

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-505264

(P2005-505264A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

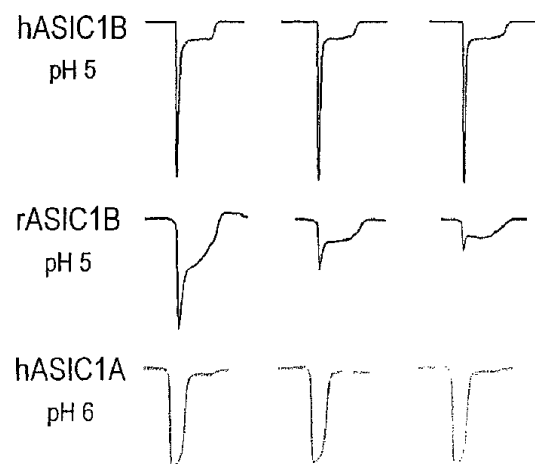
(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 3/10	4 B O 6 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/10	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 146 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-514006 (P2003-514006)	(71) 出願人	502178816
(86) (22) 出願日	平成14年7月18日 (2002.7.18)		マックギル ユニヴァーシティー
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月16日 (2004.1.16)		カナダ ケベック エイチ3エイ 2エイ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/001120		7 モントリオール ユニヴァーシティー
(87) 国際公開番号	W02003/008448		ストリート 3550 オフィス オブ
(87) 国際公開日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		テクノロジー トランスファー
(31) 優先権主張番号	2,352,702	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成13年7月18日 (2001.7.18)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	カナダ (CA)	(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規ヒトプロトンゲート調節チャンネル

(57) 【要約】

本発明は、新規ヒトプロトンゲート調節イオンチャンネル (hASIC1B) およびhASIC1Bを同定しかつコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、hASIC1Bをコードする核酸配列を含んでなる遺伝子操作した発現ベクターおよび宿主細胞ならびにhASIC1Bを産生する方法も提供する。本発明はまた、hASIC1Bの発現に関連する疾患の予防および治療における、hASIC1B、およびアゴニスト、hASIC1Bと特異的に結合する抗体またはアンタゴニストの利用も提供する。さらに、本発明は、hASIC1Bの発現に関連する疾患を治療するための、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンス分子の利用を提供する。本発明はまた、hASIC1Bと特異的に結合するポリヌクレオチド、またはその断片もしくは補体、および抗体を利用する診断アッセイも提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製されかつ単離されたヒトプロトンゲート調節イオンチャンネルタンパク質（hASIC1B）であって、次の群から選択される上記タンパク質：配列番号 2 に規定したアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一性を有する hASIC1B、配列番号 2 に規定したアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一性を有する hASIC1B、配列番号 2 に規定したアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一性を有する hASIC1B、配列番号 2 に規定したアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一性を有する hASIC1B、配列番号 2 に規定したアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一性を有する hASIC1B、および配列番号 2 に規定したアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一性を有する hASIC1B。

10

【請求項 2】

プロトンの活性化（酸、低 pH 溶液）を特徴とする、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

配列番号 2 に規定したアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項 5】

配列番号 1 とハイブリダイズすることができる、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

配列番号 1 に規定した配列を有する、請求項 4 に記載の核酸。

20

【請求項 7】

請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含んでなる、組換えベクター。

【請求項 8】

発現ベクターである、請求項 7 に記載の組換えベクター。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の組換えベクターを含んでなる宿主。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の組換えベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 11】

ヒトプロトンゲート調節イオンチャンネルタンパク質（hASIC1B）を生産する方法であって、請求項 10 に記載の宿主細胞を上記タンパク質の産生に対して十分な条件のもとで培養し、培養物から上記タンパク質を回収する上記方法。

30

【請求項 12】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を産生する細胞を生産する方法。

【請求項 13】

さらに宿主細胞を請求項 8 の組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることを含んでなる、請求項 12 に記載の方法

【請求項 14】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の hASIC1B タンパク質に対して免疫特異的な抗体。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

40

【請求項 16】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の hASIC1B タンパク質の活性または発現の増強を必要とする被験者の治療方法であって、

(a) 被験者に治療上有効な量の、上記 hASIC1B タンパク質に対するアゴニストを投与すること；または

(b) 被験者に請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の核酸を、上記 hASIC1B タンパク質活性の有効な *in vivo* 産生を生じる形態で与えることを含んでなる上記方法。

【請求項 17】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の hASIC1B タンパク質の活性および発現を阻害する必

50

要のある被験者を治療する方法であって、

- (a)被験者に治療上有効な量の、上記hASIC1Bタンパク質に対するアンタゴニストを投与するか；または
- (b)被験者に上記hASIC1Bタンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子を投与するか；または
- (c)被験者に治療上有効な量の、そのリガンドに対して上記hASIC1Bタンパク質と競合するタンパク質を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項18】

請求項1～3のいずれか1項に記載のhASIC1Bタンパク質の発現または活性に係る被験者の疾患または疾患に対する感受性を診断する方法であって、

10

- (a)上記被験者のゲノム中の上記hASIC1Bタンパク質をコードするヌクレオチド配列における突然変異の存在または不在を決定するステップ；または
- (b)上記被験者から誘導されたサンプル中のhASIC1Bタンパク質発現の存在または量を分析するステップを含んでなる上記方法。

【請求項19】

請求項1～3のいずれか1項に記載のhASIC1Bタンパク質に対するアゴニストを同定する方法であって、

- (a)請求項11に記載の方法により培養した細胞を候補化合物と接触させるステップ；および
- (b)候補化合物が生物学的活性またはhASIC1B受容体により伝達されるシグナルを誘導またはモジュレートするかどうかを決定するステップ；または
- (c)候補化合物が内向き電流を誘導するかまたはhASIC1B受容体により伝達されるプロトン誘導内向き電流をモジュレートするかどうかを決定することを含んでなる上記方法。

20

【請求項20】

請求項19に記載の方法により同定したアゴニスト。

【請求項21】

請求項20に記載のアゴニストであって、抗うつ薬、除感作薬、抗精神病薬、鎮痛薬、化学療法薬もしくは抗悪性腫瘍薬、抗精神病薬、精神療法薬、呼吸および脳刺激薬、認知刺激薬、記憶刺激薬、神経再生促進薬、細胞成長もしくは増殖刺激薬、殺虫剤、農薬もしくは駆虫剤、またはそれらのいずれかの組合わせであるか、またはそれらに対するアジュバントである上記アゴニスト。

30

【請求項22】

請求項1～3のいずれか1項に記載のhASIC1Bタンパク質に対するアンタゴニストを同定する方法であって、

- (a)請求項11の方法により培養した細胞を、低pH溶液（ $\text{pH} < 7.4$ ）または請求項20に記載のアゴニストを含むいずれかの他のアゴニストと接触させるステップ；および
- (b)プロトンまたは上記アゴニストにより作製されたシグナルが候補化合物の存在のもとでモジュレートされるか、減少するかまたは無効化するかどうかを決定することを含んでなる上記方法。

【請求項23】

40

請求項22に記載の方法により同定したアンタゴニスト。

【請求項24】

請求項23に記載のアンタゴニストであって、鎮痛薬、解熱薬、鎮痒薬、抗不安薬、鎮静薬または睡眠薬、精神療法薬、抗痙攣薬、神経保護薬、全身麻酔薬、局所麻酔薬、降圧薬、筋弛緩薬、止瀉薬、制酸薬、またはそれらのいずれかの組合わせであるか、またはそれらに対するアジュバントである上記アンタゴニスト

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

50

哺乳類動物においては、間質液および血液を含む細胞外区画のpHが厳密に7.4の一定値に調節されかつ維持される。酸感知 (acid sensing) は、例えば、痙攣、外傷、炎症または低酸素血症の症状で起こる侵害受容pH不均衡の検出に重要な役割を果たす化学受容 (chemoreception) の具体的な一種である (Lindahl, Adv Neurol 1974; 4: 45)。哺乳類動物において、背根神経節 (dorsal root ganglia) および三叉神経節 (trigeminal ganglia) の小径一次感覚ニューロンの集団は、細胞外プロトン濃度の増加により活性化される特殊なpH感受性表面受容体を発現する (Bevan and Yeats, J Physiol (Lond) 1991; 433: 145)。感覚ならびに中枢神経の酸感受性は、構造的に線虫シーエレガンス (*C. elegans*) デゲネリン (degenerins) (DEG) および哺乳類上皮ナトリウムチャンネル (ENaC) に関係するプロトンゲート調節 (proton-gated) 陽イオンチャンネルのファミリーに仲介される。本発明はこれらの酸感知イオンチャンネル (Acid Sensing Ion Channel) (ASIC) に関するものであって、具体的には、このクラスの受容体-チャンネルの新規メンバーの発見、それと他のチャンネルサブユニットとの関連およびそれらの用途を報じる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

組織アシドーシスは、複数の、痛みを伴う生理学的 (例えば、痙攣) および病理学的 (例えば、炎症、間欠性跛行、心筋梗塞) 症状と関連する。実験的に、類似の痛みを伴う事象を、皮膚または筋肉中への低pH溶液の輸液により再現することができる。さらに、長期にわたる低pH溶液の皮膚内輸液により、特徴的な慢性痛みの痛覚過敏を模擬することができる。

【0003】

さらにプロトンの効果およびその痛みとの関係の特徴づけるために、低pH溶液を、パッチクランプした中枢および末梢感覚ニューロンに適用した。pHを酸性値まで低下させると内向き電流 (inward current) が誘導され、プロトン活性化イオンチャンネルの存在に確証を与えた。ラットおよびヒト三叉および背根神経節から得た感覚ニューロンにおける数タイプの自然電流：すなわち、急速に失活する電流；非失活電流；および急速に失活する電流の後に非失活電流を示す二相電流を観察した。

【0004】

イオン選択性に関する他の相違点も報じられた。これらの結果は、複数のプロトンゲート調節イオンチャンネルの存在を示唆した。組織酸性化が誘導する長期にわたる痛みは、ほとんどの場合、非失活プロトンゲート調節イオンチャンネルに関連しているようである。

【0005】

クローニングされたプロトンゲート調節イオンチャンネル

哺乳類動物プロトンゲート調節 (proton-gated) 陽イオンチャンネルは最近クローニングされ、酸感知イオンチャンネル (Acid Sensing Ion Channels) としてASICと名付けられている。配列解析は、これらがイオンチャンネルのDEG/ENaCスーパーファミリーのメンバーであると同定した。ASIC受容体の推定膜位相幾何学 (putative membrane topology) は、上皮ナトリウムチャンネルに示されたように、細胞内区画にNおよびC両末端をもつ2つの膜貫通ドメインを予想する。4種のASIC受容体サブクラスが同定されている：

1. ASIC1イオンチャンネルは急速に失活する内向き電流を示し (Waldmannら, Nature 1997; 386: 173)、
2. ASIC2イオンチャンネルは徐々に失活する内向き電流を示し (Brassilanaら, J Biol Chem 1997; 272: 28819)、
3. ASIC3イオンチャンネルは、最初に急速に失活する成分と次いで持続した非失活性内向き電流からなる二相内向き電流を示し (Waldmannら, J Biol Chem 1997; 272: 20975; Babinskiら, J Neurochem 1999; 72: 51)、そして
4. ASIC4イオンチャンネルは特徴的なASIC様配列モチーフを含有するが、ホモ多量体結合 (homomultimeric association) はプロトンにより活性化されないと思われる。

【0006】

mRNAの選択的スプライシングにより作製したASIC受容体のファミリー

これらのイオンチャンネルに共通する特性は、選択的スプライス変異体が存在して重要な機能差を発現することにある。実際、ASIC1の最初の185個のアミノ酸（以後ASIC1Aと呼ぶ）を異なる新しい172個のアミノ酸の配列により置換えると、ASIC1Aと類似の電流動力学を有するが、活性化にはさらに低いpH値を必要とする新しいチャンネル、ASIC1Bを生成する（ASIC1AおよびASIC1Bに対する pH_{50} はそれぞれ6.2および4.5である）。ASIC1Bはまた、ラット背根神経節にも特異的に発現すると思われる。類似の状況はまた、ラットASIC2（以後ASIC2Aと呼ぶ）についても観察され、最初の185個のアミノ酸を異なる新しい236個のアミノ酸の配列により置換えると、他のASICイオンチャンネルサブユニット、ASIC2Bを生成する。ASIC2Bは哺乳類細胞またはアフリカツメガエル卵母細胞にホモ多量体として単独で発現すると、低pH溶液により活性化されないと思われる。しかし、ASIC2Bが他のASICサブユニット（例えば、ASIC2A、ASIC3）とともに同時発現すると、新規のイオン選択性または pH_{50} 値などの異なる特性をもつヘテロ多量体イオンチャンネルを生じる（Linguegliaら、J Biol Chem 1997: 272: 29778）。ヒトにおいて同定されているASIC3も様々な形態で存在すると思われる。実際、DRASICはラットで同定されたASIC3様チャンネルであって、ヒトASIC3配列と85%同一性を表示しかつ類似の二相電流動力学を有する。しかし、組織分布、イオン選択性および pH_{50} に重要な相違があつて、DRASICはASIC3のヒトのオルソログ（orthologue）ではなくむしろ異なるサブタイプでありうることを示唆する。さらに、2種のヒトASIC3の3'スプライス変異体（最近GenBankに受託された、ASIC3Bおよび3C）の存在が報じられているが、機能の差はまだ立証されていない。従つて選択的スプライシングはASIC受容体の多様性を増す重要な機構らしく、それは間違いなく神経伝達、痛覚または機械感覚などの神経系において重要な役割を果たすと考えられる（以下参照）。存在するスプライス変異体間には大きな相違があるので、新しいスプライス変異体の実際の機能的特徴は予測できず、いずれの既知ASIC受容体とも完全に異なることもありうる。

10

20

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

本発明は、今まで開示されたラットASIC1Bと異なる特性を示すヒトASIC1B受容体（以後、hASIC1Bと呼ぶ）の発見を報じる。またこの新しいサブユニットの、神経伝達および／または痛覚、および／または機械感覚、および／または正常および病態生理学的状態におけるその他のいずれの神経学的および／または代謝プロセスとの潜在的関わりも、本発明の範囲内であると意図する。本発明はまた、限定されるものでないが、薬物スクリーニング技術（すなわち、チャンネルアンタゴニスト、アゴニストおよび／またはモジュレーターのスクリーニング）、診断マーカー、遺伝子治療を含むあらゆる治療標的として、この新しいサブユニットの利用を範囲内に包含することも求める。また、本発明の範囲には、hASIC1Bサブユニットとお互いとのおよび／またはあらゆる種由来のASICファミリーの1以上のサブユニット（限定されるものでないが、ASIC1、ASIC1A、BNC2、ASIC1B、ASIC2A、ASIC2B、MDEG、MDEG1、MDEG2、BNC1、BNC2、DRASIC、ASIC3、ASIC4、SPASICまたはそれらのいずれかの変異体を含む）とのヘテロ重合体、ならびにhASIC1Bとあらゆる種由来のデGENERIN（Degenerin）およびEnaCファミリーのあらゆる他メンバーとのヘテロ重合体も包含される。

30

40

【0008】

本発明の目的は、全長hASIC1Bポリペプチド分子（配列番号2）をコードするポリヌクレオチド分子（配列番号1）の好ましい一次配列を提供することである。

【0009】

本発明のさらに他の目的は、受託番号AC025154、AC074032、およびAC025361で寄託された未特性決定配列から推定されるhASIC1Bの部分ゲノムポリヌクレオチド配列、特に、クローンAC025154中の1つの非断続コンティグを含有するhASIC1Bの特徴的かつ特有の第1エキソンの配列を提供することである。

【0010】

50

本発明はさらに、hASIC1Bをコードする核酸配列を含んでなるポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）、それらの断片、部分またはアンチセンス分子、および発現ベクターおよび宿主細胞を特徴とする。本発明はまた、hASIC1Bと特異的に結合する抗体および実質的に精製されたhASIC1Bを含有する医薬組成物を特徴とする。本発明はまた、hASIC1Bのアゴニストおよびアンタゴニストの利用も特徴とする。

【0011】

図面の説明

以下の図（drawings）、図面（figures）および表（tables）は本発明の実施形態の説明であって、請求の範囲に包含される本発明の分野を限定することを意味するものでない。

【0012】

図面の簡単な説明については以下参照。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

発明の詳細な説明

本発明のヌクレオチド配列、タンパク質および方法を記載する前に断わるが、記載した特定の方法論、プロトコル、細胞系、ベクター、および試薬は変わりうるものであって、本発明はこれらに限定されるものでないと解釈する。また、本明細書に使用される専門用語は特定の実施形態を記載することだけが目的であって本発明の範囲を限定することを意図するのではなく、本発明の範囲は添付した請求の範囲によってのみ限定されうると解釈する。本明細書においておよび添付した請求の範囲において使用した、単数形「或る（a）」、「或る（an）」、および「その（the）」は、その文脈が明らかに別の意味を指定しない限り、複数の意味を含むことに注意しなければならない。従って、例えば、「或る宿主細胞（an host cell）」の意味は複数のそのような宿主細胞を含み；「その抗体（the antibody）」の意味は1以上の抗体および当業者に公知のそれらの同等物の意味であって、以下同様である。

【0014】

別の定義がされていない限り、本明細書に使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する業界の技術者が通常理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載したのと類似のまたは同等のいずれの方法および材料を本発明の実施または試験に利用してもよいが、好ましい方法、装置、および材料をここに記載する。本明細書に記述した全ての開示物は、開示物に報じられて本発明に関係して利用しうる細胞系、ベクター、および方法論を記載しかつ開示する目的で、参照により組み入れられる。

【0015】

別の規定がされていない限り、本明細書において以下および以上使用された用語「hASIC1B」は、hASIC1Bの全ての変異体（以下に定義した）を包含する。

【0016】

定義

本明細書に使用される「ポリヌクレオチド」は1本鎖または2本鎖分子であって、ヌクレオチド塩基A、T、CおよびGを含んでなる「デオキシリボ核酸」（DNA）であっても、または塩基A、U（Tの代わり）、CおよびGを含んでなる「リボ核酸」（RNA）であってもよい上記分子を意味する。ポリヌクレオチドはコード鎖またはその相補体、センスまたはアンチセンス鎖を表しうる。ポリヌクレオチドは、天然の配列と配列が同一であってもよいし、または天然の配列に見出されるのと同じアミノ酸をコードする代わりのコドンを含んでもよい（Lewin：「Genes V（遺伝子V）」、第7章；Oxford University Press、1994）。さらに、ポリヌクレオチドはアミノ酸の保存的置換を表すコドンを含んでもよい。用語「ポリヌクレオチド」はまた、ゲノムDNA（イントロンとエキソンの両方）、相補的DNA（cDNA）、cRNA、メッセンジャーRNA（mRNA）などの、DNAまたはRNAの全ての可能な代替形態、ならびにトリチル化塩基などの修飾された塩基およびイノシンなどの変わった塩基を含む、ヌクレオチド塩基から部分または全化学合成により調製されたDNAまたはRNAを含んでもよい。ポリヌクレオチドはまた化学的、酵素的または代謝的に改変されたDNA

10

20

30

40

50

またはRNAの形態、ならびにウイルスの特徴であるDNAおよびRNAの化学的形態を包含してもよい。

【0017】

用語「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」は典型的には長さが10～40個の塩基である、短いポリヌクレオチドを意味する。

【0018】

「ポリペプチド」は、お互いにペプチド結合または改変ペプチド結合により接続された2個以上のアミノ酸からなる分子（すなわち、アイソスター（isostere））を意味する。アミノ酸は、自然状態で遺伝子にコードされた全部で20種のアミノ酸ならびに自然状態でまたは化学的に改変されたアミノ酸を含む。ポリペプチドは、通常ペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーと呼ばれるアミノ酸の短い鎖、および通常タンパク質と呼ばれるさらに長い鎖の両方を意味する。従って、本明細書に使用される「アミノ酸配列」は、天然のまたは合成分子に対応する、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質分子およびそれらの断片または部分を意味する。本明細書において「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を意味して呼ばれる場合、「アミノ酸配列」および同様の用語、例えば「ポリペプチド」または「タンパク質」は、そのアミノ酸配列をその呼ばれたタンパク質分子に関連する完全な、自然のアミノ酸配列に限定することを意味するのではない。さらに、ポリペプチドはまた、翻訳後プロセッシングなどの自然プロセスにより、または当技術分野で周知の化学的改変技術により改変されたアミノ酸配列も含みうる。所与のポリペプチドは多数のタイプの改変を含有してもよいしまたは所与の改変は同じかまたは様々な程度で所与のポリペプチド中の複数部位に存在してもよい。改変は、限定されるものでないが、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含むポリペプチド中のいずれの部位に存在してもよい。以上に挙げた改変ならびにそれらの実施は全て、研究文献において、基礎的な教科書および詳細な専攻論文の両方でよく記載されている（「Proteins: Structure and Molecular Properties（タンパク質：構造および分子的特性）」；Creighton TE, Freeman WH, 第2版, New-York, 1993；「Post translational Covalent Modification of Proteins（タンパク質の翻訳後共有結合による改変）」，Johnson BC, 編, Academic Press, New-York, 1983；さらに、Seiterら, Meth Enzymol 1990; 182: 626、およびRattanら, Ann NY Acad Sci 1992; 663: 48）。

10

20

30

【0019】

本明細書に使用される「ペプチド核酸」は、リシンなどのアミノ酸残基およびアミノ基が付加されているオリゴヌクレオチドを含んでなる分子を意味する。抗遺伝子剤とも名づけられたこれらの小分子は、それらの相補的な核酸鎖と結合することにより転写伸長を停止する（Nielsenら, Anticancer Drug Des 1993; 8: 53）。

【0020】

本明細書に使用されるhASIC1Bは、ヒトから得た、自然、合成、半合成、または組換えのいずれによるにせよ、実質的に精製されたhASIC1Bのアミノ酸配列を意味する。

【0021】

本明細書に使用される用語「変異体」は、対照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとそれぞれ異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。典型的なポリヌクレオチドの変異体は他の対照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配列の差は、対照ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を改変してもしなくてもよい。ヌクレオチド変化は、以下に考察するように、対照配列がコードするポリペプチド中のアミノ酸置換、付加、挿入、欠失、融合、および末端切断を生じててもよい。典型的なポリペプチドの変異体は他の対照ポリペプチドのアミノ酸配列と異なる。一般的に、対照ポリペプチドと変異体の配列の差は、全体に密接に類似しかつ多数の領域で同一であるような差である。変異体と対照ポリペプチドは、1以上の置換、付加、挿入、欠失のいずれの組合わせでアミノ酸配列が異なってもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされいていてもいなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、例えば1以上の塩基における多型または突然変異を含む

40

50

対立遺伝子または擬対立遺伝子変異体のように、天然であってもよいし、または天然では未知の変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然変異体は、突然変異誘発技術によりまたは直接合成により作ってもよい。上記の非天然変異体の定義は用語「突然変異体」を包含する。

【0022】

本明細書において以下に「スプライス変異体」と呼ぶのは、所与の遺伝子中に存在するエキソンの示差的または代替的スプライシングおよびアセンブリーから生じる変異体である。典型的には、コードされるタンパク質はほとんどの領域で全同一性を提示するが、異なるエキソンによりコードされる特定の領域ではより低い同一性を提示しうる。

【0023】

本明細書に使用される「欠失」は、対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと比較して、1以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基がそれぞれ不在であるアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を意味する。

【0024】

本明細書に使用される「挿入」または「付加」は、対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと比較して、1以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基の付加をそれぞれもたらすアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を意味する。

【0025】

本明細書に使用される「置換」は、対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと比較して、1以上のアミノ酸またはヌクレオチドのそれぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドによる置換を意味する。

【0026】

本明細書に使用される「誘導体」は、hASIC1Bをコードする核酸またはコードされたhASIC1Bの化学的修飾物を意味する。そのような修飾物の例は、水素のアルキル、アシル、またはアミノ基による置換でありうる。核酸誘導体はポリペプチドをコードし、そのポリペプチドは自然分子の本質的な生物学的特徴のいくつかまたは全てを保持しうるかまたはしないであろう。

【0027】

本明細書に使用される「同一性」は、2以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が共通して有する同一ヌクレオチドまたはアミノ酸の程度の基準を意味する。一般的に、配列を最高度の対合 (match) が得られるように整列し、これを「アラインメント (alignment)」と呼ぶ。そのような最適のアラインメントはギャップを利用し、スミス-ウォーターマン・アラインメント (Smith-Waterman alignment) などの局所相同性アルゴリズムを用いて対合数を最大化するようにギャップを挿入する。用語「同一性」、または「類似性」、または「相同性」、または「アラインメント」は当業者には周知であって、アラインメントを実施しかつ同一性を測定する方法は、文献に広く記載されかつ教示されている (Dayhoffら, Meth Enzymol 1983; 91:524; Lipman DJおよびPearson WR, Science 1985; 227: 1435; Altschulら, J Mol Biol 1990; 215:403; Pearson WR, Genomics 1991; 11:635; Gribskov MおよびDevreux J, 編 (1992) 「Sequence Analysis Primer (配列分析プライマー)」, WH Freeman & Cie, New York.; Altschulら, Nature Gen 1994; 6: 119)。さらに、アラインメントを実施しかつ同一性および類似性を決定する方法は、コンピュータプログラムおよびソフトウェアパッケージにコード化されていて、それらのいくつかはウェブ (web) に基づくものでもあり、インターネット上でアクセスしうる。好ましいソフトウェアとしては、限定されるものでないが、Blastn、Blastp、Blastx、tBlastnを含むBLAST (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschulら, J Mol Biol 1990; 215: 403)、FastAおよびTfastA (PearsonおよびLipman, PNAS 1988; 85: 2444)、Lasergene99 (DNASTAR, Madison WI)、Omiga 2.0またはMacVector (Oxford Molecular Group, Cambridge, UK)、Wisconsin Package (Genetic Computer Group (GCG), Madison, WI)、Vector NTI Suite (InforMaxInc., N. Bethesda, MD)、GeneJockey II (Biosoft, Cambridge, UK) が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0028】

