edg family." XP002046891 * le document en entier * ---	3,5,8
D,X	Base de données EMBL entrée HSC1CG081 Code d'accès F06566; 15 Février 1995 AUFFRAY C. ET AL.: "The Genexpress cDNA program" XP002046892 * le document en entier * ---	3,5,8
X	Base de données EMBL entrée HSU78192 Code d'accès U78192; 7 Décembre 1996 ZONDAG G.C.M. ET AL.: "Cloning and characterization of the human Edg-2 receptor." XP002046893 * le document en entier * ---	3,5,8
A	WO 91 06557 A (US ARMY) 16 mai 1991 * le document en entier * ---	1-14
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 novembre 1997		Montero Lopez, B
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 (03.92) (P/M/C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 539517
FR 9701692

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	YUSTA, BERNARDO ET AL: "Evidence for the presence of nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptors in secondary cultures of pure rat oligodendrocytes" ENDOCRINOLOGY (BALTIMORE) (1988), 122(5), 2278-84 CODEN: ENDOAO;ISSN: 0013-7227, 1988, XP002046889 * abrégé * * page 2281, colonne de gauche, alinéa 2 - page 2283, colonne de gauche, alinéa 4 * ---	1-14
A	JUNG-TESTAS, I. ET AL: "Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells" J. STEROID BIOCHEM. MOL. BIOL. (1996), 58(1), 77-82 CODEN: JSBBEZ;ISSN: 0960-0760, 1996, XP002046890 * abrégé * * page 81, colonne de droite, alinéa 1 - page 82, colonne de gauche, alinéa 2 * ---	1-14
A	MALEK-HEDAYAT S ET AL: "Cloning and sequence of the cDNA encoding the rat oligodendrocyte integrin beta1 subunit" GENE, vol. 158, no. 2, 9 juin 1995, page 287-290 XP004042267 * abrégé * -----	1-14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 novembre 1997		Montero Lopez, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		

1

EPO FORM 1503 03.02 (P04C13)