具体例として、配列番号1の対照ヌクレオチド配列に対して少なくとも、例えば95%「同一性」をもつヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号1の対照ヌクレオチド配列の100個のヌクレオチド当たり5個までの点突然変異または異なるヌクレオチドを含有しうることを除くと、対照配列と同一であることを意図する。換言すれば、対照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るには、対照配列中のヌクレオチドの5%までを欠失するかまたは他のヌクレオチドと置換するか、または対照配列中の全ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドを対照配列中に挿入してもよい。対照配列のこれらの突然変異は、対照ヌクレオチド配列の5'または3'末端位置にもしくはこれらの末端位置間のいずれの場所に、または対照配列のヌクレオチドの間で個々にもしくは対照配列内に1以上の連続グループで点在して、存在してもよい。

【0029】

同様に、配列番号2の対照アミノ酸配列に対して少なくとも、例えば、95%「同一性」をもつアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ポリペプチド配列のアミノ酸配列が、配列番号2の対照アミノ酸配列の全部で100個のアミノ酸に対して、5個までのアミノ酸改変を含有しうることを除くと、対照配列と同一であることを意図する。換言すれば、対照アミノ酸配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るには、対照配列のアミノ酸残基の5%までを欠失するかまたは他のアミノ酸と置換するか、または対照配列に全アミノ酸残基の5%までの数のアミノ酸を対照配列中に挿入してもよい。対照配列のこれらの突然変異は、対照アミノ酸配列のアミノまたはカルボキシ末端位置にもしくはこれらの末端位置間のいずれの場所に、または対照配列の残基の間で個々にまたは対照配列内に1以上の連続グループで点在して、存在してもよい。

【0030】

本明細書に使用される用語「生物学的活性的に活性な」または「生物学的活性」は、天然分子の構造的、調節的、生化学的、電気生理学的または細胞の機能を有するタンパク質を意味する。同様に、「免疫学的に活性な」は、適当な動物または細胞において特異的免疫応答を誘発して特異的抗体と結合する、天然、組換え、または合成hASIC1B、またはそれらのいずれかのオリゴペプチドの能力を意味する。

【0031】

本明細書に使用される、「プロトンゲート調節 (proton-gated)」および「酸感知 (acid-sensing)」は、酸性の増加またはpHの低下とも呼ぶプロトンイオン濃度の増加により誘発されるチャンネル分子の陽イオン透過性増加を意味する。

【0032】

「機能の利得 (gain of function)」は、存在する生物学的活性の増強および／または新規の生物学的活性の取得を示すhASIC1B誘導体を意味する。同様に、「機能の消失 (loss of function)」は、1以上の存在する生物学的活性の部分的または完全な消失を示すhASIC1B誘導体を意味する。表現「優性ネガティブ」は、機能の消失したhASIC1B誘導体であって、in vivoで例えばトランスジーンとしてまたはin vitroで例えば特定の生物学的活性（例えば「酸感知」）を試験するために用いるアッセイにおいて完全に機能的なhASIC1Bと同時発現させると、その応答を支配し、それと関連した全ての他のhASIC1Bサブユニットの生物学的活性を消失しうる上記hASIC1B誘導体を意味する。優性ネガティブ効果はまた、優性ネガティブhASIC1B誘導体が他の機能性ASICファミリーメンバー、例えば、限定されるものでないが、ASIC1A、ASIC2AまたはASIC3と同時発現する条件でも現れうるし、かつ優性ネガティブASICサブユニットが機能性hASIC1Bと同時発現される逆のときにも、現れうる。

【0033】

本明細書に使用される用語「アゴニスト」は、hASIC1Bと結合すると、hASIC1Bに変化を生じてhASIC1Bの活性をモジュレートする分子を意味する。アゴニストは、hASIC1Bと結合するタンパク質、核酸、炭水化物、またはいずれの他の分子であってもよい。

【0034】

本明細書に使用される用語「アンタゴニスト」または「インヒビター」は、hASIC1Bと結合すると、hASIC1Bの生物学的または免疫活性をモジュレートするかブロックする分子を意味する。アンタゴニストおよびインヒビターは、hASIC1Bと結合するタンパク質、核酸、炭水化物、またはいずれの他の分子であってもよい。

【0035】

本明細書に使用される「モジュレートする」は、hASIC1Bの生物学的活性における変化または改変を意味する。モジュレーションはタンパク質活性の増加または減少、結合特性の変化、またはhASIC1Bの生物学的、機能的または免疫学的特性における他のいずれの変化であってもよい。

10

【0036】

本明細書に使用される「模倣物 (mimetic)」は、その構造がhASIC1Bの構造またはその部分の知識から開発され、hASIC1Bとしていくつかのまたは全てのASIC様分子の作用を果たしうる分子を意味する。

【0037】

本明細書に使用される「実質的に精製された」は、その自然環境から除去され、単離されまたは分離された核酸またはアミノ酸配列であって、その自然状態で随伴する他成分を少なくとも60%含まない、好ましくは75%含まない、さらに好ましくは90%含まない、さらになお好ましくは95%、そして最も好ましくは99%含まない上記核酸またはアミノ酸配列を意味する。

20

【0038】

本明細書に使用される「増幅」は、核酸配列のさらなるコピーの産生を意味し、一般的に、当技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を利用して実施される (「PCR Primer: a laboratory manual (PCRプライマー: 研究室マニュアル)」, Dieffenbach CW および Dveksler GS, 編, 1995, CSHL Press, Plainview, N.Y)。

【0039】

本明細書に使用される「ハイブリダイゼーション」は、核酸鎖が相補鎖と塩基対合を介して結合するあらゆるプロセスを意味する。

【0040】

本明細書に使用される「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的 G と C 塩基の間および相補的 A と T 塩基との間の水素結合の形成により 2 つの核酸配列の間に形成される複合体を意味し; これらの水素結合はさらに塩基スタッキング相互作用により安定化されうる。2 つの相補的核酸配列は逆平行のコンフィギュレーションで水素結合する。水素複合体は、溶液中で (例えば、RNアーゼ保護アッセイ分析) または溶液中に存在する 1 つの核酸配列と固体支持体 (例えば、in situ ハイブリダイゼーションのために細胞が固定されている膜、フィルター、チップ、ピンまたはガラススライド) 上に固定された他の核酸配列との間で形成されてもよい。

30

【0041】

本明細書に使用される用語「相補的な」または「相補性」は、塩基対合が許容される塩および温度条件のもとでのポリヌクレオチドの自然結合を意味する。例えば、配列「A - G - T」は相補的配列「T - C - A」と結合する。2 つの 1 本鎖分子間の相補性は「部分的」であって、いくつかの核酸だけが結合してもよいし、または完全であって、1 本鎖分子間に全相補性が存在してもよい。核酸鎖間の相補度 (degree of complementarity) は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意な影響を与える。これは核酸鎖間の結合に依存する増幅反応において特に重要である。

40

【0042】

本明細書に使用される「相同性」は、配列またはプローブの相補度を意味する。部分相同性または完全相同性 (すなわち、同一性) が存在しうる。部分相同性配列は同一配列が標的核酸とハイブリダイズするのを、少なくとも部分的に阻害する配列であり; 機能的用語「実質的に相同的な」を用いて呼ぶ。完全に相補的な配列と標的配列とのハイブリダイゼ

50

ーションの阻害は、低ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイゼーションアッセイ（サザンまたはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど）を利用して試験することができる。実質的に相同的な配列またはプローブは、低ストリンジェンシーの条件下で、完全に相同的な配列またはプローブと標的配列との結合（すなわち、ハイブリダイゼーション）に対して競合しかつ阻害しうる。ここで、低ストリンジェンシーの条件は非特異的結合を許容するというのではない；低ストリンジェンシー条件は2つの配列のお互いの結合が特異的（すなわち、選択的）相互作用であることを必要とする。非特異的結合の不在は、部分的相補度すら持たない第2の標的配列（例えば、約30%未満の同一性）を使って試験することができる；非特異的結合が不在の場合、プローブは第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしないであろう。

10

【0043】

当技術分野では公知のように、低または高ストリンジェンシー条件を含む多数の同等な条件を採用することができる。配列（DNA、RNA、塩基組成物）の長さおよび性質、標的（DNA、RNA、塩基組成物、溶液中または固定された存在、その他）の性質、ならびに塩および他成分（例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸および／またはポリエチレングリコールの存在または非存在）の濃度などの因子を考慮し、そしてハイブリダイゼーション溶液を変えて以上に掲げた条件と異なるが、同等である低または高ストリンジェンシーの条件を作ってもよい。

【0044】

本明細書に使用される用語「ストリンジェントな条件」は、約 $T_m - 5^\circ\text{C}$ （プローブの融点（ T_m ）以下 5°C ）から T_m 以下約 $20\sim 25^\circ\text{C}$ の範囲にある「ストリンジェンシー」である。当業者であれば理解しうるように、同一または関係するポリヌクレオチド配列を同定しまたは検出するために、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変更してもよい。

20

【0045】

本明細書に使用される「アンチセンス」は、特定のDNAまたはRNA配列に相補的であるヌクレオチドを意味する。用語「アンチセンス鎖」は、「センス」鎖と相補的である核酸鎖の意味で使用される。アンチセンス分子はいずれの方法により作ってもよく、例えば、目的の遺伝子を逆方向でウイルスプロモーターとライゲートして相補鎖の合成を可能にする方法を含む。いったん細胞中に導入されると、この転写された鎖は細胞が産生する自然配列と複合して2本鎖を形成する。次いでこれらの2本鎖はさらなる転写または翻訳をブロックする。この方法で、突然変異表現型を作製することができる。表現「ネガティブ」はアンチセンス鎖の意味で時々使用され、「ポジティブ」はセンス鎖の意味で時々使用される。

30

【0046】

本明細書に使用される、タンパク質の用語「一部分（portion）」（「所与のタンパク質の一部分」のように）はそのタンパク質の断片を意味する。断片のサイズは4個のアミノ酸残基から全アミノ酸配列－1個のアミノ酸までの範囲であってもよい。従って、「配列番号2のアミノ酸配列の少なくとも1部分を含む」タンパク質は全長ヒトhASIC1Bおよびその断片を包含する。

【0047】

本明細書で定義される「形質転換（transformation）」は、外因性DNAが受容体細胞に進入しかつ変化させるプロセスを意味する。それは、自然または人工の条件下で当技術分野で周知の様々な方法を用いて起こりうる。形質転換は、外来核酸配列を原核生物または真核生物宿主細胞中に挿入するためのいずれの公知の方法に頼ってもよい。その方法は、形質転換する宿主細胞に基づいて選択され、限定されるものでないが、ウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクション、および微粒子ボンバードメントを含む。そのような「形質転換された」細胞は、挿入されたDNAを自己複製プラスミドとしてまたは宿主染色体の部分として複製することができる安定に形質転換された細胞を含む。これはまた、挿入されたDNAまたはRNAを限られた時間だけ一過的に発現する細胞も含む。

40

【0048】

50

本明細書に使用される「抗原決定基」は、特定の抗体と接触させる分子の一部分（すなわち、エピトープ）を意味する。タンパク質またはタンパク質の断片を用いて宿主動物を免疫感作すると、タンパク質の多数の領域は、タンパク質上の所与の領域または三次元構造と特異的に結合する抗体の産生を誘導することができる；これらの領域または構造を抗原決定基と呼ぶ。抗原決定基は、抗体との結合について、元のままの抗原（すなわち、免疫応答を誘発するために用いる免疫原）と競合しうる。

【0049】

抗体とタンパク質またはペプチドとの相互作用を参照して、本明細書において使用される用語「特異的結合」または「特異的に結合する」は、その相互作用が特定の構造（すなわち、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味する；換言すれば、抗体は一般的にタンパク質よりむしろ特定のタンパク質構造を認識して結合する。例えば、抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識された「A」と抗体を含有する反応物中にエピトープAを含有するタンパク質（または遊離した、無標識のA）が存在すると、抗体と結合した標識されたAの量は減少する。

10

【0050】

本明細書に使用される用語「サンプル」はその最も広い意味で使われる。hASIC1Bまたはその断片をコードする核酸を含有すると思われる生物学的サンプルは、細胞、細胞から単離された染色体（例えば、分裂中期染色体の広がり）、ゲノムDNA（溶液中のまたはサザン分析用などの固体支持体と結合した）、RNA（溶液中のまたはノーザン分析用などの固体支持体と結合した）、cDNA（溶液中のまたは固体支持体と結合した）、細胞または組織からの抽出物などを含みうる。

20

【0051】

本明細書に使用される用語「ポリヌクレオチドの発現と相関がある」は、ノーザン分析および／またはRT-PCRによる配列番号1に関係するリボ核酸の存在の検出は、サンプル中のhASIC1BをコードするmRNAの存在を示し、従って、該タンパク質をコードする転写物の発現と相関があることを示す。

【0052】

本明細書に使用される用語、配列番号1のポリヌクレオチドの「改変」はhASIC1Bをコードするポリヌクレオチドの配列のいずれの改変も含むものであり、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて検出しうる欠失、挿入、および点突然変異を含む。この定義に含まれるのは、hASIC1BをコードするゲノムDNA配列に対する改変（例えば、配列番号1とハイブリダイズできる制限酵素切断断片長多型のパターンの改変による）の検出、配列番号1の選択した断片がゲノムDNAのサンプルとハイブリダイズしなくなる（例えば、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いて）、およびhASIC1Bをコードするポリヌクレオチド配列に対する正常な染色体遺伝子座以外とのハイブリダイゼーションなどの不適当なまたは予想外のハイブリダイゼーション（例えば、分裂中期染色体広がりとの蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を用いて）である。

30

【0053】

本明細書に使用される「抗体」は、エピトープ決定基と結合しうるインタクトの分子ならびにFa、F(ab')₂、およびFvなどのそのフラグメントを意味する。hASIC1Bポリペプチドと結合する抗体は、元のままのポリペプチドまたは目的の小ペプチドを含有するフラグメントを免疫感作抗原に利用して調製することができる。動物を免疫感作するために利用するポリペプチドまたはペプチドは、翻訳したRNAから誘導するかまたは化学的に合成し、所望であれば、担体タンパク質と結合してもよい。通常利用される化学的にペプチドと結合した担体としては、ウシ血清アルブミンおよびサイログロブリンが挙げられる。次いで、結合したペプチドを利用して動物（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）を免疫感作する。これらの方法は、文献によく記載されている：例えば、「Antobodies : A Laboratory Manual（抗体：研究室マニュアル）」, Harlow EおよびLane D, 編, 1998, CSHL Press, Plainview, N. Y.）。

40

【0054】

50

本明細書に使用される用語「ヒト化抗体」は、元来の結合能力を保持したまま、ヒト抗体にさらによく似させるために、非抗原結合領域においてアミノ酸が置き換えられている抗体分子を意味する。

【0055】

発明の開示

本発明は、新規のヒト酸感知イオンチャンネルタンパク質（human Acid Sensing Ion Channel protein）であるhASIC1B、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチド、およびこれらの組成物の疾患の診断、予防、または治療への利用の発見に基づく。

【0056】

本発明のhASIC1Bをコードする核酸を、GenBankデータベースのウェブに基づくバーチャルスクリーニング（web-based virtual screening）により、始めて同定した。TblastN検索（search）をラットASIC1Bアミノ酸配列を入力問合せ配列（input query sequence）に用いて実施した。ヒトゲノムクローンAC025154（GenBank）をこのようにして同定した。同定した配列により、続いて特異的オリゴヌクレオチドプライマーの合成が可能になり、そのプライマーにより、ヒト三叉神経節から単離したRNAから逆転写DNAを利用してRT-PCRにより配列番号1の全長hASIC1B核酸分子を単離することができた。

【0057】

一実施形態において本発明は、新規のヒトプロトンゲート調節イオンチャンネル、すなわち図1に示した配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを包含する。hASIC1Bは、長さが562個のアミノ酸であり、2つの潜在的疎水性膜貫通ドメインを有する。図2に示すように、hASIC1BはASIC遺伝子ファミリーの他のメンバーと化学的および構造的相同性を有する。特に、複数のアミノ酸のモチーフまたは伸長部は、今までに同定された全てのASICサブユニット中に完全に保存されている。ヒトhASIC1Bは、開示されたラットASICβサブユニット（GenBank受託番号 ）と最高の同一性を示すが、N末端側が47個のアミノ酸だけさらに長い。ノーザンブロットおよびRT-PCR分析は、hASIC1Bが中枢および末梢神経系において感覚神経節に強く集中して発現されることを表す。

【0058】

本発明はまたhASIC1B変異体も包含する。好ましいhASIC1B変異体は、hASIC1Bアミノ酸配列（配列番号2）に対して、少なくとも80%、そしてさらに好ましくは90%アミノ酸配列同一性を有する変異体である。最も好ましいhASIC1B変異体は、配列番号2に対して少なくとも95%アミノ酸配列同一性を有する変異体であるが、97-99%アミノ酸配列同一性を有する変異体は特に最も好ましい。

【0059】

本発明はまた、hASIC1Bポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも包含する。従って、hASIC1Bのアミノ酸配列をコードするいずれの核酸配列を利用してhASIC1Bを発現する組換え分子を作製してもよい。特定の実施形態においては、本発明は、図1に示した配列番号1の核酸を含んでなるポリペプチドを包含する。

【0060】

当業者であれば、遺伝子コード縮重の結果として、hASIC1Bをコードする多数のヌクレオチドがあって、いずれの公知および天然遺伝子のヌクレオチド配列とも最小限の相同性しか有しない複数の上記ヌクレオチドを作りうることを理解するであろう。従って、本発明は、可能なコドン選択に基づく組み合わせを選択することによって作りうる、それぞれおよび全ての可能なヌクレオチド配列の変異体を意図する。これらの組み合わせは、標準トリプレット遺伝子コードを天然のhASIC1Bのヌクレオチド配列に適用して作られ、全てのそのような変異体は特定して開示されたとみなされなければならない。

【0061】

hASIC1Bおよびその変異体をコードするヌクレオチド配列は、天然のhASIC1Bのヌクレオチド配列と適当に選択したストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズできることが好ましい、しかし実質的に異なるコドン利用を有してhASIC1Bまたはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作るのが有利である場合がある。特定の原核生物または真核生物の発

10

20

30

40

50

現宿主においては、コドンを選択してペプチドの発現が起こる割合 (rate) を、宿主が利用する特定のコドンの頻度に従って増加させることができる。コードされるアミノ酸配列を変えずに hASIC1B およびその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変える他の理由は、天然の配列から産生される転写物より長い半減期などの、さらに望ましい特性を有する RNA 転写物の産生にある。

【0062】

本発明はまた、hASIC1B およびその誘導体をコードする DNA、またはその一部分の完全に合成化学による作製も包含する。作製した後に、本特許出願の時点で当技術分野で周知である試薬を用いて、その合成遺伝子を多くの利用しうるいずれの DNA ベクターおよび細胞系中に挿入してもよい。さらに、合成化学を用いて、突然変異を hASIC1B またはそのいずれかの部分をコードする配列中に導入してもよい。

10

【0063】

本発明はまた、請求の範囲に記載のヌクレオチド配列、特に配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と様々なストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド配列も包含する。ハイブリダイゼーション条件は、Berger および Kimmel (Meth Enzymol 1987: 152) に教示された核酸結合複合体またはプローブの融点 (T_m) に基づくものであり、規定したストリンジェンシーで利用することができる。

【0064】

本発明に包含される、hASIC1B をコードする改変された核酸配列は、同じまたは機能的に同等な hASIC1B をコードするポリヌクレオチドを生じる様々なヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を含む。コードされたタンパク質も、機能的に同等な hASIC1B を生じるアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を含有する。本発明に包含されるのはまた、増加したまたは新規の生物学的活性をもつ hASIC1B ポリペプチド (「機能の利得」)、または減少したまたは阻害された生物学的活性をもつ hASIC1B ポリペプチド (「機能の消失」または「優性ネガティブ」) をコードするポリヌクレオチドを生じる欠失、挿入または置換を含む、改変された核酸配列でもある。コードされたタンパク質も、本明細書に以上記載した、機能的に多様な hASIC1B を生じるアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を含有する。hASIC1B の生物学的活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づいて熟考したアミノ酸置換を行うことができる。例えば、負荷電アミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含んでもよく；正荷電アミノ酸はリシンおよびアルギニンを含んでもよく；そして類似の親水性を有する無荷電の極性ヘッド基をもつアミノ酸はロイシン、イソロイシン、およびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびトレオニン；フェニルアラニンおよびチロシンを含んでもよい。

20

30

【0065】

本発明の範囲内にはまた、hASIC1B をコードする遺伝子の対立遺伝子も含まれる。本明細書に使用される用語「対立遺伝子」または「対立遺伝子配列」は、核酸配列における少なくとも 1 つの突然変異から得られる代わりの遺伝子型である。対立遺伝子は、その構造または機能が改変されてもされなくてもよい改変された mRNA またはポリペプチドを生じる。いずれの所与の遺伝子もゼロ、1、または多数の対立遺伝子型を有しうる。対立遺伝子を生じる通常の突然変異性変化は、一般的に、ヌクレオチドの自然の欠失、付加、または置換に基づく。これらのタイプの変化はそれぞれ単独でまたは他との組み合わせで、所与の配列中に 1 以上の回数、起こりうる。

40

【0066】

当技術分野で周知でありかつ一般的に利用しうる DNA 配列決定の方法を、本発明のいずれの実施形態を実施するために利用してもよい。その方法は、DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、シーケナーゼ II (US Biochemical Corp, Cleveland, Ohio)、Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer)、熱安定性 T7 ポリメラーゼ (Amersham, Chicago, IL) などの酵素、または Gibco BRL (Gaithersburg, Md.) が販売するエロンガーゼ (ELONGASE) 増幅系などの組換えポリメラーゼと校正 (proofreading) エキソヌクレアーゼの組み合わせを採用しても

50

よい。好ましくは、上記方法を、例えば、ハミルトン・マイクロラボ2200 (Micro Lab 2000) (Hamilton, Reno, Nev.)、ペルチエ・サーマルサイクラー (Peltier Thermal Cycl er) (PTC200; M.J. Research, Watertown, Mass.) およびABI 377 DNAシーケンサー (Pe rkin Elmer)などの機械を用いて自動化する。

【0067】

hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドは、部分的なヌクレオチド配列を利用しかつプロモーターおよび調節配列などの上流配列を検出する当技術分野で公知の様々な方法を用いて伸長することができる。例えば、採用しうる1つの方法としての「制限部位 (restriction-site)」PCRは、普遍的なプライマーを用いて既知遺伝子座に隣接した未知配列を回収することができる (Sarkarら, PCR Meth Applic 1993; 2:318-322)。特に、ゲノムDNAを、最初に、リンカー配列に対するプライマーと既知領域に特異的なプライマーの存在のもとで増幅する。次に、増幅した配列を、同じリンカープライマーと最初のプライマーに対して内側の他の特異的プライマーを用いて、第2ラウンドのPCRにかける。PCRのそれぞれのラウンドの産物を適当なRNAポリメラーゼを用いて転写し、そして逆転写酵素を用いて配列決定する。 10

【0068】

インバースPCR (inverse PCR) も既知領域に基づく多様なプライマーを用いて配列を増幅または伸長するのに利用することができる (Trigliaら, Nuc. Acid Res. 1988 ; 16: 818 6)。プライマーは、GeneWorks 2.5.1またはMacVector 6.0.1 (Oxford Molecular Group、Cambridge, UK)、またはOLIGO 4.06プライマー解析ソフトウェア (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.)、またはいずれかの他の適当なプログラムを用いて、長さが22-30個のヌクレオチドであり、GC含量が50%以上であり、そして標的配列と約68-72℃でアニーリングするように設計することができる。上記方法は複数の制限酵素を用いて遺伝子の既知領域中に適当な断片を作製する。次いでその断片を分子内ライゲーションにより環状化してPCRテンプレートとして利用する。 20

【0069】

利用しうる他の方法はキャプチャーPCRであり、この方法はヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接したDNA断片のPCR増幅に関わる (Lagerstromら, PCR Meth Applic 1991; 1:111)。この方法では、PCRを実施する前に、多重制限酵素消化およびライゲーションも利用して、遺伝子操作した2本鎖配列をDNA分子の未知部分中に配置する。 30

【0070】

未知配列を検索するために利用しうる他の方法はParkerらの方法 (Nuc Acid Res. 1991; 19: 3055)である。さらにPCR、ネスト化プライマー、およびPromoterFinderTMライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA)を利用して、ゲノムDNA中を歩行 (walk) することができる。この方法は、ライブラリーをスクリーニングする必要をなくし、イントロン/エキソン接続部を見つけるのに有用である。

【0071】

全長cDNAをスクリーニングするときは、より大きいcDNAを含むようにサイズ選択されているライブラリーを用いるのが好ましい。また、無作為プライミングしたライブラリーも遺伝子の5'領域を含有する配列をより多く含有しうる点で好ましい。無作為プライミングしたライブラリーが特に好ましいのは、オリゴd(T)ライブラリーが全長cDNAを生じない状況に対してであろう。ゲノムライブラリーは、5'および3'非翻訳調節領域中への配列の伸長に対して有用でありうる。 40

【0072】

市販されるキャピラリー電気泳動システムを用いて、サイズを分析するかまたは配列決定のヌクレオチド配列またはPCR産物を確認することができる。特に、キャピラリー配列決定は、電気泳動分離のための流動性ポリマー、レーザー活性化される4種 (各ヌクレオチドに対して1種)の異なる蛍光染料、および電荷結合素子カメラによる発光波長の検出を採用することができる。出力/光強度は、適当なソフトウェア (例えば、ゲノタイパー (GenotyperTM) および配列ナビゲーター (Sequence NavigatorTM)、Perkin Elmer) を利 50

用して電気信号に変換し、サンプルの供給からコンピューター分析および電子データ表示までの全プロセスをコンピューター制御することができる。キャピラリー電気泳動は、特定サンプル中に限られた量しか存在しえないDNA小片の配列決定用に特に好ましい。

【0073】

本発明の他の実施形態においては、hASIC1Bまたは融合タンパク質またはそらの機能的同等物をコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、組換えDNA分子中に用いてhASIC1Bの発現を指令することができる。遺伝子コードの固有の縮重により、実質的に同じまたは機能的に同等のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を産生し、そしてこれらの配列を用いてhASIC1Bをクローニングしかつ発現してもよい。

【0074】

当業者であれば理解しうるように、非天然コドンを持ってhASIC1Bをコードするヌクレオチド配列を作ることは有利でありうる。例えば、特定の原核生物または真核生物にとって好ましいコドンを選択して、タンパク質発現の割合を増加するかまたは所望の特性、例えば天然配列から作製される転写物より長い半減期を有する組換えRNA転写物を産生することができる。

【0075】

本発明のヌクレオチド配列を当技術分野で公知の方法を用いて遺伝子操作し、限定されるものでないが、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および／または発現を修飾する改変などの様々な理由で、hASIC1Bをコードする配列を改変することができる。無作為断片化によるDNAシャッフリングならびに遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再アセンブリーを利用してヌクレオチド配列を遺伝子操作することができる。例えば、位置指定突然変異誘発を用いて、新しい制限酵素切断部位を挿入し、グリコシル化パターンを改変し、コドン優先度を変え、スプライス変異体または他の突然変異体を作るなどを行うことができる。あるいは、ヌクレオチド配列を遺伝子操作して、hASIC1Bチャンネルの部分他のASICサブユニット、例えばASIC1AまたはASIC2Aの同等部分によって置換したキメラASICチャンネルを作製することができる。

【0076】

本発明の他の実施形態においては、hASIC1Bをコードする天然、修飾、または組換えポリヌクレオチドを異種配列とライゲートして融合タンパク質をコードさせることができる。例えば、hASIC1B活性のインヒビターのペプチドライブラリーをスクリーニングするために、市販の抗体が認識しうるキメラhASIC1Bタンパク質をコードすることは有用である。融合タンパク質はまた、hASIC1Bをコードする配列と異種タンパク質配列の間に位置する切断部位を含有するように遺伝子操作して、hASIC1Bを切断し異種部分から精製して取出すこともできる。

【0077】

他の実施形態においては、hASIC1Bのコード配列を、当技術分野で周知の化学的方法を用いて、全体または部分で合成することができる (Caruthersら, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 1980; 215-23; Hornら, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 1980; 225-232を参照)。あるいは、タンパク質自身を、化学的方法を用いて作って、hASIC1Bアミノ酸配列またはその部分を合成することができ (Robergeら, Science 1995; 269: 202)、そして例えば、ABI 431A ペプチド合成機 (Perkin Elmer) を利用して自動合成を実施してもよい。

【0078】

新しく合成したペプチドは、分取高速液クロマトグラフィにより実質的に精製してもよい (例えば、Creighton T. (1983) 「Proteins, Structures and Molecular Principles (タンパク質、構造および分子的原理)」, W. H. Freeman & Co., New York, N. Y.)。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定により確認することができる (例えば、「the Edman degradation procedure (エドマン分解法)」; Creighton T. (1983)、前掲)。さらに、hASIC1Bのアミノ酸配列またはそのいずれかの部分を、直接合成中におよび／または化学的方法を用いて他のタンパク質からの配列もしくはその部分を組合わせて改変し、変異体ポリペプチドを作ることができる。

10

20

30

40

50

【0079】

生物学的活性のあるhASIC1Bを発現する目的で、hASIC1Bまたは機能的同等物をコードするヌクレオチド配列を適当な発現ベクター、すなわち、挿入したコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有するベクター中に挿入してもよい。

【0080】

当業者が周知する方法を利用して、コード配列ならびに適当な転写および翻訳制御エレメントを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、*in vitro* 組換えDNA技術、合成技術および*in vivo* 遺伝子組換えが挙げられる。そのような技術は、「Molecular Cloning : A Laboratory Manual (分子クローニング：研究室マニュアル)」, Sambrook J, 編, CSHL Press, 1989, Cold Spring Harbor, N.Y., および「Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学の現行プロトコル)」, Ausubelら, John Wiley & Sons, 1989, New York, N. Y.に記載されている。

10

【0081】

hASIC1Bコード配列を含有しかつ発現するために、様々な発現ベクター／宿主系を利用することができる。これらとしては、限定されるものでないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターを用いて形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を用いて感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）もしくは細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）を用いて形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。

20

【0082】

「制御エレメント」または「調節配列」は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を実施するベクターの非翻訳領域（エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域）である。そのようなエレメントの強度および特異性は様々である。利用するベクター系および宿主に依存して、構成および誘導プロモーターを含む適当な転写および翻訳エレメントをいくつ利用してもよい。例えば、細菌系のクローニングでは、Bluescript(登録商標)ファージミドのハイブリッドlacZプロモーター (Stratagene, La Jolla, CA) またはpSport1TM プラスミド (Gibco BRL) およびptrp-lacハイブリッドなどの誘導プロモーターを用いてもよい。他の好ましい原核生物ベクターとしては、限定されるものでないが、pQE-9、pQE60、pQE70 (Quiagen)、pNH8A、pNH16a、pNH18a、pNH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia) が挙げられる。バキュロウイルスの多角体プロモーターを昆虫細胞に利用してもよい。植物細胞のゲノム由来（例えば、熱ショック、RUBISCO；および貯蔵タンパク質遺伝子）または植物ウイルス由来（ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）のプロモーターまたはエンハンサーをベクター中にクローニングしてもよい。哺乳類細胞系においては、哺乳類遺伝子由来または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。もしhASIC1Bをコードする配列の多コピーを含有する細胞系を作製する必要があるれば、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーと共に用いてもよい。

30

【0083】

細菌系では、複数の発現ベクターを、hASIC1Bの意図する用途に依って選択することができる。例えば、抗体を誘導するために大量のhASIC1Bが必要である場合、容易に精製する融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターを利用することができる。そのようなベクターとしては、限定されるものでないが、Bluescript(登録商標) (Stratagene, La Jolla, CA) のような多機能大腸菌 (*E. coli*) クローニングおよび発現ベクター（この場合、hASIC1Bをコードする配列をβ-ガラクトシダーゼのアミノ末端メチオニンおよび続く7個の残基に対する配列と同じフレーム内でベクター中にライゲートして、ハイブリッドタンパク質を産生させることができる）；pINベクター (Van HeekeおよびSchuster, J. Biol. Chem. 1989; 264: 5503) ；その他が挙げられる；pGEXベクター (Promega, Madison, WI) も外来ポリペプチドをグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合タンパ

40

50

ク質として発現するために利用することができる。一般的に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、溶解細胞から、グルタチオンアガロースビーズへの吸着と続いて遊離グルタチオンの存在のもとでの溶出により、容易に精製することができる。このような系で作ったタンパク質を、ヘパリン、トロンビン、またはXA因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計して、思うままにクローニングした目的のポリペプチドをGST部分から遊離してもよい。

【0084】

細菌に加えて、酵母などの真核微生物も宿主として利用することができる。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の実験室株、パン酵母 (Baker's yeast) は最もよく利用されているが、他の複数の株または種も通常、利用できる。例えば、Broachら (Meth Enzymol 1983; 101: 307) の2 μ 複製起点、または他の酵母と共存しうる複製起点 (例えば、Stinchcombら, Nature 1979; 282: 39; Tschumperら, Gene 1980; 10: 157; Clarkeら, Meth Enzymol 1983; 101: 300を参照) を採用するベクターを利用してもよい。酵母ベクターの制御配列としては、解糖酵素の合成に対するプロモーターが挙げられる (Hessら J Adv Enzyme Reg 1968; 7: 149; Hollandら, Biochemistry 1978; 17: 4900)。当技術分野で公知のさらなるプロモーターとしては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (Hitzemanら, J Biol Chem 1980; 255: 2073)、アルコールオキシダーゼ、およびPGHに対するプロモーターが挙げられる。増殖条件および/または遺伝的背景により制御された転写を行う、さらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、 α 因子系、ならびにマルトースおよびガラクトース利用に関わる酵素に対するプロモーター領域である。また、ターミネーター配列はコード配列の3'末端にあることが望ましいと考えられる。そのようなターミネーターは、酵母由来の遺伝子のコード配列に続く3'非翻訳領域に見出される。総説は、「Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学の現行プロトコル)」, Ausubelら, John Wiley & Sons, 1989, New York, N. Y、およびGrantら, Meth Enzymol. 1987; 153: 516を参照すること。

【0085】

植物発現ベクターを利用する場合、hASIC1Bをコードする配列の発現は、プロモーターをいくつか使って駆動してもよい。例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターを単独でまたはTMV由来の ω (omega) リーダー配列と組合わせて利用することができる (Takamatsuら, EMBO J. 1987; 6: 307; Brissonら, Nature 1984; 310: 511)。あるいは、RUBISCOの小サブユニットまたは熱ショックプロモーターなどの植物プロモーターを利用してもよい (Coruzziら, EMBO J 1984; 3: 1671; Broglieら, Science 1984; 224: 838; Winterら, Results Probl. Cell Differ 1991; 17: 85)。これらの構築物は、直接DNA形質転換または病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞中に導入することができる。そのような技術は、複数の一般的に利用しうる総説に記載されている (例えば、Hobbs SまたはMurry LE in 「McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (McGraw Hill科学技術年鑑)」, McGraw Hill, 1992, New York, N. Y.; pp.191-196、またはWeissbachおよびWeissbach in 「Methods for Plant Molecular Biology (植物分子生物学)」, Academic Press, 1988, New York, N. Y.; pp.421-463を参照)。

【0086】

昆虫系も、hASIC1Bを発現するために利用することができる。例えば、そのような1つの系においては、オートグラフ核多角体病ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) (AcNPV) をベクターとして利用してスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞またはトリコプルシア (*Trichoplusia*) 幼生中に外来遺伝子を発現させる。hASIC1Bをコードする配列を、多角体遺伝子などのウイルスの非必須領域中にクローニングし、多角体プロモーターの制御下に置く。hASIC1Bの挿入に成功すると、多角体遺伝子は不活性化してコートタンパク質の欠如する組換えウイルスを産生する。次いでその組換えウイルスを用いて、例えば、S. フルギペルダ (*S. frugiperda*) 細胞またはトリコプルシア (*Trichoplusia*) 幼生に感染させ、そこでhASIC1Bを発現させるこ

とができる (Smithら, J Virol 1983; 46: 584; Engelhardら, Proc Natl Acad Sci 1994; 91: 3224)。

【0087】

哺乳類宿主細胞においては、ウイルスに基づく複数の発現系を利用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして利用する場合、hASIC1Bをコードする配列を、後期プロモーターおよび3部リーダー配列からなるアデノウイルス転写／翻訳複合体中にライゲートしてもよい。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域における挿入を利用して、感染宿主細胞でhASIC1Bを発現することができる生ウイルスを得てもよい (LoganおよびShenk, Proc Natl Acad Sci 1984; 81: 3655)。さらに、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーなどの転写エンハンサーを利用して、哺乳類宿主細胞における発現を増加させてもよい。

10

【0088】

特定の開始シグナルを、hASIC1Bをコードする配列のさらに効率的翻訳を達成するために利用することもできる。そのようなシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。hASIC1Bをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入する場合は、さらなる転写または翻訳制御シグナルを必要としないであろう。しかし、コード配列、またはその部分だけを挿入する場合は、ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを与えなければならない。さらに、開始コドンは、全インサートの正しい翻訳を保証するために、正しいリーディングフレーム内にあることが必要である。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは自然および合成両方の、様々な起源であってよい。発現の効率は、文献に記載のように、使用する特定の細胞系に適当であるエンハンサーの封入により増強することができる (Scharfら, Results Probl Cell Differ 1994; 20: 125; Bitnerら, Meth Enzymol 1987; 153: 516)。

20

【0089】

さらに、宿主細胞株は、挿入される配列の発現をモジュレートするまたは発現したタンパク質を所望の様式でプロセッシングするその能力について選択してもよい。ポリペプチドのそのような修飾としては、限定されるものでないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化が挙げられる。タンパク質の「プレプロ (prepro)」型を切断する転写後プロセッシングを利用して、正しい挿入、フォールディングおよび／または機能を促進してもよい。そのような翻訳後活性に対して特定の細胞機構および特徴的な機構を有するCHO、HeLa、MDCK、HEK293、W138、およびCOSのような様々な宿主細胞を選択して、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを保証することができる。

30

【0090】

好ましい発現系においては、cDNA種を直接アフリカツメガエル卵母細胞核中に挿入してそれによりin vitro翻訳させて機能的プロトンゲート調節チャンネルを形成し、そして上記チャンネルにより、in vivo特性を模擬するモデルアッセイに対して、イオン選択性、ゲート調節動力学、リガンド優先度、およびアミロライドなどの薬剤に対する感受性を含む、自然のプロトンゲート調節チャンネルの機能的特性を実証することができる。

【0091】

組換えタンパク質の長期、高収率産生のためには、安定した発現が好ましい。例えば、安定してhASIC1Bを発現する細胞系を、ウイルスの複製起点および／または内因性発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を同じまたは別のベクター上に含有する発現ベクターを用いて形質転換してもよい。ベクターの導入後、細胞を1-2日間濃縮培地中で増殖し、その後、それらを選択培地に切換える。選択マーカーの目的は選択耐性を与えることであり、その存在は導入した配列を成功裏に発現する細胞の増殖および回収を可能にする。安定して形質転換された細胞の耐性クローンを、その細胞型に適当な組織培養技術を用いて増殖することができる。

40

【0092】

選択系をいくつ使って形質転換細胞系を回収してもよい。それらとしては、限定されるも

50

のでないが、ヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら, Cell 1977; 11: 223) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら, Cell 1980; 22: 817) 遺伝子が挙げられ、それぞれ tk⁺-または aprt⁺-cells において採用することができる。また、抗代謝物、抗生物質、または除草剤耐性を選択のベースとして利用することができる; 例えば、メトトレキセート耐性を与える dhfr (Wiglerら, Proc Natl Acad Sci 1980; 77: 3567); アミノグリコシドネオマイシンおよび G-418 耐性を与える npt (Colbere-Garapinら, J Mol Biol 1981; 150: 1)、そしてそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ耐性を与える als または pat (Murry LE、前掲) が挙げられる。さらなる選択遺伝子が記載されていて、例えば、細胞がトリプトファン 10の代わりにインドールを利用することを可能にする trpB、または細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする hisD (Hartman および Mulligan, Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 8047) が挙げられる。最近、可視マーカーの利用がアントシアニン、β-グルクロニダーゼおよびその基質 GUS などのマーカーによって普及し、かつルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンは形質転換体を同定するためだけでなく特定のベクター系に帰属する一過性または安定したタンパク質発現の量を定量するためにも使われている (Rhodesら, Methods Mol Biol 1995; 55: 121)。

【0093】

マーカー遺伝子発現の存在／不在は目的の遺伝子も存在することを示唆するが、その存在 および発現を確認する必要がある。例えば、もし hASIC1B をコードする配列をあるマ 20ーカー遺伝子配列中に挿入すれば、hASIC1B をコードする配列を含有する組換え細胞はマーカー遺伝子機能の不在により同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子を、単一プロモーターの制御下で hASIC1B をコードする配列と直列に配置してもよい。誘導または選択に応答するマーカー遺伝子の発現は通常、直列配置遺伝子の発現も示す。

【0094】

あるいは、hASIC1B のコード配列を含有しかつ hASIC1B を発現する宿主細胞は、当業者に公 知の様々な方法により同定することができる。これらの方法としては、限定されるもので ないが、DNA-DNA または DNA-RNA ハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイ またはイムノアッセイ技術が挙げられ、核酸またはタンパク質を検出および／または定量 するための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含むものである。

【0095】

hASIC1B をコードするポリヌクレオチド配列の存在は、hASIC1B をコードするポリヌクレオ 30チドのプロープまたは部分または断片を用いる DNA-DNA または DNA-RNA ハイブリダイゼーションまたは増幅により検出することができる。核酸増幅に基づくアッセイは、hASIC1B をコードする配列に基づくオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーを利用して hASIC1B をコードする RNA または DNA を含有する形質転換を検出することに関わる。本明細書に使用される「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」は、プロープまたはアンプライマー (primer) として利用することができる、少なくとも約 10 個のヌクレオチドおよび約 60 個の数のヌクレオチド、好ましくは約 15~30 個のヌクレオチド、そしてさらに好ましくは約 20~25 個のヌクレオチドの核酸配列を意味する。

【0096】

タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を利用して、hASIC1B の 40発現を検出しかつ測定する様々なプロトコルが当技術分野で知られている。例としては、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) が挙げられる。hASIC1B 上の 2 つの非妨害エピトープと反応性のあるモノクローナル抗体を利用する 2 部位、モノクローナルに基づくイムノアッセイが好ましいが、競合結合アッセイを採用してもよい。これらのおよび他のアッセイは、他の場所のなかでも、「Serological Methods: A Laboratory Manual (血清学的方法: 研究室マニュアル)」, Hamptonら, APS Press, 1990, St-Paul, MI、および Maddoxら, J Exp Med 1983; 158: 1211) に記載されている。

【0097】

10

20

30

40

50

多様な標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られていて、様々な核酸技術およびアミノ酸アッセイに利用することができる。hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドに関係した配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを作る方法としては、標識したヌクレオチドを用いる、オリゴラベリング、ニック翻訳、末端ラベリングまたはPCR増幅が挙げられる。あるいは、hASIC1Bまたはそのいずれかの部分をコードする配列を、mRNAプローブを産生するベクター中にクローニングしてもよい。そのようなベクターは当技術分野では知られており市販されていて、これらを利用してT7、T3またはSP6などの適当なRNAポリメラーゼおよび標識したヌクレオチドを加えることによりRNAプローブをin vitro合成することができる。これらの方法は、様々な市販キット：例えば、Pharmacia & Upjohn, (Kalamazoo, MI) ; Promega (Madison, WI) ; およびU. S. Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio) 、またはAmbion (Austin, TX) を用いて実施してもよい。利用しうる適当なレポーター分子または標識としては、放射核種、酵素、蛍光、化学発光、または色素生産剤ならびに基質、補因子、インヒビター、磁気粒子などが挙げられる。

10

【0098】

hASIC1Bをコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞を、細胞培養物からタンパク質を発現しかつ回収するのに適当な条件のもとで培養してもよい。組換え細胞により産生されたタンパク質は、使用する配列および／またはベクターに依存して、分泌されるか細胞内に含有される。当業者であれば理解しうるように、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを、原核生物または真核生物細胞膜を通してhASIC1Bの分泌を指令するシグナル配列を含有するように、設計することができる。他の組換え構築物を利用して、hASIC1Bをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を容易にしうるポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列と接続してもよい。そのような精製を容易にするドメインとしては、限定されるものでないが、固定した金属上の精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュールなどの金属キレート化ペプチド、固定した免疫グロブリン上の精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAGS伸長／アフィニティ精製系で利用されるドメイン (Immunex Corp., Seattle, WA) が挙げられる。精製ドメインとhASIC1Bの間に因子XAまたはエンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego, CA) に特異的なリンカー配列を封入すると、これを利用して精製を容易にすることができる。そのような発現ベクターの1つは、hASIC1B、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位、および続いて6個のヒスチジン残基を含有する融合タンパク質を発現する。ヒスチジン残基はIMIAC (固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィ、Porathら, Protein Exp Purif 1992; 3: 263に記載) による精製を容易にする一方、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質からhASIC1Bを精製する方法を与える。融合タンパク質を含有するベクターの考察は、Krollら (DNA Cell Biol 1993; 12: 441) に記載されている。

20

30

【0099】

組換え産生のほかに、hASIC1Bの断片を、固相技術を利用して直接ペプチド合成により作ることができる (Stewartら, 「Solid-Phase Peptide Synthesis (固相ペプチド合成)」, WH Freeman & Co., 1969, San Francisco, CA.; Merrifieldら, J Am Chem Soc 1963; 85: 2149を参照)。化学合成は手作業技術でまたは自動化を利用して実施してもよい。自動化合成は、例えば、アプライド・バイオシステム431A (Applied Biosystems 431A) ペプチド合成機 (Perkin Elmer) を用いて実施できる。hASIC1Bの様々な断片を別々に化学合成し、化学的方法を用いて組合わせて全長分子を作ってもよい。

40

【0100】

従って、本明細書に述べたように、本発明はプロトンゲート調節チャンネルタンパク質の新規サブファミリーであって、図1 (配列番号) に記述した新規DNA配列、ならびに本発明のcDNAの最初の単離で採用したストリンジェンシーの条件と等しいかそれより高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件のもとでそれとハイブリダイズするDNA配列、および少なくとも部分的に縮重コドンの利用を介して上記対立遺伝子変異または類似のプロトンゲート調節チャンネルタンパク質をコードするDNA配列で例示される上記新規

50

サブファミリーを提供する。本配列はまた、Cannessaら (Nature 1994; 367: 463) に記載の、他の密接に関係したこのサブファミリーのメンバーを位置付けしかつ同定するためにも利用することができる。

【0101】

本発明の新規タンパク質産物は、図1および配列番号2で記述したプロトンゲート調節チャンネルタンパク質の一次構造コンフォメーション（すなわち、アミノ酸配列）をもつポリペプチド、ならびにそのペプチド断片およびそのアミノ酸配列の複製である組み立てた合成ペプチドを含む。本発明のタンパク質、タンパク質断片および合成タンパク質もしくはペプチドは、診療、診断、および予後アッセイおよびプロトコルを含む、先に記載した用途を有することを計画し、チャンネルタンパク質と特異的に反応性のあるモノクローナルおよびポリクローナル抗体の基礎を提供しうる。 10

【0102】

治療薬

本発明の他の実施形態においては、hASIC1Bまたはその断片を治療目的に使用することができる。hASIC1B（配列番号2）および他のASIC受容体（図2）の間の化学的および構造的相同性、ならびにhASIC1B転写物は独占的でないが主に末梢および中枢神経系の細胞に関連することを示すRT-PCRおよびノーザンブロット分析に基づいて、hASIC1Bは神経伝達物質放出、神経興奮性、興奮毒性または機械感覚の調節に或る役割を果たすと考えられる。実際、分泌顆粒およびシナプス小胞は高濃度のプロトン（低い小胞内pH）を含有することが知られていて、このプロトンは調節されたかつ構造的な開口分泌中に他の神経伝達物質と同時放出される。こうして、放出されたプロトンは前および／または後シナプス、またはシナプス外のhASIC1B受容体を活性化しうる。実際、ある特定の条件下では、低pHまたは細胞外アシドーシスはシナプス伝達ならびに長期増強の誘導に影響を与えることが示されている（Igelmundら, Brain Res 1995; 689: 9; Velisekら, Hippocampus 1998; 8: 24）。また、ある特定の動物発作モデルにおいて、低pHの神経保護効果も観察されている（Velisekら, Exp Brain Res 1994; 101: 44）。ASIC2Aはノックアウト動物を用いる機械検出に直接関係づけられている。さらに、hASIC1Bの第1エキソン中の特定の反復構造は、細胞骨格との相互作用またはアンカリングなどの複数の特定機能を示しうる。従って、hASIC1Bは機械ゲート調節イオンチャンネル（mechanogated ion channel）の重要な要素を構成しうる。従って、hASIC1Bの重要な用途は、神経伝達物質放出、シナプス効力、神経興奮性、または神経毒性を調節する化合物のスクリーニングである。このような化合物は、例えば、認知、知覚、学習、記憶、痛みおよびその他多くの関係する複数の生理学的および病理学的状況において有用でありうる。 20 30

【0103】

一実施形態においては、該タンパク質のアンタゴニストもしくはインヒビターまたはアンチセンス配列を発現するベクターを用いて、改変されたイオン輸送、シグナル伝達、およびアポトーシスから生じる神経系の障害および疾患を治療することができる。そのような疾患としては、限定されるものでないが、慢性痛み、炎症性痛み、糖尿病、癌およびAIDSに関係する神経障害性痛み、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、および筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、およびAIDSに関係するものを含む痴呆、ならびに、痙攣、癲癇、卒中、および不安と鬱病が挙げられる。 40

【0104】

他の実施形態においては、該タンパク質のアンタゴニストもしくはインヒビターまたはアンチセンス配列を発現するベクターを用いて、アンギナ、鬱血性心疾患、血管狭窄、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、および出血などの循環器病を治療することができる。

【0105】

他の実施形態においては、該タンパク質のアンタゴニストもしくはインヒビターまたはアンチセンス配列を発現するベクターを用いて、生殖系、特に雄性不妊症の障害および疾患 50

を治療することができるし、あるいはこれらを雄性避妊剤として用いることもできる。

【0106】

活性を増強するアゴニストおよびhASIC1Bの効果をブロックまたはモジュレートするアンタゴニストを、そのような増強または阻害が治療上所望である状況のもとで用いることができる。そのようなアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターは、当技術分野で一般的に知られる方法を利用して作ることができ、特に精製hASIC1Bを用いて抗体を産生させるかまたは医薬のライブラリーをhASIC1Bと特異的に結合する医薬についてスクリーニングすることに関わる。例えば、一態様においては、hASIC1Bに対して特異的である抗体を、アンタゴニストとして直接利用するか、またはhASIC1Bを発現する細胞もしくは組織へ医薬を運ぶためのターゲティングまたは送達機構として間接的に利用することができる。

10

【0107】

抗体は当技術分野で周知の方法を利用して作製することができる。そのような抗体としては、限定されるものでないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、1本鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーにより産生したフラグメントが挙げられる。中和化抗体（すなわち、二量体形成を阻害する抗体）は治療用途に特に好ましい。

【0108】

抗体を生産するために、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む様々な宿主を、hASIC1Bまたは免疫原性を有するそのいずれかの断片またはオリゴペプチドを用いる注射により免疫感作してもよい。宿主種に依存して、様々なアジュバントを用いて免疫応答を増加することができる。そのようなアジュバントとしては、限定されるものでないが、水酸化アルミニウムなどのフロイントのミネラルゲル、およびリゾレシチンなどの表面活性剤、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳化液、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが挙げられる。ヒトに用いるアジュバントの中では、BCG (bacilli Calmette-Guerin) およびコリネバクテリウム・パルヴム (Corynebacterium parvum) が特に好ましい。

20

【0109】

hASIC1Bに対する抗体を誘導するために用いるペプチド、断片、またはオリゴヌクレオチドは少なくとも5個のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも10個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有することが好ましい。それらが自然タンパク質のアミノ酸配列の部分と同一であり、そして小さい天然分子の全アミノ酸配列を含有しうることも好ましい。hASIC1Bアミノ酸の短い伸長部をキーホールリンペットヘモシアニンおよびキメラ分子に対して産生した抗体などの他のタンパク質の伸長部と融合してもよい。

30

【0110】

hASIC1Bに対するモノクローナル抗体は、連続培養細胞系により抗体分子を産生するいずれの技術を利用して調製してもよい。これらとしては、限定されるものでないが、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイドーマ技術が挙げられる (Koehlerら Nature 1975; 256: 495; Kosborら, Immunol Today 1983; 4: 72; Coteら, Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 2026; Coleら, 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (モノクローナル抗体と癌治療)」, Alan R. Liss Inc., 1985, New York, NY, pp. 77-96)。

40

【0111】

さらに、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術であって、マウス抗体遺伝子をスプライシングしてヒト抗体遺伝子とし、適当な抗原特異性および生物学的活性をもつ分子を得る上記技術を利用することができる (Morrisonら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855; Neubergerら (1984) Nature 312: 604-608; Takedaら (1985) Nature 314: 452-454)。あるいは、1本鎖抗体を産生するための記載された技術を、当技術分野で知られる方法を用いて、hASIC1B特異的1本鎖抗体を産生するのに適応させることができる。関係する特異性をもつが、異なるイディオタイプ組成の抗体を無作為コンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーからチェーンシャッフリング (chain shuffling) を利

50

用して作製してもよい (Burton, D. R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 11120-3)。

【0112】

抗体はまた、リンパ球集団でin vivo産生を誘導することにより、または免疫グロブリンライブラリーもしくは高度に特異的結合をする試薬のパネルをスクリーニングすることにより産生することができ、これらは文献に開示されている (Orlandiら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837; Winter, G.ら (1991) Nature 349: 293-299)。

【0113】

hASIC1Bとの特異的結合部位を含有する抗体フラグメントを作製することもできる。例えば、そのようなフラグメントとしては、限定されるものでないが、抗体分子のペプシン消化により作ることができるF(ab')₂フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより作製することができるFabフラグメントが挙げられる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して、所望の特異性をもつモノクローナルFabフラグメントを迅速かつ容易に同定できるようにしてもよい (Huseら (1989) Science 256: 1275-1281)

様々なイムノアッセイを利用してスクリーニングを行い、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性をもつポリクローナルまたはモノクローナル抗体を利用する競合結合または免疫放射線測定アッセイ用の多数のプロトコルが、当技術分野では周知である。そのようなイムノアッセイは、典型的には、hASIC1Bとその特異的抗体との複合体形成の測定に関わる。2つの非干渉性hASIC1Bエピトープと反応性のあるモノクローナル抗体を利用する2部位、モノクローナルに基づくイムノアッセイが好ましい、しかし競合アッセイを採用してもよい (Maddox、前掲)。

【0114】

本発明の他の実施形態においては、hASIC1B、またはそのいずれかの断片をコードするポリヌクレオチド、またはアンチセンス配列を治療目的に使用することができる。一態様においては、タンパク質の合成をブロックするのが所望である状況において、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスを利用してよい。特に、細胞を、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列を用いて形質転換してもよい。従って、アンチセンス配列を利用してhASIC1B活性をモジュレートするか、または遺伝子機能の調節を達成することができる。そのような技術は現在、当技術分野で周知であり、hASIC1Bをコードする配列のコード領域または制御領域に沿った様々な位置からなる、センスまたはアンチセンスのオリゴマーまたはさらに大きな断片を設計することができる。

【0115】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスもしくはワクシニアウイルスから、または様々な細菌プラスミドから誘導された発現ベクターを、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団に送達するために利用することができる。当技術分野で周知の方法を利用して、hASIC1Bをコードする遺伝子のアンチセンスポリヌクレオチドを発現しうる組換えベクターを構築してもよい。これらの技術は、Sambrookら (前掲) と Ausubelら (前掲) の両方に記載されている。

【0116】

hASIC1Bをコードする遺伝子を、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を高レベルで発現する発現ベクターによって細胞または組織を形質転換することにより、消す (turn off) ことができる。そのような構築物を用いて翻訳不能なセンスまたはアンチセンス配列を細胞中に導入することができる。DNA中に組込まれなくてもそのようなベクターは、最後に全コピーは内因性ヌクレアーゼにより無能化されるまでRNA分子を転写し続ける。

【0117】

非複製ベクターによる一過性発現は1ヶ月以上、もし適当な複製エレメントがベクター系の部分であればもっと長く持続しうる。

【0118】

以上述べたように、遺伝子発現の改変は、hASIC1Bをコードする遺伝子の制御領域、すなわち、プロモーター、エンハンサー、およびイントロンに対するアンチセンス分子、DNA、RNAまたはPNAを設計することにより達成することができる。転写開始部位、例えば、転写物の5'末端からの位置-10および+10の間、から誘導したオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、阻害は、「3重らせん体 (triple helix)」に基づく対合手法によって達成することができる。3重らせん体対合が有用であるのは、それが2重らせん体のポリメラーゼ、転写因子、もしくは調節分子と結合するために十分に開く能力を阻害するからである。最近の3本鎖DNAを用いる治療の進歩は文献に記載されている (Gee, J. E.ら (1994) In : Huber, B. E.およびCarr, B. I. 「Molecular and Immunologic Approaches (分子および免疫学的手法)」, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y.)。アンチセンス分子も、転写物のリボソームとの結合を阻止することにより、mRNAの翻訳をブロックするように設計することができる。

10

【0119】

リボザイム、すなわち酵素RNA分子も、RNAの特異的切断を触媒するのに利用することができる。リボザイムの作用機構は、リボザイム分子の相補的な標的RNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションとそれに続くヌクレオチド鎖分解による切断に関わる。利用しうる例としては遺伝子操作したハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が挙げられ、hASIC1Bをコードする配列のヌクレオチド鎖分解切断を特異的かつ効率的に触媒することができる。

【0120】

最初に標的分子をGUA、GUU、およびGUCの配列を含むリボザイム切断部位について走査することによって、あらゆる潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位を同定する。いったん同定されれば、切断部位を含有する標的遺伝子の領域に対応する15~20個のリボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドを機能しないようにする二次構造的特徴について評価することができる。候補標的の適性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対するアクセシビリティを試験することによって評価することもできる。

20

【0121】

本発明のアンチセンス分子およびリボザイムは、RNA分子の合成に対する当技術分野で知られるいずれの方法により調製してもよい。これらは、固相ホスホロアミダイト化学合成などのオリゴヌクレオチドを化学的に合成する技術を含む。あるいは、RNA分子をhASIC1BをコードするDNA配列のin vitroおよびin vivo転写により作製してもよい。そのようなDNA配列を様々なベクター中に、T7またはSP6などの適当なRNAポリメラーゼプロモーターとともに組込むことができる。あるいは、アンチセンスRNAを構成的にまたは誘導的に合成するこれらのcDNA構築物を、細胞系、細胞、または組織中に導入してもよい。

30

【0122】

RNA分子を改変して細胞内安定性および半減期を増加することができる。可能な改変としては、限定されるものでないが、分子の5'および／または3'末端におけるフランキング配列の付加、または分子の主鎖内でのホスホジエステル結合よりむしろホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられる。この概念はPNAの産生に固有のものであって、内因性エンドヌクレアーゼにより容易に認識されないイノシン、キューオシン、およびワイブトシン、ならびにアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル-、メチル-、チオ-、および類似の改変型などの非伝統的塩基を含むこれらの分子の全てに拡張することができる。

40

【0123】

ベクターを細胞または組織中に導入するための多くの方法が、in vivo、in vitro、およびex vivoの使用に利用しうるしかつ等しく適当である。ex vivo治療のため、ベクターを患者から採取した幹細胞中に導入し、クローニングにより増殖して自家移植体として同じ患者に戻すことができる。トランスフェクションによるおよびリボソーム注入による送達

【0124】

50

上記のあらゆる治療法は、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトなどの哺乳類動物を含むいずれの適当な被験体にも適用することができる。

【0125】

本発明のさらなる実施形態は、以上考察したいずれかの治療効果をあげるために、医薬組成物を製薬上許容される担体と一緒に投与することに関する。そのような医薬組成物は、hASIC1B、hASIC1Bに対する抗体、hASIC1Bの模倣物 (mimetic)、アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターでありうる。該組成物は単独で、またはいずれかの安定化化合物などの少なくとも1つの他の薬剤と組合わせて投与してもよく、限定されるものでないが、塩類、緩衝化塩類、デキストロース、および水を含む無菌で生体適合性の製薬担体に入れて投与してもよい。組成物を単独でまたは他の薬剤、薬物またはホルモンと一緒に患者に投与してもよい。

10

【0126】

本発明において利用する医薬組成物は、限定されるものでないが、経口、静脈内、筋内、動脈内、髄内、くも膜下腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下、または直腸による方法を含むいずれの数の径路により投与してもよい。これらの医薬組成物は、活性成分のほかに、活性化合物の医薬上使用しうる調製物への加工を容易にする賦形剤および助剤を含む適当な製薬上許容される担体を含有してもよい。製剤および投与のための技術のさらなる詳細は、「Remington's Pharmaceutical Sciences (レミントンの製薬科学)」(Maack Publishing Co., Easton, Pa.)の最新版に見出しうる。

【0127】

経口投与用の医薬組成物は、当技術分野で周知の製薬上許容される担体を用いて経口投与に適した投与量で製剤することができる。そのような担体により、医薬組成物を患者による摂取のための錠剤、ピル、糖剤、カプセル、液剤、ジェル、シロップ、スラリー、懸濁剤などとして製剤することができる。

20

【0128】

経口用の医薬調製物は、活性化合物と固体賦形剤とを組合わせ、場合によっては得られる混合物を粉砕しかつ、もし所望であれば、錠剤または糖衣コアを得るための適当な助剤を加えた後に顆粒の混合物を加工することを通して、得ることができる。適当な賦形剤は、炭水化物またはタンパク質フィラー、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ、または他の植物からのデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、またはナトリウムカルボキシメチルセルロースなどのセルロース；アラビックおよびトラガカントを含むガム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質である。もし所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはそれらの塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤または可溶化剤を加えてもよい。

30

【0129】

糖剤コアを、アラビックゴム、ポリビニルピロリドン、カルボボルジェル (carbopol gel)、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および有機溶媒または溶媒混合液も含有する高濃度糖溶液のような、適当なコーティングと一緒に使ってもよい。製品同定のためにまたは活性化合物の量すなわち、投与量を特徴付けるために、染料または含量を錠剤または糖剤コーティングに加えてもよい。

40

【0130】

経口用を使用しうる医薬調製物としては、ゼラチンで作ったプッシュ-フィットカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどのコーティングで作ったシールしたソフトカプセルが挙げられる。プッシュ-フィットカプセルは、ラクトースまたはデンプンなどのフィラーまたは結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および場合によっては、安定剤と混合した活性成分を含有してもよい。ソフトカプセルでは、活性化合物を、脂肪油液、または液状ポリエチレングリコールなどの適当な液中に安定剤とともにまたはなしで溶解または懸濁してもよい。

【0131】

50

非経口投与用に適当である医薬製剤は、水溶液、好ましくはハンク（Hank）溶液、リンゲル（Ringer）溶液、または緩衝化生理食塩水などの生理学的に適合しうるバッファーに入れて製剤することができる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加する物質を含有してもよい。さらに、活性化化合物の懸濁液は、適当な油性注射懸濁液として調製することもできる。適当な親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが挙げられる。場合によっては、懸濁液はまた、適当な安定剤または化合物の溶解度を増加して高濃度溶液の調製を可能にする薬剤を含有してもよい。

【0132】

局所または経鼻投与に対しては、透過すべき特定のバリエーションにとって適当な貫入剤を製剤に用いる。そのような貫入剤は、当技術分野で公知である。

【0133】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で知られる方法、例えば、通常の混合、溶解、造粒、糖衣、磨砕、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥の方法により製造することができる。

【0134】

医薬組成物は、塩として与えてもよく、かつ、限定されるものでないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などの多数の酸を用いて作ることができる。塩は、対応する遊離塩基形態よりも水溶液または他のプロトン性溶媒中によく溶解する傾向がある。他の事例では、好ましい調製物は凍結乾燥粉末であって、1-50mM ヒスチジン、0.1%-2%スクロース、および2-7%マンニトールのいずれかまたは全てを含有してもよく、pH範囲は4.5から5.5であり、使用前にバッファーと組み合わせる。

【0135】

医薬組成物を調製した後に、それらを適当な容器に収納して治療の適応症に対するラベルを付ける。そのようなラベルは、hASIC1Bの投与についての量、頻度、および治療方法を含みうる。本発明における使用に適当な医薬組成物は、活性成分を意図する目的を達成するために有効な量だけ含有する組成物を含む。有効な用量は当業者の能力により十分決定できる。

【0136】

いずれの化合物についても、治療上有効な用量は、最初に、例えば新生物細胞の細胞培養アッセイ、または、通常、マウス、ウサギ、イヌ、またはブタである動物モデルにおいて評価することができる。動物モデルはまた、適当な濃度範囲および投与径路を決定するために利用してもよい。次いで、そのような情報を用いてヒトにおける投与に対する有効な用量および径路を決定する。治療上有効な用量は、症候群または症状を改善する活性成分、例えばhASIC1Bまたはその断片、hASIC1Bの抗体、hASIC1Bのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターの量を意味する。治療有効性および毒性は、細胞培養または実験動物において標準の製薬上の方法により決定することができ、例えば、ED50（集団の50%において治療上有効な用量）およびLD50（集団の50%に対する致死用量）である。治療と毒性効果の間の用量比が治療指数であり、比LD50/ED50として表すことができる。

【0137】

大きい治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータをヒトに用いる用量範囲を製剤するのに利用する。そのような組成物に含有される投与量は、好ましくはED50を含みかつ毒性が少ししかないかまたは全く無い循環濃度の範囲内にある。投与量はこの範囲内で、利用する投与剤形、患者の感受性、および投与径路に依存して変化する。

【0138】

正確な投与量は、開業医が、治療を必要とする被験者に関する諸因子を照合して決定しうる。投与量および投与は、十分なレベルの活性部分を与えるかまたは所望の効果を維持するように調節する。考慮すべき因子としては、病状の重篤度、被験者の一般的健康状態、

10

20

30

40

50

年齢、体重、および被験者の性別、食事、投与の時間および頻度、薬物組合わせ、反応感受性、ならびに治療に対する耐性／応答性が挙げられる。長期作用医薬組成物を、特定の製剤の半減期およびクリアランス率に依存して、3または4日毎、毎週、または隔週投与してもよい。

【0139】

通常、投与量は、投与径路に依存して、0.1~100,000 μ g、全用量約1 gまで変化する。特定の投与量および送達の方法に関する手引きは文献に与えられていて、一般的に当技術分野の開業医は利用する。当業者であれば、ヌクレオチドに対しては、タンパク質またはそのインヒビターに対するのと異なる製剤を採用するであろう。同様にポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、条件、部位などに対して特異的であろう。

10

【0140】

診断

他の実施形態においては、hASIC1Bと特異的に結合する抗体を、hASIC1Bの発現が特徴である症状または疾患の診断に、またはhASIC1B、アゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターを用いて治療する患者をモニターするアッセイに利用することができる。診断の目的に有用な抗体は、上記の治療用抗体と同じ要領で調製することができる。hASIC1Bの診断アッセイは、ヒトの体液または細胞もしくは組織の抽出物中のhASIC1Bを検出するために抗体および標識を利用する方法を含む。抗体は、改変してまたは改変しないで利用してもよく、かつそれらを共有結合もしくは非共有結合によりレポーター分子と接続することにより標識してもよい。当技術分野で知られる広範囲のレポーター遺伝子を利用することができるのであって、それらの数例を上に記載した。

20

【0141】

hASIC1Bを測定するための、ELISA、RIA、およびFACSを含む様々なプロトコルが当技術分野では知られていて、改変されたまたは異常なhASIC1B発現のレベルを診断する基準を提供する。hASIC1B発現の正常または標準値は、正常な哺乳類被験者、好ましくはヒトから採取した体液または細胞抽出物をhASIC1Bに対する抗体と、複合体形成に適切な条件のもとで組み合わせることにより確立する。標準複合体形成の量は、様々な方法により、好ましくは測光手段により定量することができる。対照および罹患被験者において生検組織からのサンプルに発現したhASIC1Bの量を標準値と比較する。標準値と被験者値の間の偏差が、疾患を診断するためのパラメーターとなる。

30

【0142】

本発明の他の実施形態においては、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチドを診断の目的に利用することができる。利用するポリヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド配列、アンチセンスRNAおよびDNA分子、およびPNAが挙げられる。ポリヌクレオチドは、hASIC1Bの発現が疾患と相関のある生検組織中の遺伝子発現を検出しかつ定量するのに利用することができる。診断アッセイを利用して、hASIC1Bの不在、存在、および過剰発現を識別し、かつ治療介入中のhASIC1Bレベルの調節をモニターすることができる。

【0143】

一態様においては、hASIC1Bもしくは密接に関係した分子をコードする、ゲノム配列を含む、ポリヌクレオチドを検出できるPCRプローブとのハイブリダイゼーションを利用して、hASIC1Bをコードする核酸配列を同定することができる。プローブの特異性、すなわち、それが高度に特異的領域、例えば、5'調節領域における10個のユニークなヌクレオチド、または例えば、特に3'コード領域における低度の特異的領域からなるかどうか、およびハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジェンシー（最大、高、中、または低）が、そのプローブがhASIC1Bをコードする天然配列だけ、対立遺伝子、または関係する配列を同定するかどうかを決定する。

40

【0144】

プローブはまた、関係配列を検出するために利用することもでき、その場合、好ましくはhASIC1Bをコードする配列のいずれか由来のヌクレオチドを少なくとも50%を含有しなければならない。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAであってもよく

50

、かつ配列番号1のヌクレオチド配列からまたは天然hASIC1Bのプロモーター、エンハンサーエレメント、およびイントロンを含むゲノム配列から誘導してもよい。

【0145】

hASIC1BをコードするDNAに対する特異的ハイブリダイゼーションプローブを産生する方法は、hASIC1BまたはhASIC1B誘導体をコードする核酸配列を、mRNAプローブを産生するベクター中にクローニングするステップを含む。そのようなベクターは当技術分野で知られかつ市販されているので、それを用いて、適当なRNAポリメラーゼと適当な標識したヌクレオチドを加える方法により、RNAプローブをin vitro合成することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、様々なレポーターグループ、例えば、32Pまたは35Sなどの放射性核種、またはアビジン／ビオチン結合系を経由してプローブと結合したアルカリホスファターゼなどの酵素標識などにより標識することができる。hASIC1Bをコードするポリヌクレオチド配列は、hASIC1Bの発現に関連する症状または疾患の診断に利用することができる。症状または疾患の例としては、慢性痛み、糖尿病、癌、およびAIDSに関係する神経障害性痛み、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、および筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、およびAIDSに関するものなどの痴呆、ならびに、痙攣、癲癇、卒中、および不安と鬱病、アンギナ、鬱血性心疾患、血管狭窄、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、および出血などの循環器病が挙げられる。患者生検から得た体液または組織を用いるサザンまたはノーザン分析、ドットプロット、または他の膜に基づく技術；PCR技術；またはディップスティック (dip stick)、ピン、ELISAまたはチップアッセイにおいて、hASIC1Bをコードするポリヌクレオチド配列を利用して、hASIC1Bの改変された発現を検出することができる。そのような定性または定量的方法は当技術分野において周知である。

10

20

【0146】

特定の態様においては、hASIC1Bをコードするヌクレオチド配列は様々な神経学的または他の非神経学的障害、特に以上記載した障害を検出するアッセイに有用である。hASIC1Bをコードするヌクレオチド配列を標準の方法により標識し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に適当である条件下で、患者から採取した液または組織サンプルに加えてもよい。適当なインキュベーション時間の後、サンプルを洗浄してシグナルを定量して標準値と比較する。もし生検もしくは抽出サンプル中のシグナルの量が比較しうる対照サンプルのそれから有意に変化していれば、上記ヌクレオチド配列はサンプル中のヌクレオチド配列とハイブリダイズして、サンプル中のhASIC1Bをコードするヌクレオチド配列のレベルの変化が関連疾患の存在を示す。またそのようなアッセイを利用して、動物研究、臨床研究、または個々の患者の治療モニタリングにおける特定の治療処置体制の有効性を評価することもできる。

30

【0147】

hASIC1Bの発現に関連する疾患の診断に対する基準を与えるために、発現の正常または標準プロファイルを確立した。これは、動物またはヒトの正常な被験者から採取した体液または細胞抽出物を、hASIC1Bをコードする配列もしくはその断片と、ハイブリダイゼーションまたは増幅に適当な条件下で組合わせることにより実施することができる。標準ハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と実質的に精製したポリヌクレオチドの既知量を用いた実験から得た値とを比較することにより定量することができる。正常なサンプルから得た標準値を疾患の徴候がある患者由来のサンプルから得た値と比較してもよい。標準と被験者値との間の偏差を用いて疾患の存在を確立する。

40

【0148】

いったん疾患を確立して処置プロトコルを開始すると、ハイブリダイゼーションアッセイを定期的基準で繰返し、患者における発現のレベルが通常の患者で観察されるレベルに近づき始めるかどうかを評価する。逐次アッセイから得た結果を用いて、数日から数ヶ月の範囲の期間にわたる治療の有効性を示すことができる。

【0149】

神経学的疾患に関して、個人からの生検組織中の転写物の比較的高い量は、その疾患の発

50

生に対する素因を示すかまたは実際の臨床症候群出現に先立って疾患を検出する手段を提供しうる。このタイプのより明確な診断により、保健専門家は予防的対策または攻撃的治療を早い段階で採用し、それにより疾患の発生またはさらなる進行を防止することができる。

【0150】

hASIC1Bをコードするオリゴヌクレオチドのさらなる診断上の用途は、PCRの用途に関わりうる。そのようなオリゴマーは、化学的に合成し、酵素によって作製し、または組換え供給源から産生することができる。オリゴマーは好ましくは2つのヌクレオチド配列、1つはセンス方向そして他の1つはアンチセンスからなり、特定の遺伝子または症状を同定するための最適な条件のもとで使用する。同じ2つのオリゴマー、すなわちオリゴマーのネスト化セットまたはオリゴマーの縮重プールでも、より低いストリンジェンシーの条件下で、密接に関連したDNAまたはRNA配列の検出および／または定量に利用することができる。

10

【0151】

hASIC1Bの発現を定量するために利用しうる方法としてはまた、放射標識またはビオチン化ヌクレオチド、対照核酸の同時増幅、および実験結果を内挿した標準曲線も挙げられる (Melby, P. C.ら (1993) J. Immunol. Methods, 159: 235-244; Duplaa, C.ら (1993) Anal. Biochem. 229-236)。多サンプルの定量速度は、アッセイを、目的のオリゴマーを様々な希釈度で提示しかつ分光光度または比色応答が高速の定量値を与えるELISAフォーマットで実施することにより加速することができる。

20

【0152】

本発明の他の実施形態においては、hASIC1Bをコードする核酸配列を利用して、天然ゲノム配列をマッピングするのに有用であるハイブリダイゼーションプローブを作製することもできる。周知の技術を用いて、配列を特定の染色体に、または染色体の特定領域にマッピングすることができる。そのような技術としては、FISH、FACS、または酵母人工染色体などの人工染色体構築物、細菌人工染色体、細菌P1構築物または単一染色体cDNAライブラリーが挙げられ、Price, C. M. (1993; Blood Rev. 7: 127-134) およびTrask, B. J. (1991; Trends Genet. 7: 149-154) の総説に記載されている。

【0153】

FISH (Vermaら (1988) 「Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (ヒト染色体：基礎技術のマニュアル)」, Pergamon Press, New York, N.Y.に記載) は他の物理的染色体マッピング技術および遺伝子マップデータと相関がありうる。遺伝マップデータの例は、1994年「Genome Issue of Science (Scienceのゲノム特集号)」 (265:1981f) に見ることができる。hASIC1Bをコードする遺伝子の物理的染色体マップ上の位置と特定疾患または特定疾患に対する素因との相関は、遺伝病に関連するDNAの領域を限定するのに役立ちうる。本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、または罹患者の間の遺伝子配列の差を検出することができる。

30

【0154】

染色体調製物のin situハイブリダイゼーションおよび確立した染色体マーカーを用いる連鎖解析などの物理的マッピング技術は、遺伝地図を広げるために利用することができる。特定のヒト染色体の番号またはアームが未知であっても、しばしば、マウスなどの他の哺乳類動物種の染色体上の遺伝子の配置が関連するマーカーを示しうる。物理的マッピングにより、新しい配列を、染色体アームまたはその部分に割当てることができる。これは、研究者が位置クローニングまたは他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探すための貴重な情報を与える。いったん疾患または症候群が、遺伝連鎖により、大雑把に特定のゲノム領域、例えばAT~11q22-23に局在化されると (Gattiら (1988) Nature 336: 577-580)、その領域にマッピングするいずれの配列もさらなる研究のための関連または調節遺伝子となりうる。本発明のヌクレオチド配列はまた、正常者、保有者、または罹患者の間の転座 (translocation)、逆位 (inversion) などによる染色体位置の差を検出するのに利用することもできる。

40

50

【0155】

スクリーニングアッセイ

本発明の他の実施形態においては、hASIC1B、その触媒または免疫原性断片またはそのオリゴマーを利用して、様々な薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、化合物のライブラリーをスクリーニングすることができる。そのようなスクリーニングに採用する断片は、溶液中に遊離していても、固体支持体に付着していても、細胞表面上に保持されていても、または細胞内に位置してもよい。hASIC1Bと試験する薬剤との間の結合複合体の形成を測定してもよい。このようにして、本発明のポリペプチドはまた、小分子基質と、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリー、および自然産物混合物中のリガンドとの結合を評価するために利用してもよい。これらの基質とリガンドは自然の基質とリガンドであってもよいしまたは構造的もしくは機能的模倣物であってもよい。一般的に、そのようなスクリーニング方法は、その表面上に本発明の受容体ポリペプチドを発現する適当な細胞を作ることに関わる。そのような細胞としては、哺乳類動物、酵母、昆虫（例えば、ショウジョウバエ）または細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*））が挙げられる。次に、受容体を発現する細胞（または、発現した受容体を含有する細胞膜）を試験化合物と接触させて、結合、または機能的応答の刺激もしくは抑制（例えば、プロトン活性化電流の抑制）を観察する。

10

【0156】

アッセイは候補化合物の結合を単純に試験してもよく、その場合、受容体を担う細胞に対する接着を、直接または間接に候補化合物に関連する標識を使うことによるか、または標識した競合物との競合に関わるアッセイで検出する。さらに、これらのアッセイは、受容体の活性化により発生するシグナルを候補化合物が生じるかどうかを、その表面に受容体を担う細胞に適当な検出系（例えば、パッチクランプによるか、または好ましくはイオンイメージングにより測定したイオン透過の増加）を用いて試験してもよい。活性化のインヒビターは一般的に既知のアゴニスト（agonist）（例えば、プロトン）の存在のもとでアッセイし、アゴニストによる活性化に対する候補化合物の効果を観察する。そのようなスクリーニングアッセイを実施する標準的方法は当技術分野では十分理解されている。典型的には、その応答を細胞の電圧固定（voltage clamping）のような測定方法を伴うマイクロ電極技術を利用して測定し、その場合、イオンチャンネルの活性化はマイクロ電極を用いて検出した内向きまたは外向き電流により確認することができる。²²Na、⁸⁶Rb、⁴⁵Ca放射標識陽イオンまたは¹⁴Cもしくは³Hグアニジンを用いてそのようなイオン流束を評価してもよい；ナトリウム、カルシウムまたはカリウムイオン感受性染料（例えば、フラ-2（Fura-2）、またはインド（Indo））を用いて受容体イオンチャンネルを通してのイオン通過をモニターしてもよいし、または電位感受性染料を用いて脱分極などの電位変化をモニターしてもよい。

20

30

【0157】

あるいは、構成的活性hASIC1Bチャンネルを作る目的で、hASIC1B cDNAを突然変異することも可能であり、これは他のDEG/EnaCファミリーメンバーで示されている（Huangら、*Nature* 367: 467；Waldmanら、*J Biol Chem* 1997: 271; 10433）。そして、構成的活性hASIC1Bチャンネルを宿主細胞に発現させて、チャンネル活性が不変であるスクリーニングアッセイを作ることができる。チャンネル活性の記録は、直接的に（例えば、パッチクランプ）もしくは間接的に（例えば、蛍光プローブ）膜電圧分析によりまたはナトリウム進入測定（放射性ナトリウム流入流束、蛍光プローブ、またはレポーター遺伝子）により実施することができる。

40

【0158】

利用しうる他の薬物スクリーニングの技術は、目的のタンパク質と適当な結合アフィニティを有する化合物のハイスループット・スクリーニングを提供し、公開PCT出願特許W084/03564に記載の通りである。この方法においては、hASIC1Bに適用する場合、多数の様々な小分子試験化合物を固相基質、例えば、プラスチックピンまたはその他の表面上に合成する。該試験化合物をhASIC1Bまたはその断片と反応させ、そして洗浄する。結合したhASIC

50

1Bを次いで当技術分野で周知の方法により検出する。精製したhASIC1Bを直接プレート上にコートして上記の薬物スクリーニング技術に利用してもよい。あるいは、非中和化抗体を利用してペプチドを捕獲してそれを固体支持体上に固定してもよい。

【0159】

他の実施形態においては、hASIC1Bと結合しうる中和化抗体がhASIC1Bとの結合について試験化合物と特異的に競合する、競合薬物スクリーニングアッセイを利用してもよい。この方式においては、抗体を用いて、1以上の抗原決定基をhASIC1Bと共有するあらゆるペプチドの存在を検出することができる。

【0160】

さらなる実施形態においては、hASIC1Bをコードするヌクレオチド配列を今後開発されるいずれの分子生物学技術に使用してもよい、ただし、上記新技術は、限定されるものでないが、トリプレット遺伝子コードおよび特定の塩基対相互作用のような特性を含む、現在公知のヌクレオチド配列の特性に依ることを条件とする。

【実施例】

【0161】

実施例

以下の実施例は本発明をさらに説明することを意図するものであり、本発明の範囲をいずれの方法でも限定することを意図するものではない。今までまたは以下の実施例においてのいずれであれ、本明細書に引用した全ての参考文献は、その全文が参照により明白に組み入れられる。

【0162】

実施例1：hASIC1Bタンパク質をコードする全長cDNAのクローニング

ラットASIC1B N末端ポリペプチドの特徴をもつ選択したポリペプチドモチーフを用いる全GenBankデータベースのblastサーチにより、ヒトゲノムポリヌクレオチド分子（GenBank受託：AC025154、AC074032、AC025361）を検索した。次いで、上に引用したゲノムcDNA配列の、クローニングしたASICファミリーメンバーとの配列比較およびアラインメントならびにコンセンサスイントロン／エキソンスプライシング部位に基づく方法論的解析により、新規ヒトASICサブユニット（本明細書でhASIC1Bと名づけた）を同定することができた。開示されたラットASIC1Bとのアラインメントは、両方の受容体が5-プライム末端で異なることおよびヒト受容体の開始メチオニンが明らかでないことを直接、示した。同定したヒト配列は3つの潜在的開始部位を含有するので（図1参照）、3つの推定hASIC1B構築物を調製した。機能分析はhASIC1B受容体の最長バージョンだけが機能的であったことを表したので、これが実際のヒト受容体を構成するものであり、それをRT-PCRにより確認した。ASIC受容体のコード領域のアラインメントは、hASIC1B開始セグメントがhASIC4領域と類似性を示すことを表す。hASIC1Bの実際の構築は、配列番号3および配列番号4の特定のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、逆転写ヒト三叉神経節cDNAからhASIC1Bの5-プライム末端のRT-PCR増幅により達成した。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、TaqおよびPwoポリメラーゼ（Roche Diagnostics、以前はBoehringer Mannheimから）の両方を含有するEXPANDロングテンプレートポリメラーゼミックス（long-template polymerase mix）を用いて実施した。反応条件は製造業者の指示書に従った。簡単に説明すると、反応混合物は：dNTPs 0.5mM、フォワードおよびリバースプライマーそれぞれ1μM、RT-cDNAテンプレート5μL、10x PCRバッファー5μLおよびポリメラーゼ酵素ミックス0.75μLを含み、全部で最終容積50μLとした。サンプルを4℃に保って、酵素ミックスを最後に加えた。次いでチューブをサーマルサイクラーに直接移して94℃に予熱し、その後、サイクリングを始動した。典型的なサイクリング条件は次の通りであった：最初の変性ステップ：94℃にて2分間、次いで94℃にて45秒、58℃にて45秒および72℃にて2分間の40サイクル、その後72℃にて10分間の最終伸長ステップ。ヒト三叉神経節由来のRT-cDNAは、RNAまたはmRNAからスーパースクリプト（Superscript）またはサーモスクリプト（Thermoscript）酵素ミックスを用いて製造業者（Gibco Life Sciences）指示に従って調製した。RNAおよびmRNAは、Maniatisら（上記参照）に記載のような標準分子生物学プロトコルを用いて

10

20

30

40

50

、または、例えばS.N.A.P.全RNA単離キット、Fast Track 2.0、およびマイクロFast Track 2.0 mRNA単離キット (Invitrogen) などの市販キットを用いて調製した。増幅断片を次いで精製し、HindIIIおよびNotIで制限酵素により消化し、そして両方のスプライス変異体の共通領域であるhASIC1Aの3-プライム断片とライゲートした。

【0163】

実施例2：ハイブリダイゼーションプローブの標識付けと利用

配列番号1から誘導したハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、ゲノムcDNAまたはmRNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識付けを具体的に記載するが、さらに長いcDNA断片についても本質的に同じ方法を用いる。オリゴヌクレオチドをGene Works2.5.1 (Oxford Molecular) のような業界最新技術のソフトウェアを用いて設計し、それぞれのオリゴマーの50pmolおよび γ - ^{32} Pアデノシン三リン酸 (Amersham) の250 μ CiおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston, Mass.) を組合わせることにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドを、セファデックス (Sephadex) G-25スーパーファイン樹脂カラム (Pharmacia & Upjohn) を用いて実質的に精製する。次いで標識したセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを、次のエンドヌクレアーゼ (Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba IまたはPvu II; DuPont NEN) の1つを用いて消化したヒトゲノムDNAの、典型的な膜に基づくハイブリダイゼーション解析において利用する。

10

【0164】

それぞれの消化物から得たDNAを0.7%アガロースゲル上で分画し、ナイロン膜に移す (Nytan Plus, Schleicher & Schuell, Durham, N. H.)。ハイブリダイゼーションは40°Cにて16時間実施する。非特異的シグナルを除去するために、プロットを、室温にて、0.1 x クエン酸ナトリウム生理食塩水および0.5%ドデシル硫酸ナトリウムまで増加するストリンジェンシーの条件のもとで洗浄する。XOMAT ARフィルム (Kodak, Rochester, N.Y.) をホスホイメジャーカセット (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) のプロットに数時間露光させた後に、ハイブリダイゼーションパターンを視覚で比較する。

20

【0165】

実施例3：ノーザンプロットプロット分析

ノーザンプロット分析は、遺伝子転写物の存在を検出するために利用する実験室技術であり、標識したヌクレオチド配列と、特定の細胞型または組織由来のRNAを結合した膜とのハイブリダイゼーションに関わる (Sambrookら、前掲)。

30

【0166】

特定の成人ヒト組織からまたは脳の切片から単離したポリ(A)+RNAの2 μ gを含有するノーザンプロットを販売元 (Clontech) から入手する。プローブを、無作為プライムラベリング (Pharmacia Biotech Inc.) により、または上記のように、調製する。hASIC1Bの第1エキソンのタンパク質コード配列の5'および3'末端に特異的なPCRプライマー (配列番号5および配列番号6) をPCR反応に利用して、全hASIC1B特異的配列を含有する断片を作製した。この断片をpBluescriptベクター中にクローニングして利用し、複数の組織プロットをプローブした。フィルターを、50%ホルムアミド、5 x SSPE、2 % SDS、10 x デンハルト (Denhardt's) 溶液、および100 μ g/mlサケ精子DNAを含有するバッファー中で一夜42°Cにてハイブリダイズした。フィルターを、0.1 x SSC、0.1% SDSを用いて55°Cにて洗浄し、そしてKodak X-Omat ARフィルムに4日間、70°Cにて露光した。結果は、hASIC1Bが末梢組織中に検出されず、主に神経細胞組織中に発現することを示した。脳においては、hASIC1Bは主に視床、尾側核 (caudal nucleus)、皮質のp.g.、小脳、黒質、延髄、被殻に発現し、脳梁に低レベルで発現した。

40

【0167】

実施例4：アフリカツメガエル (Xenopus laevis) 卵母細胞におけるhASIC1Bの発現

hASIC1Bを、pCDNA3中にサブクローニングしたhASIC1B cDNA (1-5ng) の核注射により、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。対照卵母細胞はH₂Oを注射した。卵母細胞を改変バース (Barth) 溶液中で18°Cに維持した。注射後1-3日に、電流を2電極電圧固定法に

50

より測定した。電圧固定 (-60 mV/-100 mV) 中、卵母細胞を116 mM NaCl、2mM KCl、1.8mM CaCl₂、10mM 酢酸および5mM Hepes (NaOHを用いてpH 7.4) の浴中に保った。プロトンゲート調節 (proton-gating) を確認するために、浴液を速やかにpH 5の溶液に10秒間切替え、次いで浴液を戻して洗い流した。刺激溶液は、元の浴液のpHを塩酸で低下することにより調製した。溶液の浸透圧を浸透圧計を用いて確認し、マンニトールまたは塩化コリンを用いて補正した。イオン選択性を実証するために、NaClをLiClまたはKClと置換えた。電流-電圧関係を、低pH溶液による刺激前および中の10秒間、-60mVの保持電位から-100および+60 mVの間の電位へステップを踏むことにより決定した。類似の機能特性決定を、hASIC1Bを含有するpcDNAベクターを用いてトランスフェクトしたCOS細胞を用いてパッチクランプ (patch-clamp) でも実施した。pH5に応答する典型的な電流を、COS細胞および卵母細胞をそれぞれ用いて図5および図6に示した。hASIC1Bチャンネルに対するpHを変化させた用量-応答曲線 (図7) ならびに I / V 曲線 (図8) を同様な方法で得た。

10

20

30

40

50

【0168】

実施例5：位置指定突然変異により作製した非機能的優性ネガティブhASIC1Bサブユニット

DEG/EnaCイオンチャンネルサブユニットは結合してホモおよび/またはヘテロ多量体複合体になって実チャンネルを形成する。従って、所与の配列中の特定のアミノ酸を人工的に改変して、特定のサブユニットを、例えば、チャンネル活性について無機能であるがそれでも他のサブユニットと相互作用する能力を保持させることができる。得られる、そのような無機能の突然変異を有する複合体はアゴニストが存在しても不活性である。標的とするアミノ酸は、好ましくは所与のイオンチャンネルサブユニットのファミリー全体に高度に保存されるものである。本発明者らはASICファミリーのある特定のアミノ酸を標的としたが、或る保存されたGly残基 (すなわち、ヒトASIC3の位置439、またはhASIC1Bの位置469) が、Arg残基により置換されると、優性ネガティブ突然変異体を作製することを見出した。hASIC3-G439Rを卵母細胞で単独に発現させると、電圧固定条件下で低pHに応答する電流が観察されない。さらに、この突然変異体を野生型ASIC3サブユニットとともに同時注射すると、G439R突然変異体の優性ネガティブ効果のために、無機能のチャンネルが発現した。hASIC1B由来のGly-469のArg残基の置換は、市販の突然変異誘発キット「クイックチェンジ (QuickChange)」 (Stragene) を用いて、キットの指示に従って行った。簡単に説明すると、同じ領域においてそれぞれ反対の鎖に相補的である2つの反平行オリゴヌクレオチドプライマーであって、単一ミスマッチ (Gly-469をコードするコドンの最初の位置の「C」を「G」に置換わり、ヌクレオチドの残部は同一である) の所望の突然変異を運ぶ上記プライマーを合成した。次いでオリゴヌクレオチドプライマーを、PfuTurbo DNAポリメラーゼにより、全長hASIC1BをコードするcDNAを含有するテンプレートとしてpCDNA3プラスミドを用いて、温度サイクリング処理をして伸長した。オリゴヌクレオチドプライマーを組み込むと、ねじれたニック (staggered nick) を含有する突然変異プラスミドが作製された。温度サイクリングの後、産物をDpn Iを用いて処理した。Dpn Iを用いて親DNAテンプレートを消化し、突然変異を含有する合成されたDNAを選択する。ほとんどの大腸菌 (E. coli) 株から単離されるDNAはdamメチル化されているので、メチル化およびヘミメチル化DNAに特異的であるDpn I消化に感受性がある。次いで、所望の突然変異を組み込んでいるニックのあるベクターDNAを大腸菌 (E. coli) 中に形質転換する。いったん正しい突然変異が配列決定により確認されれば、突然変異hASIC1Bを卵母細胞または哺乳類動物発現系において、本明細書に記載のように試験する。

【0169】

優性ネガティブ突然変異を運ぶトランスジェニック動物を育種することにより、そのような優性ネガティブ突然変異体をツールに利用して、サブユニット相互作用の様々な組合わせを研究し、かつhASIC1Bの生理学的役割およびその病態生理学的症状との関わりを学ぶことができる。これらの突然変異体はまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドの代わりに、例えば遺伝子治療に利用することもできる。

【0170】

実施例 6 : hASIC1B をコードするポリヌクレオチドの全長への伸長または調節配列の回収
全長 hASIC1B をコードする核酸配列 (配列番号 1) を利用して、部分ヌクレオチド配列を
全長へ広げるための、またはゲノムライブラリーから 5' もしくは 3'、イントロンまたは他
の制御配列を取得するためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。1 つのプライマ
ーをアンチセンス方向 (R) の伸長を開始するように合成しかつ他のプライマーをセンス
方向 (F) に伸長するように合成する。プライマーを用いて、既知配列の伸長を促進しか
つ目的の領域に対する新しい未知ヌクレオチド配列を含有するアンプリコンを「外側」に
作製する。最初のプライマーは、cDNA から、GeneWorks 5.0.1 (Oxford Molecular, Cambr
idge, UK) または他の適当なプログラムを用いて設計し、長さが 22-30 個のヌクレオチド
であって、50% 以上の G C 含量を有し、かつ標的配列と温度約 68-72°C にてアニーリング
することにする。ヘアピン構造およびプライマー-プライマー 2 量体化を生じうるヌクレ
オチドの伸長部はいずれも避ける。

10

【0171】

元の、選択した cDNA ライブラリー、またはヒトゲノムライブラリーを用いて、配列を伸長
する；5' 上流領域を得るためには後者が最も好ましい。もしさらなる伸長が必要であるか
または所望であれば、さらなるプライマーのセットを設計して既知領域をさらに伸長する
。

【0172】

EXPAND ロングテンプレート PCR キット (Roche Diagnostics) の指示書に従いかつ酵素と反
応ミックスとを十分混合することにより、高忠実度の増幅が得られる。それぞれのプライ
マーの 40 pmol およびキットの全ての他成分の推奨濃度を用いて開始し、PCR を Peltier サ
ーマルサイクラー (PTC200; M.J. Research, Watertown, Mass.) および次のパラメーター
を用いて実施する：

20

ステップ 1 94°C、1 分間 (最初の変性)

ステップ 2 65°C、1 分間

ステップ 3 68°C、6 分間

ステップ 4 94°C、15 秒間

ステップ 5 65°C、1 分間

ステップ 6 68°C、7 分間

ステップ 7 ステップ 4 - 6 をさらに 15 サイクル繰り返す

30

ステップ 8 94°C、15 秒間

ステップ 9 65°C、1 分間

ステップ 10 68°C、7 分 15 秒間

ステップ 11 ステップ 8 - 10 を 12 サイクル繰り返す

ステップ 12 72°C、8 分間

ステップ 13 4°C (および保持)

反応混合物の 5-10 μ L アリコートをし、低濃度 (約 0.6-0.8%) アガロースミニゲル上の電気
泳動により分析して、どの反応物が配列を伸長するのに成功したかを決定する。最大産物
を含有すると考えられるバンドを選択してゲルから除去する。さらなる精製は、QIAQuick
.TM. (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) のような商業用ゲル抽出法を利用する。DNA の回収
後、クレノウ酵素を用いて 1 本鎖、ヌクレオチドオーバーハングをトリミングして、再ラ
イゲーションおよびクローニングを容易にする平滑末端を作製する。

40

【0173】

エタノール沈降の後、生成物を 13 μ L のライゲーションバッファーに再溶解し、1 μ L T4-D
NA リガーゼ (15 単位) および 1 μ L T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加え、そして混合物を
室温にて 2 - 3 時間または 16°C にて一夜インキュベートする。コンピテントな大腸菌 (E.
coli) 細胞 (40 μ l 中の適当な培地に入った) を 3 μ l のライゲーション混合物を用いて形
質転換し、80 μ l の SOC 培地中で培養する (Sambrook ら、前掲)。1 時間、37°C でのインキ
ュベーション後に、全形質転換混合物を、2 倍の Carb. を含有するルリア・ベルターニ (L
uria Bertani) (LB) -寒天上にプレーティングする (Sambrook ら、前掲)。翌日、複数

50

のコロニーをそれぞれのプレートから無作為に拾い、適当な市販の無菌96ウエルマイクロタイタープレートの個々のウエル中に配置した150 μ lの液LB/2倍Carb培地中で培養する。翌日、それぞれの一夜培養物の5 μ lを非無菌96ウエルプレート中に移し、水により1:10に希釈後、それぞれのサンプルの5 μ lをPCRアレイに移す。

【0174】

PCR増幅については、4単位のrTth DNAポリメラーゼ、ベクタープライマー、および伸長反応に用いる遺伝子特異的プライマーの1つまたは両方を含有する18 μ lの濃縮PCR反応混合物(3.3倍)を、それぞれのウエルに加える。増幅は次の条件を用いて実施する：

ステップ1 94°C、60秒間

ステップ2 94°C、20秒間

ステップ3 55°C、30秒間

ステップ4 72°C、90秒間

ステップ5 ステップ2-4をさらに29サイクル繰り返す

ステップ6 72°C、180秒間

ステップ7 4°C(および保持)

PCR反応のアリコートを分子量マーカと一緒にアガロースゲル上で泳動させる。PCR産物のサイズを元の部分cDNAと比較し、適当なクローンを選択し、プラスミド中にライゲートし、そして配列決定する。

【0175】

実施例7：アンチセンス分子

hASIC1Bをコードするまたはその部分に対するアンチセンス分子を用いて、天然のhASIC1Bのin vivoまたはin vitro発現を阻害することができる。約20塩基対を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を具体的に記載するが、さらに大きいcDNA断片についても本質的に同じ方法を使用する。図1に示すようなhASIC1Bのコード配列に基づくオリゴヌクレオチドを使用して天然のhASIC1Bの発現を阻害する。相補的オリゴヌクレオチドを図1に示したような最もユニークな5'配列から設計し、上流の未転写配列との結合を阻害することにより転写を、またはリボソームとの結合を防止することによりhASIC1Bをコードする転写物の翻訳を阻害する。配列番号1の5'配列の適当な一部分を用いる、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、図1に示したポリペプチドの5'コード配列中に翻訳される領域にまたがるあらゆる15-20個のヌクレオチドを含む。

【0176】

実施例8：hASIC1Bの発現

hASIC1Bの発現を、そのcDNAを適当なベクター中にサブクローニングしかつそのベクターを宿主細胞中に形質転換することにより実施する。本実施例の場合、クローニングベクター、pSportを用いて大腸菌(E. coli)にhASIC1Bを発現する。このベクターは、クローニング部位の上流に、 β -ガラクトシダーゼ用のプロモーター、続いてアミノ末端Metを含有する配列および次いで7個の β -ガラクトシダーゼを含有する。これらの8個の残基の直後に、転写に有用なバクテリオファージプロモーターおよび複数のユニークな制限酵素切断部位を含有するリンカーが存在する。

【0177】

単離し、標準方法を用いてIPTGにより形質転換した細菌株を誘導すると、最初に8個の β -ガラクトシダーゼの残基、約5~15個のリンカーの残基、および全長タンパク質からなる融合タンパク質を産生する。シグナル残基が細菌増殖培地中へのhASIC1Bの分泌を指令し、これを次の活性に対するアッセイに直接利用することができる。

【0178】

実施例9：hASIC1B特異的抗体の産生

PAGE電気泳動(Sambrook、前掲)または他の精製技術を利用して実質的に精製したhASIC1Bを用いてウサギを免疫感作し、標準プロトコルを利用して抗体を産生させる。配列番号2から推定されるアミノ酸配列をMacVector 6.0.1(Oxford Molecular)を用いて解析し、高免疫原性の領域を決定し、そして対応するオリゴペプチドを合成し、これを使って当

10

20

30

40

50

業者に知られる方法により抗体を産生させる。C末端に近いまたは親水性領域にあるなどの適当なエピトープの選択は、Ausubelら（前掲）その他に記載されている。

【0179】

典型的には、オリゴペプチドは長さが約15残基であり、fmoc化学を利用するアプライド・バイオシステムモデル431A（Applied Biosystems Model 431A）ペプチド合成機（Perkin Elmer）を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルとの反応によりキーホールリンペットヘモシアニン（KLH, Sigma, St. Louis, Mo.）とカップリングさせる（MBS；「Antobodies: A Laboratory Manual（抗体：研究室マニュアル）」, Harlow EおよびLane D, 編, 1998, CSHL Press, Plainview, N. Yを参照）。ウサギを、完全フロイントアジュバント中のオリゴペプチド-KLH複合体を用いて免疫感作する。得られる抗血清を抗ペプチド活性について試験する、例えば、ペプチドをプラスチックと結合し、1% BSAを用いてブロッキングし、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄し、そして放射性ヨードで標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

10

【0180】

実施例10：特異的抗体を用いる天然hASIC1Bの精製

天然または組換えhASIC1Bを、hASIC1Bに特異的な抗体を用いて免疫アフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製することができる。免疫アフィニティカラムは、hASIC1B抗体をCnBr活性化セファロース（Pharmacia & Upjohn）などの活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合でカップリングすることにより構築する。カップリングの後、樹脂をブロックし、製造業者の指示書に従って洗浄する。

20

【0181】

hASIC1Bを含有する培地を免疫アフィニティカラムに通して、カラムをhASIC1Bが優先的に吸収される条件（例えば、界面活性剤が存在する高イオン強度バッファー）のもとで洗浄する。そのカラムを抗体／hASIC1B結合を破壊する条件（例えば、pH 2-3、または高濃度の尿素またはチオシアネートイオンなどのカオトロップ）のもとで溶出して、hASIC1Bを回収する。

【0182】

実施例11：hASIC1Bと相互作用する分子の同定

マルチウエルプレート中の永続的にまたは一過的にトランスフェクトされてhASIC1Bを発現するCOS細胞系に、電位感受性染料を供給し、低pHバッファー（pH 5.0）を適用した後に蛍光放出を測定する。候補化合物の存在および不在のもとでの応答を比較して、hASIC1Bを刺激し、抑制しまたはモジュレートする化合物を同定する。

30

【0183】

あるいは、hASIC1Bまたはその生物学的活性断片を¹²⁵I-ボルトン・ハンター（Bolton-Hunter）試薬（Boltonら, (1973) Biochem. J. 133: 529）によって標識する。マルチウエルプレートのウエル中に予めアレイしておいた候補分子を標識したhASIC1Bとともにインキュベートし、洗浄し、全てのウエルを、標識したhASIC1B複合体についてアッセイする。様々な濃度のhASIC1Bを用いて得たデータを利用して、番号、アフィニティ、およびhASIC1Bの候補分子との結合に対する値を求める。

【0184】

以上の明細書で記述した全ての開示は本明細書に参照により組み入れられる。本発明の範囲と精神から逸脱することなく、記載した本発明の方法および系の様々な修飾および改変が当業者には明白であろう。本発明は特定の好ましい実施形態と関連づけて記載しているが、請求した本発明はそのような特定の実施形態に不当に限定されるものでないことは理解されなければならない。

40

【図面の簡単な説明】

【0185】

【図1-A】全長hASIC1Bのヌクレオチド配列である配列番号1、および推定アミノ酸配列である配列番号2を示す。矢印はイントロン／エキソンスプライス部位を示す。

【図1-B】全長hASIC1Bのヌクレオチド配列である配列番号1、および推定アミノ酸配

50

列である配列番号2を示す。矢印はイントロン／エキソンスプライス部位を示す。

【図1-C】全長hASIC1Bのヌクレオチド配列である配列番号1、および推定アミノ酸配列である配列番号2を示す。矢印はイントロン／エキソンスプライス部位を示す。

【図2-A】hASIC1Bのアミノ酸配列（配列番号2）とクローニングしたASICファミリーメンバー（ヒトASIC1A、ヒトASIC2A、ヒトASIC2B、ヒトASIC3、ヒトASIC4およびラットASIC1Bを含む）のアミノ酸配列との構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。

【図2-B】hASIC1Bのアミノ酸配列（配列番号2）とクローニングしたASICファミリーメンバー（ヒトASIC1A、ヒトASIC2A、ヒトASIC2B、ヒトASIC3、ヒトASIC4およびラットASIC1Bを含む）のアミノ酸配列との構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。 10

【図2-C】hASIC1Bのアミノ酸配列（配列番号2）とクローニングしたASICファミリーメンバー（ヒトASIC1A、ヒトASIC2A、ヒトASIC2B、ヒトASIC3、ヒトASIC4およびラットASIC1Bを含む）のアミノ酸配列との構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。

【図2-D】hASIC1Bのアミノ酸配列（配列番号2）とクローニングしたASICファミリーメンバー（ヒトASIC1A、ヒトASIC2A、ヒトASIC2B、ヒトASIC3、ヒトASIC4およびラットASIC1Bを含む）のアミノ酸配列との構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。

【図2-E】hASIC1Bのアミノ酸配列（配列番号2）とクローニングしたASICファミリーメンバー（ヒトASIC1A、ヒトASIC2A、ヒトASIC2B、ヒトASIC3、ヒトASIC4およびラットASIC1Bを含む）のアミノ酸配列との構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。 20

【図3-A】hASIC1B（配列番号2）のアミノ酸配列とラットASIC1Bのアミノ酸配列との具体的な構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。

【図3-B】hASIC1B（配列番号2）のアミノ酸配列とラットASIC1Bのアミノ酸配列との具体的な構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。

【図4-A】hASIC1B（配列番号2）のアミノ酸配列とヒトASIC4のアミノ酸配列との具体的な構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。 30

【図4-B】hASIC1B（配列番号2）のアミノ酸配列とヒトASIC4のアミノ酸配列との具体的な構造比較を図解する。保存アミノ酸をグレーの箱で囲み、最良のアラインメントスコアを得るための挿入ギャップをダッシュ（-）で表す。

【図5】hASIC1B、ラットASIC1BまたはヒトASIC1Aを発現する電圧固定したCOS細胞を用いて記録した、pH活性化内向き電流を図解する。

【図6】電圧固定したhASIC1Bを発現するアフリカツメガエル卵母細胞を用いて記録した、pH活性化内向き電流を図解する。

【図7】COS細胞に発現したhASIC1BおよびヒトASIC1Aのプロトン用量応答曲線を図解する。 40

【図8】COS細胞に発現したhASIC1BおよびヒトASIC1AのI/V曲線を図解する。

【図 1 - B】

ATGCGCCATCCAGATCTCTCTGCTCATGTCTATCTCTCTCTGGAGAGGAAGCCCCAGGGCCCTC
M P I Q I F C S M S F S S G G E A F G P E
TTGGGAGATATTTTGGGGTCCCCACACCATCAGCAGCAGGACCATCTTCAGAAATCGGAA
L G D I W G P H H G Q Q Q Q Q D I S E S E R
GAGGAGGAAGAAGAGAAAGGAGGACGTAGGAAGAGAGGCCAGTGAGGGGGCATCTCA
B E E E E K E K E A V R K E A S E G H S
CCCATGGACTTGTGTGGCTTTTGCCACACGCTGCACCTCCATGGCACCACACATATTTT
P M D L V A F A N S C S T L H G T N H I F
GTGGAGGGGGTCCAGGGCAGGACGAGCTGTGTGTGTGGTGCTTTTCTTGGCAGCTG
V E G G G P G P R Q V L N S V A F L A C L
GGTGGCTCTCTGTGCAGGTAGGGGACCGGTCTTATTTACTTCAGCTACCCACAGCTG
G A F L C Q V G D R V A Y Y L S Y P H V
ACCTCTCTAAACGAAGTGGCCACCAACGAGCTGGCTTTCCACGACGTACACCTCTGCAAC
T L L N E V A T T E L A F P A V A T L C N
ACTAATGCTGTGGCTGTCCGACTCAGCTACCTGACTTGCTTTATTTGGCCCCGAT
T N A V R L S Q L S Y P D L L Y L A M
CTGGAGCTGATGAAGATGTAGCCCGGGGTGCCCTCGCTCCACGGGGGCTTAGGCC
L G L D E D D P G V C L A P P G P E A
TTCTCTGGGGAGCCCTTTAACTGTCAACGCGTTCTCTAAATCGCTCTGTCCACGCGTGGAG
F S G C T G P F N L H R F Y N R S C H R L E
GACATCGCTCTATTGTCTCTCAACAGGGGGAGCCCTGGCGGCTCTCAACATCTCTAGTGT
D M L L Y C S Y G G G P C G P H N F S V
GTCTCTACAGCTATGGAAGATGTACACGTTCTCACTCGGGCCGAGATGGCGCGCCGGV
V F T R Y G K C Y T F N S G D R P R
CTGAAGACCATGAAGATGGGAAGGACATGGCTGGAAATCATGTCTGACGACATCCAGCAG
L K T M K D T G T G N G L E I M L D I Q Q
GACGAGTACTGCTGTGTGGGGGGAGACTTGACGAGACGTCTTCAAGACGAGCATCAAA
D E Y L P V W G E T D E T S F E A G I K
GTGCAGATCCATATTCAGAGTAACCTCTTTTCATCAACACAGCTGGGCTTTGGCGTGCC
V Q I H S Q D E T G P F I D Q L G F G V A
CCAGGCTCTCAGACCTTTGTGGCCTGCCAGGAGACGCGTGCTCATCTACTCTGCCCCACC
P G F G Q T T F V A C Q E Q R L I Y L P P P
TGGGGCACTGTCAAGCTTTTACATATGACATCGGATTTGGATTTCTCTGCACTCTACAGC
W G T C K A V T M G D S D L D F F S Y S
ATCAGTGCTGTCCCATCTCACTGTGAGAGCGGCTACTGTGGAGAAATGCAACTTGGCG
I T A C R I D C E T R Y L V E N C N C N C R
ATGGTCCACATGCCAGGGGATGCCCATCTGTACTCCAGACGAGTCAACAGGATGTGCA
M V H M P G D A P Y C T P E Q Y K E A
A

[illegible]

【図 1 - C】

TGGTGTGGGAGGAAGAGAGGCGCTAGAGGAGGAGTGTGAAGCTCTGCTGTTGTCTACC
CTATCTTAATGAGACAGACCTAGAGGTGGAGGGCCCTGCCCTCCACGACCACT
CTCTCCAGGCTAGCCCAAGCCCTCTTCAGCGCTCTCTCTCCAGTGTGTGCTGTGGT
TTCAATCCGACAGACGACTCTGTAGCAGCTGATTGGCTGGAGCTGAGATGAGAGCT
GTAGATGTTTGGAACTCTTGGTCTCTAAGAGTCTCTCAGAGATGATCACTCTCCGAC
GGGAAGACAGAAATGAGGCCCAAAAGTGTGTTGGATAGCGGAAACAGACGAGGGCTCT
GGGTGCGCATGCTCTGGTCTTAATAACTGGCTTACGGAAGGAAAAA

【図 2 - B】

BASIC1B 118  L  T  A  T  A  T  T  T  T  T  T  T  T  T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T

【図 2 - A】

<i>ASIC1B</i>	1	M P I Q I F C S M S F S S G E E A P G P L G D I W	25
<i>rASIC1B</i>	1		0
<i>ASIC1A</i>	?		0
<i>ASIC2A</i>	1		0
<i>ASIC2B</i>	1		0
		M S R I G G A G L F A A A L	14
<i>ASIC4</i>	1	M P I E I V C K I K F - - - - -	11
<i>ASIC3</i>	1		0

<i>hASIC1B</i>	26	G P H H H Q Q Q D I S E S E E E E E E K E K E A	50
<i>rASIC1B</i>	1		0
<i>hASIC1A</i>	1		0
<i>hASIC2A</i>	1		0
<i>hASIC2B</i>	15	T G P G R F R M A R E E P A P A A L A A A G Q P G	39
<i>hASIC4</i>	12	- - - - - - - - - A E E D A K P K E K E A G	24
<i>hASIC3</i>	1		0

<i>hASIC1B</i>	51	V	R	K	E	A	S	E	G	H	S	-	-	-	M	D	L	V	A	P	N	S	C	71			
<i>hASIC1B</i>	1	M	E	A	G	S	E	L	D	V	E	D	D	S	E	D	S	L	V	A	P	N	S	C	24		
<i>hASIC1A</i>	1	M	E	L	A	K	E	B	E	E	V	E	G	G	V	Q	L	S	I	Q	A	P	N	S	C	25	
<i>hASIC2A</i>	1	M	D	L	K	E	S	P	S	E	S	L	Q	S	L	S	I	Q	I	A	P	N	S	C	24		
<i>hASIC2B</i>	40	G	R	G	G	G	E	R	A	L	Q	P	G	V	A	R	R	G	P	S	L	A	P	N	C	64	
<i>hASIC4</i>	25	D	E	Q	S	L	L	G	A	V	A	P	G	A	S	D	L	A	T	P	S	L	A	P	N	C	49
<i>hASIC3</i>	1	M	K	P	T	S	G	P	E	E	A	R	R	Q	E	D	L	I	R	V	A	P	N	S	C	24	

<i>ASIC1B</i>	72	T	E	M	G	T	N	H	I	F	V	E	-	-	-	G	G	P	P	R	Q	V	L	T	W	92	
<i>ASIC1B</i>	25	T	E	M	G	T	N	H	I	F	V	E	-	-	-	G	G	P	P	R	Q	V	L	T	W	92	
<i>ASIC1A</i>	25	T	E	M	G	T	N	H	I	F	V	E	-	-	-	G	G	P	P	R	Q	V	L	T	W	92	
<i>ASIC2A</i>	26	T	E	M	G	T	N	H	I	F	V	E	-	-	-	G	G	P	P	R	Q	V	L	T	W	92	
<i>ASIC2B</i>	26	T	E	M	G	T	N	H	I	F	V	E	-	-	-	G	G	P	P	R	Q	V	L	T	W	92	
<i>ASIC1C</i>	65	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC4</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50	K	L	T	H	G	I	R	H	M	C	A	G	R	T	A	A	G	L	T	I	V	A	L	T	W	89
<i>ASIC3</i>	50																										

<i>ASIC1B</i>	93	S	V	L	R	L	A	G	A	F	L	C	Q	V	G	D	R	V	A	Y	L	S	S	Y	117
<i>ASIC1B</i>	46	A	V	L	R	L	A	G	A	F	L	C	Q	V	G	D	R	V	A	Y	L	S	S	Y	71
<i>ASIC1A</i>	47	V	L	C	L	G	L	A	V	L	C	C	V	C	V	C	T	R	Q	S	F	H	Y		70
<i>ASIC2A</i>	48	V	L	C	L	G	L	A	V	L	C	C	V	C	V	C	T	R	Q	S	F	H	Y		71
<i>ASIC2B</i>	90	V	L	C	L	G	L	A	V	L	C	C	V	C	V	C	T	R	Q	S	F	H	Y		114
<i>ASIC4</i>	71	A	A	A	V	L	L	T	L	A	A	P	Y	Q	A	A	G	L	R	G	Y	T	R		95
<i>ASIC3</i>	46	A	A	A	V	L	L	T	L	A	A	P	Y	Q	A	A	G	L	R	G	Y	T	R		70

<i>ASIC1B</i>	142	N	A	V	R	L	S	Q	L	S	Y	P	D	L	L	A	P	M	E	D	E	S	166	
<i>ASIC1B</i>	95	N	A	V	R	L	S	Q	L	S	Y	P	D	L	L	A	P	M	E	D	E	S	166	
<i>ASIC1A</i>	96	A	F	F	F	F	Q	V	S	K	N	D	L	L	Y	L	A	P	M	E	D	S	167	
<i>ASIC2A</i>	95	G	F	F	F	F	Q	V	S	K	N	D	L	L	Y	L	A	P	M	E	D	S	167	
<i>ASIC2B</i>	95	G	F	F	F	F	Q	V	S	K	N	D	L	L	Y	L	A	P	M	E	D	S	167	
<i>ASIC2B</i>	139	N	A	V	R	L	S	Q	L	S	Y	P	D	L	L	A	P	M	E	D	E	S	166	
<i>ASIC4</i>	121	N	A	V	R	L	S	Q	L	S	Y	P	D	L	L	A	P	M	E	D	E	S	166	
<i>ASIC3</i>	95	P	L	R	H	A	S	D	A	D	A	D	I	F	H	L	A	N	L	T	P	P	K	145
<i>ASIC3</i>	95	P	L	R	H	A	S	D	A	D	A	D	I	F	H	L	A	N	L	T	P	P	K	145

[illegible]

<i>hASIC1B</i>	177	G	P	E	A	R	S	G	E	P	P	-	-	F	N	L	H	R	K	V	-	N	-	S	C	H	197
<i>hASIC1B</i>	177	G	P	E	A	R	S	G	E	P	P	-	-	F	N	L	H	R	K	V	-	N	-	S	C	H	197
<i>hASIC1A</i>	130	G	P	E	A	R	S	G	E	P	P	-	-	F	N	L	H	R	K	V	-	N	-	S	C	H	150
<i>hASIC2A</i>	142	N	F	R	S	E	P	P	-	-	-	-	-	F	N	L	H	R	K	V	-	N	-	S	C	H	163
<i>hASIC2B</i>	142	N	F	R	S	E	P	P	-	-	-	-	-	F	N	L	H	R	K	V	-	N	-	S	C	H	163
<i>hASIC2B</i>	149	A	D	F	K	H	Y	K	-	-	-	-	-	Q	S	M	L	E	L	-	H	-	D	R	V	-	212
<i>hASIC2B</i>	149	A	D	F	K	H	Y	K	-	-	-	-	-	Q	S	M	L	E	L	-	H	-	D	R	V	-	212
<i>hASIC2B</i>	149	A	D	F	K	H	Y	K	-	-	-	-	-	Q	S	M	L	E	L	-	H	-	D	R	V	-	212
<i>hASIC4</i>	155	-	-	-	L	R	Y	-	-	-	-	-	-	D	M	V	D	I	L	-	N	-	R	T	G	-	171
<i>hASIC3</i>	134	A	P	P	G	T	M	P	S	P	P	-	-	T	E	D	M	A	O	L	-	A	R	-	-	-	155

<i>hASIC1B</i>	198	R	E	E	D	M	L	E	L	Y	C	S	Y	C	G	G	P	G	G	P	H	N	E	S	-		221
<i>hASIC1B</i>	151	R	E	E	D	M	L	E	L	Y	C	S	Y	C	G	G	P	G	G	P	H	N	E	S	-		175
<i>hASIC1A</i>	164	D	I	R	E	E	D	M	L	E	L	Y	C	S	Y	C	G	G	P	G	G	P	H	N	E	S	188
<i>hASIC2A</i>	213	D	K	D	E	M	L	E	L	Y	C	S	K	Y	R	G	G	Q	E	L	H	Q	D	E	F	T	187
<i>hASIC2B</i>	163	Q	E	E	D	M	L	E	L	Y	C	S	K	Y	R	G	G	Q	E	L	H	Q	D	E	F	T	136
<i>hASIC4</i>	172	Q	E	E	D	M	L	E	L	Y	C	S	K	Y	R	G	G	Q	E	L	H	Q	D	E	F	T	196
<i>hASIC3</i>	156	S	E	D	E	M	L	E	L	Y	C	S	K	Y	R	G	G	Q	E	L	H	Q	D	E	F	T	180

【図 4 - A】

<i>BASIC18</i>	301	P P T F O T E M A R G Q D R L A L L R P I V G G T S K	K 325
<i>rASIC18</i>	254	R G R Q T T F S S C Q B S Q R L F L F S L V W G G T N	K 278
<i>BASIC18</i>	326	A V T M D S - D L D F D D S S F A C H L D C E F	350
<i>rASIC18</i>	279	A V T M D S - - D F R F D S S F F A C H L D C E F	351
<i>BASIC18</i>	351	R Y E L A E P R G N G R M V H M P P G D A P G C H B E Q	375
<i>rASIC18</i>	302	R Y E L A E R N L N G R M V H M P L P G D A P G C T F E Q	326
<i>BASIC18</i>	376	Y R E C A D P A L D F E V H R D Q U E Y C G C G P M P	400
<i>rASIC18</i>	327	R E E C A D P A L D F E V H R D Q U E Y C G C G P M P	351
<i>BASIC18</i>	401	C N E P T M A G R E T S Y S A K R L N S T A S A K Y L A	425
<i>rASIC18</i>	352	G V L L R S Y G S R S L D S S A K R L N S T A S A K Y L A	376
<i>BASIC18</i>	426	K K E F A K S G Q V D G R H M L L V D H D F F E V L N	450
<i>rASIC18</i>	377	K K E F A K S G Q V D G R H M L L V D H D F F E V L N	401
<i>BASIC18</i>	451	V B L E L H Q K K A Y P L A G L L R G D I G G Q M G L	475
<i>rASIC18</i>	402	V B L E L B Q K K A Y P L A G L L R G D I G G Q M G L	426
<i>BASIC18</i>	476	R L T G A S N S T V L B U R E D Y A Y E M I S H K L C	500
<i>rASIC18</i>	427	F L G A S S H E V T E L R D Y A M E W E K H R I R C	451
<i>BASIC18</i>	501	R L T G R G R G R E A K R E S S A D K S R W A T S L S D D V	525
<i>rASIC18</i>	452	R R G K T G R K E R K R S S A D K R G Y V A S S L D D V	476
<i>BASIC18</i>	526	K R H N L G E S L R G H L F A G M T Y A A S N L D E H	550
<i>rASIC18</i>	477	K R H N A P E S S L R G H L F A G M T Y A A N L D L F H	501
<i>BASIC18</i>	551	H P A R G G T E D L R L C	562
<i>rASIC18</i>	502	H P A R G T E D L R L C	513

<i>hASIC1B</i>	1	M	T	T	T	Q	F	C	S	M	S	R	S	S	G	E	A	E	G	P	L	G	D	I	W	25		
<i>hASIC4</i>	1	M	T	T	T	E	V	G	K	I	K	F	A	E	E	D	A	K	P	-	-	-	-	-	-	18		
<i>hASIC1B</i>	26	G	P	H	H	H	Q	Q	Q	D	I	S	E	S	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	50		
<i>hASIC4</i>	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	E	K	E	K	E	A	23		
<i>hASIC1B</i>	51	V	R	K	E	A	S	E	G	H	-	-	-	-	S	E	P	M	D	E	V	A	E	A	N	S	70	
<i>hASIC4</i>	24	G	D	E	Q	S	L	L	G	A	V	A	P	G	A	A	P	R	D	E	A	T	E	A	S	T	48	
<i>hASIC1B</i>	71	C	E	T	T	H	G	T	N	H	I	F	V	E	G	G	P	G	P	R	Q	V	T	P	S	V	95	
<i>hASIC4</i>	49	S	E	T	T	H	G	L	G	R	A	C	G	P	G	P	H	G	L	R	T	T	L	A	L	A	73	
<i>hASIC1B</i>	96	F	V	L	L	A	G	A	E	L	C	V	G	D	R	V	A	Y	A	T	S	Y	P	H	V	120		
<i>hASIC4</i>	74	L	L	T	S	T	A	A	E	L	Y	Q	A	A	G	L	A	R	G	Y	L	T	R	P	H	L	98	
<i>hASIC1B</i>	121	T	L	L	N	E	V	A	T	T	E	L	A	-	E	A	A	T	L	E	C	N	I	N	A	V	144	
<i>hASIC4</i>	99	V	A	M	D	P	A	A	P	A	P	V	A	G	E	A	A	T	L	E	C	N	I	N	R	F	123	
<i>hASIC1B</i>	145	R	L	S	Q	M	Y	P	D	L	Y	L	A	P	M	L	G	L	E	D	E	S	D	D	P	169		
<i>hASIC4</i>	124	R	H	S	A	M	D	A	D	I	F	H	L	A	N	L	T	G	L	P	P	K	D	R	D	148		
<i>hASIC1B</i>	170	E	V	P	L	A	P	P	G	P	E	A	F	S	G	E	P	F	N	L	H	R	F	Y	N	R	194	
<i>hASIC4</i>	149	G	H	R	A	A	G	L	R	Y	P	E	P	-	-	-	D	M	V	D	I	L	N	R	T	G	170	
<i>hASIC1B</i>	195	S	C	H	R	L	E	D	M	E	L	Y	C	S	Y	Q	G	G	P	C	G	P	H	N	A	S	219	
<i>hASIC4</i>	171	H	Q	L	A	-	-	D	M	E	K	S	C	N	F	S	G	G	H	G	S	A	S	N	E	R	S	193
<i>hASIC1B</i>	220	V	V	F	T	G	K	C	K	C	T	E	N	-	S	G	R	D	G	R	P	R	L	K	T	M	244	
<i>hASIC4</i>	194	V	V	Y	T	G	K	C	K	C	T	E	F	N	-	-	A	D	P	R	S	S	L	P	G	R	216	
<i>hASIC1B</i>	245	K	D	G	T	G	N	-	E	T	M	L	D	T	G	O	D	E	P	E	V	W	G	E	-	-	269	
<i>hASIC4</i>	217	A	G	G	M	S	G	E	E	T	M	L	D	T	G	O	D	E	P	E	V	W	G	E	-	-	241	

【図 5】

BASIC1B 170 T D E E T S E A G T K A V O I L E S Q D E P F F I D Q 294
BASIC4 242 T R N E T I S T E A G F R V I Q C H S Q E E P P Y F I H Q 286

BASIC1B 295 G G G G A A P G P F O T E L Y A C O B O R L E I Y L L P P 319
BASIC4 267 G G F G L S E G G P O T F P M S I C Q I B R L S T Y L L P Q 291

BASIC1B 320 F V G T K A V T M D S D L D - - F F D S Y S I T 342
BASIC4 292 F V G N I C R A E S E L R E P E L Q G Y S A Y S V S 316

BASIC1B 343 C R I D E R E T R Y L V E N C N C R M V M M P G D 367
BASIC4 317 C R I L R K E K E A V L Q R E H G R M V M M P G N 341

BASIC1B 368 A P Y C T T E Q K E C A D P A T D F L V E K D Q 392
BASIC4 342 E T I C P F N I Y I E C A R H T I D S L G G G P E 366

BASIC1B 393 E Y C V C E M C A C N R E E L S M V K R I S 417
BASIC4 367 G P C F C P T C A N L L E R Y G K S E I S M V R F P N 391

BASIC1B 418 K A S A K K T E A K K F N K S E Q Y L G R N F L A V E R 442
BASIC4 392 R G S A R Y A R K Y N R N E T L I R E N F L V L 416

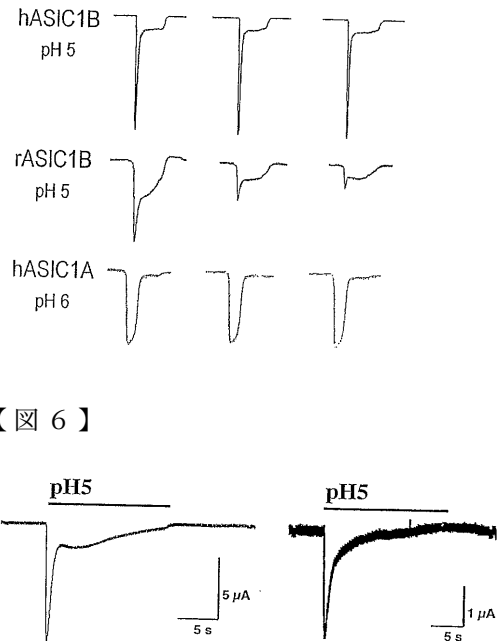
BASIC1B 443 D I E L T E V E N Y E T I E Q K K A Y E I A L G L G 467
BASIC4 417 D I V F A E A L T S E A M E Q R A A Y G L S A F L L G 441

BASIC1B 468 D I G G L O M E G F F L C A S S I P F V I L E L F D I Y I A M 492
BASIC4 442 D L G C C G G L F L G A S S I P F L T E I L D I Y I A M 466

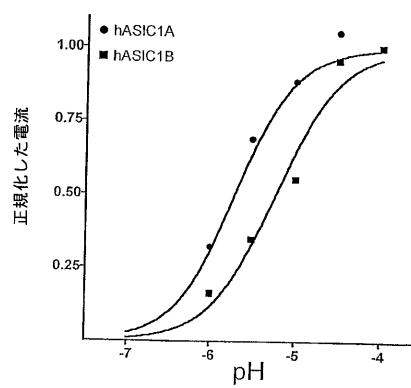
BASIC1B 493 E V I K H K L C R R R G K C Q - K E A K R S S A D K 516
BASIC4 457 E V S W D R L C R R V W R R P K E A K R S S A T G G 490

BASIC1B 517 G V A S R H D D V L R E H N P C G E S L R G H P A G M 541
BASIC4 491 I S T D G Q L E V R E Q S P C P S L G R A E G G 515

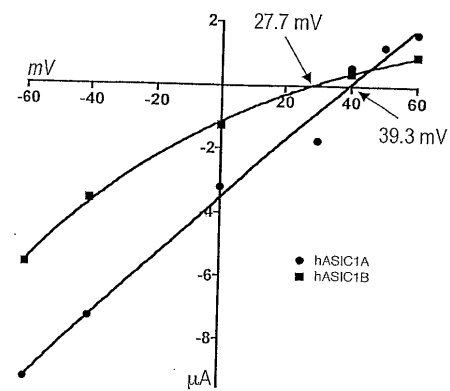
BASIC1B 542 T Y A A N I L P R H E A R G T - - R E D F E T C 562
BASIC4 516 V S L L P N H H T P G G P P G L F E D F A T C 562



【図 7】



【図 8】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008448 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/705

(21) International Application Number: PCT/CA02/01120

(22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 2,352,702 18 July 2001 (18.07.2001) CA

(71) Applicant (for all designated States except US): MCGILL UNIVERSITY [CA/CA]; 3550 University Street, Montreal, Quebec H3A 2A7 (CA).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SEQUELA, Philippe [CA/CA]; 890 Davoir, Outremont, Quebec H3V 4B5 (CA). BABINSKI, Kazimierz [CA/CA]; 364 Berkley Circle, Dorval, Quebec H9S 1H4 (CA). ABADI, Naima [CA/CA]; 6235 Noyelles Street, Saint-Leonard, Quebec H1P 1K3 (CA). CATARSI, Stefano [CA/CA]; 3470 Simpson Street, Apt. #206, Montreal, Quebec H3G 2J5 (CA).

(74) Agents: DUBUC, J. et al.; Goudreau Gage Dubuc, Stock Exchange Tower, Suite 3400, 800 Place Victoria, P.O. Box 242, Montreal, Quebec H4Z 1E9 (CA).

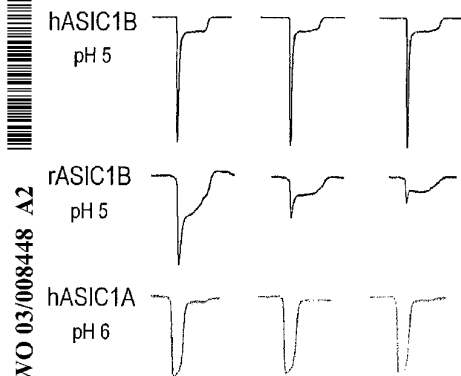
(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PG, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL HUMAN PROTON-GATED CHANNELS



(57) Abstract: The present invention provides a novel human proton-gated ion channel (hASIC1B) and polynucleotides which identify and encode hASIC1B. The invention also provides genetically engineered expression vectors and host cells comprising the nucleic acid sequences encoding hASIC1B and a method for producing hASIC1B. The invention also provides for use of hASIC1B, and agonists, antibodies or antagonists specifically binding hASIC1B, in the prevention and treatment of diseases associated with expression of hASIC1B. Additionally, the invention provides for the use of antisense molecules to polynucleotides encoding hASIC1B for the treatment of diseases associated with the expression of hASIC1B. The invention also provides diagnostic assays, which utilize the polynucleotides, or fragments or the complements thereof, and antibodies specifically binding hASIC1B.

WO 03/008448 A2

WO 03/008448 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 1 -

TITLE OF THE INVENTION

Novel Human Proton-Gated Channels

5

FIELD OF INVENTION

In mammals, the pH of the extracellular compartment, including interstitial fluids and blood, is strictly regulated and maintained at a constant value of 7.4. Acid sensing is a specific kind of chemoreception that plays a critical role in the detection of nociceptive pH imbalances occurring, for example, in conditions of cramps, trauma, inflammation or hypoxia (Lindahl, Adv Neurol 1974; 4: 45)). In mammals, a population of small-diameter primary sensory neurons in the dorsal root ganglia and trigeminal ganglia express specialized pH-sensitive surface receptors activated by increase of extracellular proton concentration (Bevan and Yeats, J Physiol (Lond) 1991; 433: 145). Acid sensitivity of sensory as well as central neurons is mediated by a family of proton-gated cation channels structurally related to *C. elegans* degenerins (DEG) and mammalian epithelial sodium channels (ENaC). This invention relates to these Acid Sensing Ion Channels (ASIC) and specifically reports the discovery of a novel member of this class of receptor-channels, its association with other channel subunits and uses thereof.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

Tissue acidosis is associated with a number of painful physiological (e.g. cramps) and pathological conditions (e.g. inflammation, intermittent claudication, myocardial infarction). Experimentally, similar painful events can be reproduced by infusing low pH solutions into skin or muscle. Furthermore, the prolonged intradermal infusion of low pH solutions can mimic the characteristic hyperalgesia of chronic pain.

30

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 2 -

To further characterize the effects of protons and their relation to pain, low pH solutions were applied to patch-clamped central and peripheral sensory neurons. Inward currents were induced when pH was dropped to acidic values, providing evidence for the existence of proton-activated ion channels. Several types of native currents were observed in sensory neurons from rat and human trigeminal and dorsal root ganglia: rapidly inactivating currents; non-inactivating currents; and biphasic currents displaying a rapidly inactivating current followed by non-inactivating current.

Other differences regarding ion selectivities were also reported. These results suggested the existence of several proton-gated ion channels. The prolonged pain induced by tissue acidification is most likely associated with a non-inactivating proton-gated ion channel.

Cloned proton-gated ion channels

The mammalian proton-gated cation channels have recently been cloned and named « ASIC » for Acid Sensing Ion Channels. Sequence analysis identifies them as members of the DEG/ENaC superfamily of ion channels. The putative membrane topology of ASIC receptors predicts two transmembrane spanning domains with both N- and C-termini in the intracellular compartment, as shown for the epithelial sodium channels. Four sub-classes of ASIC receptors have been identified:

1. ASIC1 ion channels display rapidly inactivating inward currents (Waldmann et al., Nature 1997; 386: 173)
2. ASIC2 ion channels display slowly inactivating inward currents (Brassilana et al., J Biol Chem 1997; 272: 28819).

3. ASIC3 ion channels display biphasic inward currents with an initial rapidly inactivating component, followed by a sustained non-inactivating current (Waldmann et al., J Biol Chem 1997; 272: 20975; Babinski et al., J Neurochem 1999; 72: 51)

5

4. ASIC4 ion channels contain characteristic ASIC-like sequence motifs but do not appear to be activated by protons in homomultimeric association.

10 ***Families of ASIC receptors created by alternative splicing of mRNAs***

A common feature of these ion channels is the existence of alternative splice variants, which display important functional differences. Indeed, the replacement of the first 185 amino acids of ASIC1 (hereinafter named ASIC1A) by a distinct new sequence of 172 amino acids generates a new channel, ASIC1B, which has similar current kinetics as ASIC1A but needs lower pH values for activation (pH_{50} of 6.2 and 4.5, respectively for ASIC1A and ASIC1B). Also, it appears that ASIC1B is specifically expressed in rat dorsal root ganglia. A similar situation is also observed with rat ASIC2 (hereinafter named ASIC2A), where the replacement of the first 185 amino acids by a distinct new sequence of 236 amino acids generates another ASIC ion channel subunit, ASIC2B. When expressed alone as a homomultimer in mammalian cells or *Xenopus* oocytes, ASIC2B does not appear to be activated by low pH solutions. However, coexpression of ASIC2B with other ASIC subunits (e.g. ASIC2A, ASIC3) gives rise to heteropolymeric ion channels with distinct properties such as novel ion selectivities or pH_{50} values (Lingueglia et al., J Biol Chem 1997: 272: 29778). ASIC3, which has been identified in human, also appears to exist in various forms. Indeed, DRASIC is an ASIC3-like channel identified in rat, which displays 85% identity with the human ASIC3 sequence and has similar biphasic current kinetics. However,

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 4 -

important differences regarding tissue distribution, ion selectivities and pH_{50} suggest that DRASIC might not be the human orthologue of ASIC3 but rather a different subtype. Furthermore, the existence of two 3' splice variants of human ASIC3 (ASIC3B and 3C, recently submitted to GenBank) have been reported but differences in function have yet to be documented. Alternative splicing, therefore, appears like an important mechanism for increasing the diversity of ASIC receptors, which most probably assume critical roles in the nervous system, such as neurotransmission, nociception or mechanosensation (see below). Because of the great differences between the existing splice variants, the actual functional characteristics of the new splice variants is unpredictable and might prove to be completely different from any known ASIC receptor.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention reports the discovery of the human ASIC1B receptor (hereinafter referred to as hASIC1B), which shows distinct features from the previously published rat ASIC1B. Also contemplated within the scope of this invention is the potential involvement of this new subunit in neurotransmission and/or nociception and/or mechanosensation and/or any other neurological and/or metabolic processes in normal and pathophysiological conditions. This invention seeks also to cover any uses of this new subunit as a therapeutic target, including but not limiting to drug screening technologies (i.e. screening for channel antagonists, agonists and/or modulators), diagnostic marker, gene therapies. Also within the scope of the present invention is the heteropolymerization of the hASIC1B subunits with each other and/or with one or more subunits of the ASIC family from any species, including but not limiting to ASIC1, ASIC1A, BNaC2, ASIC1B, ASIC2A, ASIC2B, MDEG, MDEG1, MDEG2, BNC1, BNaC1, DRASIC, ASIC3, ASIC4, SPASIC or any variants thereof, as well as

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 5 -

heteropolymerization of hASIC1B with any other members of the Degenerin and EnaC family from any species.

5 The object of this invention is to provide the preferred primary sequence of the polynucleotide molecule (SEQ ID No.1) encoding the full length hASIC1B polypeptide molecule (SEQ ID No.2).

10 Still another object of this invention is to provide a partial genomic polynucleotide sequence of hASIC1B deduced from the non-characterized sequences deposited in GenBank under Accession NO: AC025154, AC074032, and AC025361. In particular, the sequence of the characteristic and distinctive first exon of hASIC1B contained within one uninterrupted contig in clone AC025154.

15 The invention additionally features nucleic acid sequences encoding polypeptides, oligonucleotides, peptide nucleic acids (PNA), fragments, portions or antisense molecules thereof, and expression vectors and host cells comprising polynucleotides that encode hASIC1B. The present invention also features antibodies which bind
20 specifically to hASIC1B, and pharmaceutical compositions comprising substantially purified hASIC1B. The invention also features use of agonists and antagonists of hASIC1B.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

25 The following drawings, figures and tables are illustrative of the embodiments of the invention and are not meant to limit the scope of the invention as encompassed by the claims.

30 **FIGURE 1:** depicts the nucleotide sequence SEQ ID NO: 1 and the deduced amino acid sequence SEQ ID NO: 2 of the full-length hASIC1B. Arrows indicate the intron/exon splice sites.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 6 -

FIGURE 2: illustrates the structural comparison of the amino acid sequence of hASIC1B (SEQ ID NO: 2) with amino acid sequences of cloned ASIC family members, including human ASIC1A, human ASIC2A, human ASIC2B, human ASIC3, human ASIC4 and rat ASIC1B. Conserved amino acids are boxed in grey and dashes represent gaps inserted for best alignment score.

FIGURE 3: illustrates the specific structural comparison of the amino acid sequence of hASIC1B (SEQ ID NO: 2) with amino acid sequence of rat ASIC1B. Conserved amino acids are boxed in grey and dashes represent gaps inserted for best alignment score.

FIGURE 4: illustrates the specific structural comparison of the amino acid sequence of hASIC1B (SEQ ID NO: 2) with amino acid sequence of human ASIC4. Conserved amino acids are boxed in grey and dashes represent gaps inserted for best alignment score.

FIGURE 5: illustrates pH-activated inward currents recorded using voltage clamped COS cells expressing either hASIC1B, rat ASIC1B or human ASIC1A.

FIGURE 6: illustrates pH-activated inward currents recorded using voltage clamped Xenopus oocytes expressing hASIC1B.

FIGURE 7: illustrates the proton dose response curves of hASIC1B and human ASIC1A, expressed in COS cells.

FIGURE 8: illustrates the I/V curves of hASIC1B and human ASIC1A, expressed in COS cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the present nucleotide sequences, proteins and methods are described, it is understood that this invention is not limited to the particular methodology, protocols, cell lines, vectors, and reagents described, as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a host cell" includes a plurality of such host cells; reference to "the antibody" is a reference to one or more antibodies and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated by reference for the purpose of describing and disclosing the cell lines, vectors, and methodologies which are reported in the publications which might be used in connection with the invention.

Unless specified otherwise, the term "hASIC1B" used hereinafter and before encompasses all variants (as defined below) of hASIC1B.

Definitions

"Polynucleotide" as used herein refers to single- or double-stranded molecules which may be "deoxyribonucleic acid" (DNA), comprised of the nucleotide bases A, T, C and G, or "ribonucleic acid" (RNA), comprised of bases A, U (substitutes for T), C and G. Polynucleotides may represent a coding strand or its complement, the sense or anti-sense strands. Polynucleotides may be identical in sequence to the sequence which is naturally occurring or may include alternative codons which encode the same amino acid as that which is found in the naturally occurring sequence (Lewin : "Genes V", Chapter 7; Oxford University Press, 1994). Furthermore, polynucleotides may include codons which represent conservative substitutions of amino acids. The term "polynucleotide" will also include all possible alternate forms of DNA or RNA, such as genomic DNA (both introns and exons), complementary DNA (cDNA), cRNA, messenger RNA (mRNA), and DNA or RNA prepared by partial or total chemical synthesis from nucleotide bases, including modified bases, such as tritylated bases and unusual bases such as inosine. Polynucleotides will also embrace all chemically, enzymatically or metabolically modified forms of DNA or RNA, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses.

The term "oligonucleotide" or "oligo" will refer to short polynucleotides, typically between 10 to 40 bases in length.

"Polypeptide" refers to a molecule comprised of two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds (i.e. isosteres). Amino acids include all 20 naturally gene-encoded amino acids as well as naturally or chemically modified amino acids. Polypeptides refer to both short chains of amino acids, commonly referred to as peptides, oligopeptides, or oligomers, and to longer chains, commonly referred to as proteins. Thus, "amino acid

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 9 -

sequence" as used herein refers to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein molecule and fragments or portions thereof, corresponding to a naturally occurring or synthetic molecule. Where "amino acid sequence" is recited herein to refer to an amino acid sequence of a naturally occurring protein molecule, "amino acid sequence" and like terms, such as "polypeptide" or "protein" are not meant to limit the amino acid sequence to the complete, native amino acid sequence associated with the recited protein molecule. Furthermore, polypeptides will also include amino acid sequences modified either by natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques, which are well known in the art. A given polypeptide may contain many types of modifications or a given modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Modifications can occur anywhere in the polypeptide, including but not limited to, the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. All the above referred to modifications as well as their practice are well described in the research literature, both in basic texts and detailed monographs ("Proteins: Structure and Molecular Properties"; Creighton TE, Freeman WH, 2nd Ed., New-York,1993; "Posttranslational Covalent Modification of Proteins", Johnson BC, ed., Academic Press, New-York, 1983; Also: Seiter et al., Meth Enzymol 1990; 182: 626, and Rattan et al., Ann NY Acad Sci 1992; 663: 48).

"Peptide nucleic acid", as used herein, refers to a molecule which comprises an oligonucleotide to which an amino acid residue, such as lysine, and an amino group have been added. These small molecules, also designated anti-gene agents, stop transcript elongation by binding to their complementary strand of nucleic acid (Nielsen et al. Anticancer Drug Des 1993; 8: 53).

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 10 -

hASIC1B, as used herein, refers to the amino acid sequences of substantially purified hASIC1B obtained from human, whether natural, synthetic, semi-synthetic, or recombinant.

- 5 The term "variant" as used herein is a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, respectively. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another reference polynucleotide. Differences in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino
10 acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, insertions, deletions, fusions, and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid
15 sequence from another reference polypeptide. Generally, differences are such that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, insertion, deletions in any
20 combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be naturally occurring such as allelic or pseudoallelic variant, including polymorphisms or mutations at one or more bases, or it may be a variant that is not known to occur naturally.
- 25 Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis. The term "mutant" is encompassed by the above definition of non-natural variants.
- 30 "splice variants" as referred to hereinafter are variants, which result from the differential or alternative splicing and assembly of exons present in a given gene. Typically, the encoded proteins will display

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 11 -

total identity in most regions, but lower identity in the specific region encoded by different exons.

5 A "deletion", as used herein, refers to a change in either amino acid or nucleotide sequence in which one or more amino acids or nucleotide residues, respectively, are absent, as compared to a reference polypeptide or polynucleotide.

10 An "insertion" or "addition", as used herein, refers to a change in an amino acid or nucleotide sequence resulting in the addition of one or more amino acid or nucleotide residues, respectively, as compared to a reference polypeptide or polynucleotide.

15 A "substitution", as used herein, refers to the replacement of one or more amino acids or nucleotides by different amino acids or nucleotides, respectively, as compared to a reference polypeptide or polynucleotide.

20 The term "derivative", as used herein, refers to the chemical modification of a nucleic acid encoding hASIC1B or the encoded hASIC1B. Illustrative of such modifications would be replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, or amino group. A nucleic acid derivative would encode a polypeptide which may or may not retain some or all of the essential biological characteristics of the natural molecule.

25 The term "identity" as used herein refers to a measure of the extent of identical nucleotides or amino acids that two or more polynucleotide or amino acid sequences have in common. In general, the sequences are aligned so that the highest order match is obtained, referred to as the "alignment". Such optimal alignments make use of gaps, which are
30 inserted to maximize the number of matches using local homology algorithms, such as the Smith-Waterman alignment. The terms

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 12 -

"identity", or "similarity", or "homology", or "alignment" are well known to skilled artisans and methods to perform alignments and measure identity are widely described and taught in the literature: Dayhoff et al., Meth Enzymol 1983; 91: 524 — Lipman DJ and Pearson WR, Science 5 1985; 227: 1435 — Altschul et al., J Mol Biol 1990; 215: 403. — Pearson WR, Genomics 1991; 11: 635. — Gribskov M and Devreux J, eds. (1992) Sequence Analysis Primer, WH Freeman & Cie, New-York. — Altschul et al., Nature Gen 1994; 6: 119. Furthermore, methods to perform alignments and to determine identity and similarity 10 are codified in computer programs and software packages, some of which may also be web-based and accessible on the internet. Preferred software includes but is not limited to BLAST (Basic Local Alignment Search Tools), including Blastn, Blastp, Blastx, tBlastn (Altschul et al., J Mol Biol 1990; 215: 403), FastA and TfastA (Pearson 15 and Lipman, PNAS 1988; 85: 2444), Lasergene99 (DNASTAR, Madison WI), Omega 2.0 or MacVector (Oxford Molecular Group, Cambridge, UK), Wisconsin Package (Genetic Computer Group (GCG), Madison, WI), Vector NTI Suite (InforMax Inc., N.Bethesda, MD), GeneJockey II (Biosoft, Cambridge, UK).

20 As an illustration, by a polynucleotide having a nucleotide sequence with at least, for example, 95% "identity" to a reference nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, it is intended that the nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that 25 the polynucleotide sequence may include up to five point mutations, or divergent nucleotides, per 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference 30 sequence may be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 5% of the total nucleotides in the reference sequence may be inserted into the reference sequence.

These mutations of the reference sequence may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more continuous groups within the reference sequence.

Similarly, by a polypeptide having an amino acid sequence having at least, for example, 95% "identity" to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, it is intended that the amino acid sequence of the polypeptide is identical to the reference sequence except that the polypeptide sequence may include up to five amino acid alterations for every 100 amino acids of the reference amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. In other words, to obtain a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a reference amino acid sequence, up to 5% of the amino acid residues in the reference sequence may be deleted or substituted with another amino acid, or a number of amino acids up to 5% of the total amino acid residues in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence, or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference sequence or in one or more continuous groups within the reference sequence.

The term "biologically active" or "biological activity", as used herein, refer to a protein having structural, regulatory, biochemical, electrophysiological or cellular functions of a naturally occurring molecule. Likewise, "immunologically active" refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic hASIC1B, or any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 14 -

As used herein, "proton-gated" and "acid-sensing" refer to an increase in cation permeability of a channel molecule induced by an increase in proton ion concentration, also described as increased acidity or lowering of pH.

5

"Gain of function" refers to hASIC1B derivatives, which show a potentiation of an existing biological activity and/or an acquisition of a novel biological activity. Similarly, "loss of function" refers to hASIC1B derivatives, which show a partial or complete loss of one or more existing biological activities. The expression "dominant-negative" refers to a hASIC1B derivative with a loss of function which, when coexpressed with a fully functional hASIC1B *in vivo*, for example as a transgene, or *in vitro*, for example in an assay used to test the specific biological activity (for example "acid-sensing"), will dominate the response and impose the loss of biological activity on all other hASIC1B subunits associated with it. The dominant-negative effect can also manifest itself in conditions where the dominant-negative hASIC1B derivative is coexpressed with other functional ASIC family members, such as but not limited to ASIC1A, ASIC2A or ASIC3, and vice versa where dominant-negative ASIC subunits are co-expressed with functional hASIC1B.

The term "agonist", as used herein, refers to a molecule which, when bound to hASIC1B, causes a change in hASIC1B which modulates the activity of hASIC1B. Agonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules which bind to hASIC1B.

The terms "antagonist" or "inhibitor", as used herein, refer to a molecule which, when bound to hASIC1B, modulates or blocks the biological or immunological activity of hASIC1B. Antagonists and inhibitors may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules which bind to hASIC1B.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 15 -

The term "modulate", as used herein, refers to a change or an alteration in the biological activity of hASIC1B. Modulation may be an increase or a decrease in protein activity, a change in binding characteristics, or any other change in the biological, functional or immunological properties of hASIC1B.

The term "mimetic", as used herein, refers to a molecule, the structure of which is developed from knowledge of the structure of hASIC1B or portions thereof and, as such, is able to effect some or all of the actions of ASIC-like molecules.

The term "substantially purified", as used herein, refers to nucleic or amino acid sequences that are removed from their natural environment, isolated or separated, and are at least 60% free, preferably 75% free, more preferably 90%, even more preferable 95%, and most preferably 99% free from other components with which they are naturally associated.

"Amplification" as used herein refers to the production of additional copies of a nucleic acid sequence and is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies well known in the art ("PCR Primer: a laboratory manual" Dieffenbach CW and Dveksler GS, eds., 1995, CSHL Press, Plainview, N.Y)

The term "hybridization", as used herein, refers to any process by which a strand of nucleic acid binds with a complementary strand through base pairing.

The term "hybridization complex", as used herein, refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary G and C bases and between complementary A and T bases; these hydrogen bonds may

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 16 -

- be further stabilized by base stacking interactions. The two complementary nucleic acid sequences hydrogen bond in an antiparallel configuration. A hybridization complex may be formed in solution (e.g., RNase Protection Assay analysis) or between one
- 5 nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., membranes, filters, chips, pins or glass slides to which cells have been fixed for *in situ* hybridization).
- 10 The terms "complementary" or "complementarity", as used herein, refer to the natural binding of polynucleotides under permissive salt and temperature conditions by base-pairing. For example, for the sequence "A-G-T" binds to the complementary sequence "T-C-A". Complementarity between two single-stranded molecules may be
- 15 "partial", in which only some of the nucleic acids bind, or it may be complete when total complementarity exists between the single-stranded molecules. The degree of complementarity between nucleic acid strands has significant effects on the efficiency and strength of hybridization between nucleic acid strands. This is of particular
- 20 importance in amplification reactions, which depend upon binding between nucleic acids strands.

- The term "homology", as used herein, refers to the degree of complementarity of sequences or probes. There may be partial
- 25 homology or complete homology (i.e., identity). A partially complementary sequence is one that at least partially inhibits an identical sequence from hybridizing to a target nucleic acid; it is referred to using the functional term "substantially homologous." The inhibition of hybridization of the completely complementary sequence
- 30 to the target sequence may be examined using a hybridization assay (Southern or northern blot, solution hybridization and the like) under conditions of low stringency. A substantially homologous sequence or

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 17 -

probe will compete for and inhibit the binding (i.e., the hybridization) of a completely homologous sequence or probe to the target sequence under conditions of low stringency. This is not to say that conditions of low stringency are such that non-specific binding is permitted; low stringency conditions require that the binding of two sequences to one another be a specific (i.e., selective) interaction. The absence of non-specific binding may be tested by the use of a second target sequence which lacks even a partial degree of complementarity (e.g., less than about 30% identity); in the absence of non-specific binding, the probe will not hybridize to the second non-complementary target sequence.

As known in the art, numerous equivalent conditions may be employed to comprise either low or high stringency conditions. Factors such as the length and nature of the sequence (DNA, RNA, base composition), nature of the target (DNA, RNA, base composition, presence in solution or immobilization, etc.), and the concentration of the salts and other components (e.g., the presence or absence of formamide, dextran sulfate and/or polyethylene glycol) are considered and the hybridization solution may be varied to generate conditions of either low or high stringency different from, but equivalent to, the conditions listed above.

The term "stringent conditions", as used herein, is the "stringency" which occurs within a range from about $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C below the melting temperature (T_m) of the probe) to about 20°C to 25°C below T_m . As will be understood by those of skill in the art, the stringency of hybridization may be altered in order to identify or detect identical or related polynucleotide sequences.

The term "antisense", as used herein, refers to nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. The term "antisense strand" is used in reference to a nucleic acid strand

that is complementary to the "sense" strand. Antisense molecules may be produced by any method, including synthesis by ligating the gene(s) of interest in a reverse orientation to a viral promoter, which permits the synthesis of a complementary strand. Once introduced into
5 a cell, this transcribed strand combines with natural sequences produced by the cell to form duplexes. These duplexes then block either the further transcription or translation. In this manner, mutant phenotypes may be generated. The designation "negative" is sometimes used in reference to the antisense strand, and "positive" is
10 sometimes used in reference to the sense strand.

The term "portion", as used herein, with regard to a protein (as in "a portion of a given protein") refers to fragments of that protein. The fragments may range in size from four amino acid residues to the
15 entire amino acid sequence minus one amino acid. Thus, a protein "comprising at least a portion of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2" encompasses the full-length human hASIC1B and fragments thereof.

20 "Transformation", as defined herein, describes a process by which exogenous DNA enters and changes a recipient cell. It may occur under natural or artificial conditions using various methods well known in the art. Transformation may rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or
25 eukaryotic host cell. The method is selected based on the host cell being transformed and may include, but is not limited to, viral infection, electroporation, lipofection, and particle bombardment. Such "transformed" cells include stably transformed cells in which the inserted DNA is capable of replication either as an autonomously
30 replicating plasmid or as part of the host chromosome. They also include cells which transiently express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

The term "antigenic determinant", as used herein, refers to that portion of a molecule that makes contact with a particular antibody (i.e., an epitope). When a protein or fragment of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein may induce the production of antibodies which bind specifically to a given region or three-dimensional structure on the protein; these regions or structures are referred to as antigenic determinants. An antigenic determinant may compete with the intact antigen (i.e., the immunogen used to elicit the immune response) for binding to an antibody.

10 The terms "specific binding" or "specifically binding", as used herein, in reference to the interaction of an antibody and a protein or peptide, means that the interaction is dependent upon the presence of a particular structure (i.e., the antigenic determinant or epitope) on the protein; in other words, the antibody is recognizing and binding to a specific protein structure rather than to proteins in general. For example, if an antibody is specific for epitope "A", the presence of a protein containing epitope A (or free, unlabeled A) in a reaction containing labeled "A" and the antibody will reduce the amount of

15

20 labeled A bound to the antibody.

The term "sample", as used herein, is used in its broadest sense. A biological sample suspected of containing nucleic acid encoding hASIC1B or fragments thereof may comprise a cell, chromosomes isolated from a cell (e.g., a spread of metaphase chromosomes), genomic DNA (in solution or bound to a solid support such as for Southern analysis), RNA (in solution or bound to a solid support such as for northern analysis), cDNA (in solution or bound to a solid support), an extract from cells or a tissue, and the like.

30 The term "correlates with expression of a polynucleotide", as used herein, indicates that the detection by northern analysis and/or RT-

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 20 -

PCR of the presence of ribonucleic acid that is related to SEQ ID NO:1 is indicative of the presence of mRNA encoding hASIC1B in a sample and thereby correlates with expression of the transcript encoding the protein.

5

"Alterations" in the polynucleotide of SEQ ID NO:1, as used herein, comprise any alteration in the sequence of polynucleotides encoding hASIC1B including deletions, insertions, and point mutations that may be detected using hybridization assays. Included within this definition is the detection of alterations to the genomic DNA sequence which encodes hASIC1B (e.g., by alterations in the pattern of restriction fragment length polymorphisms capable of hybridizing to SEQ ID NO:1), the inability of a selected fragment of SEQ ID NO:1 to hybridize to a sample of genomic DNA (e.g., using allele-specific oligonucleotide probes), and improper or unexpected hybridization, such as hybridization to a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding hASIC1B (e.g., using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to metaphase chromosomes spreads).

20

As used herein, the term "antibody" refers to intact molecules as well as fragments thereof, such as Fa, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding the epitopic determinant. Antibodies that bind hASIC1B polypeptides can be prepared using intact polypeptides or fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or peptide used to immunize an animal can be derived from translated RNA or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein, if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin and thyroglobulin. The coupled peptide is then used to immunize the animal (e.g., a mouse, a rat or a rabbit). These methods are well

30

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 21 -

described in the literature: e.g. "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow E and Lane D, eds., 1998, CSHL Press, Plainview, N.Y)

5 The term "humanized antibody", as used herein, refers to antibody molecules in which amino acids have been replaced in the non-antigen binding regions in order to more closely resemble a human antibody, while still retaining the original binding ability.

Disclosure of the invention

10 The present invention is based on the discovery of a novel human Acid Sensing Ion Channel protein, hASIC1B, the polynucleotides encoding hASIC1B, and the use of these compositions for diagnosis, prevention, or treatment of disease.

15 Nucleic acids encoding the human hASIC1B of the present invention were first identified by a web-based virtual screening of the GenBank database. The TblastN search was performed using the rat ASIC1B amino acid sequence as the input query sequence. A human genomic
20 clone AC025154 (GenBank) was thus identified. The identified sequences allowed the subsequent synthesis of specific oligonucleotide primers, which enabled the isolation of the full length hASIC1B nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 1 by RT-PCR using reverse transcribed cDNA from mRNA isolated from human trigeminal
25 ganglia.

In one embodiment, the invention encompasses the novel human proton-gated ion channel, a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, as shown in Fig. 1. hASIC1B is 562 amino
30 acids in length and has two potential hydrophobic transmembrane domains. As shown in Fig. 2, hASIC1B has chemical and structural homology with other members of the ASIC gene-family. In particular, some motifs or stretches of amino acids are completely conserved in

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 22 -

all ASIC subunits identified to date. Human hASIC1B shows the highest identity with the published rat ASIC beta subunit (GenBank Accession No.), but is extended by 47 aa on the N-terminal side. Northern blot and RT-PCR analysis reveals that hASIC1B is
5 expressed in the central and peripheral nervous system, with a strong enrichment in sensory ganglia.

The invention also encompasses hASIC1B variants. A preferred hASIC1B variant is one having at least 80%, and more preferably
10 90%, amino acid sequence identity to the hASIC1B amino acid sequence (SEQ ID NO: 2). A most preferred hASIC1B variant is one having at least 95% amino acid sequence identity to SEQ ID NO: 2, while those with 97-99% amino acid sequence identity are most highly preferred.

15 The invention also encompasses polynucleotides, which encode hASIC1B polypeptides. Accordingly, any nucleic acid sequence, which encodes the amino acid sequence of hASIC1B can be used to generate recombinant molecules which express hASIC1B. In a
20 particular embodiment, the invention encompasses the polynucleotide comprising the nucleic acid of SEQ ID NO: 1 as shown in Fig. 1.

It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of nucleotide sequences
25 encoding hASIC1B, some bearing minimal homology to the nucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of nucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations
30 are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the nucleotide sequence of naturally occurring hASIC1B,

and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode hASIC1B and its
5 variants are preferably capable of hybridizing to the nucleotide
sequence of the naturally occurring hASIC1B under appropriately
selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce
nucleotide sequences encoding hASIC1B or its derivatives possessing
a substantially different codon usage. Codons may be selected to
10 increase the rate at which expression of the peptide occurs in a
particular prokaryotic or eukaryotic expression host in accordance with
the frequency with which particular codons are utilized by the host.
Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence
encoding hASIC1B and its derivatives without altering the encoded
15 amino acid sequences include the production of RNA transcripts
having more desirable properties, such as a greater half-life, than
transcripts produced from the naturally occurring sequence.

The invention also encompasses production of a DNA sequence, or
20 portions thereof, which encode hASIC1B and its derivatives, entirely
by synthetic chemistry. After production, the synthetic gene may be
inserted into any of the many available DNA vectors and cell systems
using reagents that are well known in the art at the time of the filing of
this application. Moreover, synthetic chemistry may be used to
25 introduce mutations into a sequence encoding hASIC1B or any portion
thereof.

Also encompassed by the invention are polynucleotide sequences that
are capable of hybridizing to the claimed nucleotide sequences, and in
30 particular, those shown in SEQ ID NO: 1, under various conditions of
stringency. Hybridization conditions are based on the melting
temperature (T_m) of the nucleic acid binding complex or probe, as

taught in Berger and Kimmel (Meth Enzymol 1987: 152), and may be used at a defined stringency.

Altered nucleic acid sequences encoding hASIC1B which are encompassed by the invention include deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides resulting in a polynucleotide that encodes the same or a functionally equivalent hASIC1B. The encoded protein may also contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues, which result in a functionally equivalent hASIC1B. Also encompassed by the invention are altered nucleic acid sequences, including deletions, insertions or substitutions, which result in a polynucleotide that encodes an hASIC1B polypeptide with increased or novel biological activity ("gain of function"), or an hASIC1B polypeptide with decreased or suppressed biological activity ("Loss of function" or "Dominant-negative"). The encoded protein may also contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues, which result in a functionally divergent hASIC1B, as described herein above. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the biological activity of hASIC1B is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids may include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values may include leucine, isoleucine, and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; serine and threonine; phenylalanine and tyrosine.

Also included within the scope of the present invention are alleles of the gene encoding hASIC1B. As used herein, an "allele" or "allelic sequence" is an alternative form of the gene, which may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence. Alleles may result in

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 25 -

altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given gene may have none, one, or many allelic forms. Common mutational changes, which give rise to alleles, are generally ascribed to natural deletions, additions, or substitutions of nucleotides. Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

Methods for DNA sequencing, which are well known and generally available in the art, may be used to practice any embodiments of the invention. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of DNA polymerase I, Sequenase II (US Biochemical Corp, Cleveland, Ohio), Taq polymerase (Perkin Elmer), thermostable T7 polymerase (Amersham, Chicago, IL), or combinations of recombinant polymerases and proofreading exonucleases such as the ELONGASE Amplification System marketed by Gibco BRL (Gaithersburg, Md.). Preferably, the process is automated with machines such as the Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), Peltier Thermal Cycler (PTC200; M.J. Research, Watertown, Mass.) and the ABI 377 DNA sequencers (Perkin Elmer), to name a few.

The polynucleotide sequence encoding hASIC1B may be extended utilizing a partial nucleotide sequence and employing various methods known in the art to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, one method which may be employed, "restriction-site" PCR, uses universal primers to retrieve unknown sequences adjacent to a known locus (Sarkar et al., PCR Meth Applic 1993; 2:318-322). In particular, genomic DNA is first amplified in the presence of primer to linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 26 -

of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

5 Inverse PCR may also be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia et al., Nuc. Acid Res. 1988; 16: 8186). The primers may be designed using GeneWorks 2.5.1 or MacVector 6.0.1 (Oxford Molecular Group, Cambridge, UK), or also OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), or any other appropriate
10 program, to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68-72°C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a
15 PCR template.

Another method which may be used is capture PCR which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial chromosome DNA (Lagerstrom et al., PCR
20 Meth Applic 1991; 1: 111). In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations may also be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown portion of the DNA molecule before performing PCR.

25 Another method which may be used to retrieve unknown sequences is that of Parker et al. (Nuc Acid Res. 1991; 19: 3055). Additionally, one may use PCR, nested primers, and PromoterFinder™ libraries to walk in genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA). This process avoids the need to screen libraries and may be is useful in finding intron/exon
30 junctions.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 27 -

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Also, random-primed libraries are preferable in that they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. Use of a randomly
5 primed library may be especially preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries may be useful for extension of sequence into the 5' and 3' non-translated regulatory regions.

10 Capillary electrophoresis systems which are commercially available may be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of sequencing or PCR products. In particular, capillary sequencing may employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different
15 fluorescent dyes (one for each nucleotide) which are laser activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity may be converted to electrical signal using appropriate software (e.g. Genotyper™ and Sequence Navigator™, Perkin Elmer) and the entire process from loading of
20 samples to computer analysis and electronic data display may be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for the sequencing of small pieces of DNA which might be present in limited amounts in a particular sample.

In another embodiment of the invention, polynucleotide sequences or
25 fragments thereof which encode hASIC1B, or fusion proteins or functional equivalents thereof, may be used in recombinant DNA molecules to direct expression of hASIC1B. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid
30 sequence may be produced and these sequences may be used to clone and express hASIC1B.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 28 -

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce hASIC1B-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce a recombinant RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

- 10 The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter the hASIC1B coding sequence for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR
- 15 reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequence. For example, site-directed mutagenesis may be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, to change codon preference, to produce splice variants, or other mutations, and so forth. Alternatively, the nucleotide
- 20 sequences can be engineered to generate chimeric ASIC channels, where portions of the hASIC1B channel are substituted with equivalent portions of other ASIC subunits, for example the ASIC1A or ASIC 2A.

- In another embodiment of the invention, a natural, modified, or
- 25 recombinant polynucleotide encoding hASIC1B may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, to screen peptide libraries for inhibitors of hASIC1B activity, it may be useful to encode a chimeric hASIC1B protein that can be recognized by a commercially available antibody. A fusion protein may also be
- 30 engineered to contain a cleavage site located between an hASIC1B encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 29 -

hASIC1B may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

5 In another embodiment, the coding sequence of hASIC1B may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers et al., Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 1980; 215-23; Horn et al., Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 1980; 225-232). Alternatively, the protein itself may be produced using chemical methods to synthesize the hASIC1B amino acid sequence, or a
10 portion thereof. For example, peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (Roberge et al., Science 1995; 269: 202) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer).

15 The newly synthesized peptide may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography e.g., Creighton T. (1983) "Proteins, Structures and Molecular Principles", W. H. Freeman & Co., New York, N.Y.). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the
20 Edman degradation procedure; Creighton T (1983), supra). Additionally, the amino acid sequence of hASIC1B, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

25 In order to express a biologically active hASIC1B, the nucleotide sequence encoding hASIC1B or functional equivalents may be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector, which contains the necessary elements for the transcription and translation
30 of the inserted coding sequence.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 30 -

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing a hASIC1B coding sequence and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook J, Ed., CSHL Press, 1989, Cold Spring Harbor, N.Y., and "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1989, New York, N.Y.

10 A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express a hASIC1B coding sequence. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus); 15 plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems.

The "control elements" or "regulatory sequences" are those non-translated regions of the vector —enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions— which interact with host cellular proteins to 25 carry out transcription and translation. Such elements may vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such 30 as the hybrid lacZ promoter of the Bluescript® phagemid (Stratagene, La Jolla, CA) or pSport1™ plasmid (Gibco BRL) and ptrp-lac hybrids, and the like may be used. Other preferred prokaryotic vectors include

but are not limited to pQE-9, pQE60, pQE70 (Quiagen), pNH8A, pNH16a, pNH18a, pNH46A (Stratagene) ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). The baculovirus polyhedrin promoter may be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the
5 genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO; and storage protein genes) or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences) may be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that
10 contains multiple copies of the sequence encoding hASIC1B, vectors based on SV40 or EBV may be used with an appropriate selectable marker.

In bacterial systems, a number of expression vectors may be selected
15 depending upon the use intended for hASIC1B. For example, when large quantities of hASIC1B are needed for the induction of antibodies, vectors, which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified, may be used. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as
20 Bluescript® (Stratagene, La Jolla, CA), in which the sequence encoding hASIC1B may be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Methionine and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 1989; 264: 5503);
25 and the like; pGEX vectors (Promega, Madison, WI) may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione.
30 Proteins made in such systems may be designed to include heparin, thrombin, or factor XA protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 32 -

In addition to bacteria, eucaryotic microbes, such as yeast, may also be used as hosts. Laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*, Baker's yeast, are most used although a number of other strains or species are commonly available. Vectors employing, for example, the

5 2 μ origin of replication of Broach et al. (Meth Enzymol 1983; 101: 307), or other yeast compatible origins of replication (see, for example, Stinchcomb et al. Nature 1979; 282: 39, Tschumper et al., Gene 1980: 10; 157, Clarke et al., Meth Enzymol 1983; 101: 300) may be used. Control sequences for yeast vectors include promoters for the

10 synthesis of glycolytic enzymes (Hess et al. J Adv Enzyme Reg 1968; 7: 149; Holland et al., Biochemistry 1978; 17: 4900). Additional promoters known in the art include the promoter for 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., J Biol Chem 1980; 255: 2073), alcohol oxidase, and PGH. Other promoters, which have the

15 additional advantage of transcription controlled by growth conditions and/or genetic background are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, the alpha-factor system and enzymes responsible for maltose and galactose utilization.

20 It is also believed terminator sequences are desirable at the 3' end of the coding sequences. Such terminators are found in the 3' untranslated region following the coding sequences in yeast-derived genes. For reviews, see "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1989, New York, N.Y and Grant et

25 al., Meth Enzymol. 1987; 153: 516.

In cases where plant expression vectors are used, the expression of a sequence encoding hASIC1B may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S

30 promoters of CaMV may be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu et al., EMBO J. 1987; 6: 307; Brisson et al., Nature 1984; 310: 511). Alternatively, plant

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 33 -

promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used (Coruzzi et al., EMBO J 1984; 3: 1671; Broglie et al., Science 1984; 224: 838; Winter et al., Results Probl. Cell Differ 1991; 17: 85). These constructs can be introduced into plant cells by

5 direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (see, for example, Hobbs S or Murry LE in "McGraw Hill Yearbook of Science and Technology" McGraw Hill, 1992, New York, N.Y.; pp. 191-196 or Weissbach and Weissbach in "Methods for Plant Molecular

10 Biology", Academic Press, 1988, New York, N.Y.; pp. 421-463).

An insect system may also be used to express hASIC1B. For example, in one such system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign

15 genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The sequence encoding hASIC1B may be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of hASIC1B will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus

20 lacking coat protein. The recombinant viruses may then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which hASIC1B may be expressed (Smith et al., J Virol 1983; 46: 584; Engelhard et al., Proc Natl Acad Sci 1994; 91: 3224).

25 In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, a sequence encoding hASIC1B may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential

30 E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain a viable virus, which is capable of expressing hASIC1B in infected host cells (Logan and Shenk, Proc Natl Acad Sci 1984; 81: 3655). In addition,

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 34 -

transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells.

- 5 Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of a sequence encoding hASIC1B. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding hASIC1B, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no
10 additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a portion thereof, is inserted, exogenous translational control signals including the ATG initiation codon should be provided. Furthermore, the
15 correct translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used, such as those described in the literature (Scharf et al., *Results Probl Cell Differ* 1994; 20: 125; Bittner et al., *Meth Enzymol* 1987; 153: 516).

- In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed
25 protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the protein may also be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different
30 host cells such as CHO, HeLa, MDCK, HEK293, WI38, and COS, which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 35 -

for such post-translational activities, may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

5 In a preferred expression system, cDNA species are injected directly into *Xenopus* oocyte nuclei thereby allowing for *in vitro* translation forming a functional proton-gated channel capable of demonstrating functional characteristics of native proton-gated channels including ion selectivity, gating-kinetics, ligand preferences, and sensitivity to pharmacological agents such as amiloride for a model assay which
10 mimics *in vivo* characteristics.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines, which stably express hASIC1B, may be transformed using expression vectors which may
15 contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer
20 resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells, which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

25 Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler et al., Cell 1977; 11: 223) and adenine phospho-ribosyltransferase (Lowy et al., Cell 1980; 22: 817) genes which can be employed in tk⁻ or aprt⁺-cells, respectively. Also,
30 antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection; for example, dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., Proc Natl Acad Sci 1980; 77: 3567); npt,

which confers resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418 (Colbere-Garapin et al., J Mol Biol 1981; 150: 1) and als or pat, which confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murry LE, supra). Additional selectable
5 genes have been described, for example, trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman and Mulligan, Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 8047). Recently, the use of visible markers has gained popularity with such markers as anthocyanins, β -glucuronidase
10 and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, being widely used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes et al., Methods Mol Biol 1995; 55: 121).

15 Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding hASIC1B is inserted within a marker gene sequence, recombinant
20 cells containing sequences encoding hASIC1B can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding hASIC1B under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the
25 tandem gene as well.

Alternatively, host cells, which contain the coding sequence for hASIC1B and express hASIC1B may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures
30 include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques, which include

membrane, solution, or chip based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

5 The presence of the polynucleotide sequence encoding hASIC1B can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or portions or fragments of polynucleotides encoding hASIC1B. Nucleic acid amplification based assays involve the use of oligonucleotides or oligomers based on the hASIC1B-encoding sequence to detect transformants containing DNA or RNA encoding
10 hASIC1B. As used herein "oligonucleotides" or "oligomers" refer to a nucleic acid sequence of at least about 10 nucleotides and as many as about 60 nucleotides, preferably about 15 to 30 nucleotides, and more preferably about 20-25 nucleotides, which can be used as a probe or
15 primer.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of hASIC1B, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and
20 fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on hASIC1B is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in "Serological Methods: A Laboratory
25 Manual", Hampton et al., APS Press, 1990, St-Paul, MI and Maddox et al., J Exp Med 1983; 158: 1211).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and
30 amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding hASIC1B include oligolabeling, nick translation, end-labeling or PCR

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 38 -

- amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequence encoding hASIC1B, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits: from e.g. Pharmacia & Upjohn, (Kalamazoo, MI); Promega (Madison WI.); and U.S. Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio), or Ambion (Austin, TX).
- Suitable reporter molecules or labels, which may be used, include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.
- Host cells transformed with a nucleotide sequence encoding hASIC1B may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides, which encode hASIC1B may be designed to contain signal sequences which direct secretion of hASIC1B through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may be used to join sequences encoding hASIC1B to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain, which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, WA). The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 39 -

Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and hASIC1B may be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing hASIC1B, a thioredoxin or an enterokinase cleavage site, and followed by six histidine residues. The histidine residues facilitate purification on IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography as described in Porath et al., Prot Exp Purif 1992; 3: 263) while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying hASIC1B from the fusion protein. A discussion of vectors which contain fusion proteins is provided in Kroll et al. (DNA Cell Biol 1993; 12: 441).

In addition to recombinant production, fragments of hASIC1B may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (see Stewart et al., "Solid-Phase Peptide Synthesis", WH Freeman & Co., 1969, San Francisco, CA.; Merrifield et al., J Am Chem Soc 1963; 85: 2149). Chemical synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Various fragments of hASIC1B may be chemically synthesized separately and combined using chemical methods to produce the full-length molecule.

Thus, as set forth herein, the invention includes the provision of a novel subfamily of proton-gated channel proteins as exemplified by the novel DNA sequences set forth in Fig. 1 (SEQ ID NO: 1), as well as DNA sequences which hybridize thereto under hybridization conditions of the stringency equal to or greater than the conditions of the stringency employed in the initial isolation of cDNAs of the invention, and DNA sequences encoding the same allelic variant or analog proton-gated channel protein through use of at least in part degenerate codons. The sequences can also be used to locate and

identify other closely related members of this subfamily as described in Cannessa et al (Nature 1994; 367: 463).

The novel protein products of the invention include polypeptides with
5 the primary structural conformation (i.e. amino acid sequence) of
proton-gated channel proteins as set forth in FIG. 1 and SEQ ID
NO: 2, as well as peptide fragments thereof and synthetic peptides
assembled to be duplicative of amino acid sequences thereof.
Proteins, protein fragments and synthetic proteins or peptides of the
10 invention are projected to have uses earlier described including
therapeutic, diagnostic, and prognostic assays and protocols and will
provide the basis for monoclonal and polyclonal antibodies specifically
reactive with the channel protein.

15 **Therapeutics**

In another embodiment of the invention, hASIC1B or fragments thereof
may be used for therapeutic purposes. Based on the chemical and
structural homology among hASIC1B (SEQ ID NO: 2) and other ASIC
20 receptors (Fig. 2), and RT-PCR and Northern blot analysis showing
that hASIC1B transcripts are primarily but not exclusively associated
with cells of the peripheral and central nervous systems, hASIC1B is
believed to play a role in the regulation of neurotransmitter release,
neuronal excitability, excitotoxicity or mechanosensation. Indeed,
25 secretory granules and synaptic vesicles are known to contain high
concentrations of protons (low intravesicular pH), which are co-
released with other neurotransmitters during regulated and constitutive
exocytosis. Released protons might thus activate pre- and/or post-
synaptic, or extrasynaptic hASIC1B receptors. Indeed, under certain
30 conditions, low pH or extracellular acidosis has been shown to
influence synaptic transmission as well as the induction of long-term
potentiation (Igelmund et al., Brain Res 1995; 689: 9; Velisek et al.,
Hippocampus 1998; 8: 24). Also, in certain animal seizure models,

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 41 -

neuroprotective effects of low pH have been observed (Velisek et al., Exp Brain Res 1994; 101: 44). ASIC 2A has been directly implicated in mechanodetection using knockout animals. Furthermore, the particular repeating structures in the first exon of hASIC1B may be indicative of some specific function, such as interaction with or anchoring to the cytoskeleton. hASIC1B might therefore constitute a crucial component of a mechanogated ion channel. Thus, an important use of hASIC1B is screening for compounds that regulate neurotransmitter release, synaptic efficacy, neuroexcitability, or neurotoxicity. Such compounds may have utility in a number of physiological and pathological situations pertaining, for example, to cognition, perception, learning, memory, pain and many others.

In one embodiment, antagonists or inhibitors of the protein or vectors expressing antisense sequences may be used to treat disorders and diseases of the nervous system resulting from altered ion transport, signal transmission, and apoptosis. Such diseases include, but are not limited to, chronic pain, inflammatory pain, neuropathic pain such as diabetic-, cancer-, and AIDS-related, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, Creutzfeld-Jacob disease, and amyotrophic lateral sclerosis, and dementias, including AIDS-related, as well as convulsions, epilepsy, stroke, and anxiety and depression.

In another embodiment, antagonists or inhibitors of the protein or vectors expressing antisense sequences may be used to treat cardiovascular diseases such as angina, congestive heart failure, vasoconstriction, hypertension, atherosclerosis, restenosis, and bleeding.

In another embodiment, antagonists or inhibitors of the protein or vectors expressing antisense sequences may be used to treat

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 42 -

disorders and diseases of the reproductive system, in particular male infertility, or may also be used as male contraceptive agents.

Agonists which enhance the activity and antagonists which block or modulate the effect of hASIC1B may be used in those situations where such enhancement or inhibition is therapeutically desirable. Such agonists, antagonists or inhibitors may be produced using methods which are generally known in the art, and particularly involve the use of purified hASIC1B to produce antibodies or to screen libraries of pharmaceutical agents for those which specifically bind hASIC1B. For example, in one aspect, antibodies which are specific for hASIC1B may be used directly as an antagonist, or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissue which express hASIC1B.

The antibodies may be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and fragments produced by a Fab expression library. Neutralizing antibodies, (i.e., those which inhibit dimer formation) are especially preferred for therapeutic use.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others, may be immunized by injection with hASIC1B or any fragment or oligopeptide thereof which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Among adjuvants used

in humans, BCG (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are especially preferable.

5 It is preferred that the peptides, fragments, or oligopeptides used to induce antibodies to hASIC1B have an amino acid sequence consisting of at least five amino acids, and more preferably at least 10 amino acids. It is also preferable that they are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein, and they may contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring
10 molecule. Short stretches of hASIC1B amino acids may be fused with those of another protein such as keyhole limpet hemocyanin and antibody produced against the chimeric molecule.

15 Monoclonal antibodies to hASIC1B may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Koehler et al. Nature 1975; 256: 495; Kosbor et al., Immunol Today 1983; 4: 72; Cote et al., Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 2026; Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer
20 Therapy", Alan R. Liss Inc., 1985, New York, NY, pp. 77-96).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody
25 genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be
30 adapted, using methods known in the art, to produce hASIC1B-specific single chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 44 -

from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, D. R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-3).

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837; Winter, G. et al. (1991) Nature 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for hASIC1B may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse et al. (1989) Science 256:1275-1281).

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between hASIC1B and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering hASIC1B epitopes is preferred, but a competitive binding assay may also be employed (Maddox, supra).

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding hASIC1B, or any fragment thereof, or antisense sequences, may be

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 45 -

used for therapeutic purposes. In one aspect, antisense to the polynucleotide encoding hASIC1B may be used in situations in which it would be desirable to block the synthesis of the protein. In particular, cells may be transformed with sequences complementary to polynucleotides encoding hASIC1B. Thus, antisense sequences may be used to modulate hASIC1B activity, or to achieve regulation of gene function. Such technology is now well known in the art, and sense or antisense oligomers or larger fragments, can be designed from various locations along the coding or control regions of sequences encoding hASIC1B.

Expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids may be used for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue or cell population. Methods, which are well known to those skilled in the art, can be used to construct recombinant vectors which will express antisense polynucleotides of the gene encoding hASIC1B. These techniques are described both in Sambrook et al. (supra) and in Ausubel et al. (supra).

Genes encoding hASIC1B can be turned off by transforming a cell or tissue with expression vectors that express high levels of a polynucleotide or fragment thereof which encodes hASIC1B. Such constructs may be used to introduce untranslatable sense or antisense sequences into a cell. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until all copies are disabled by endogenous nucleases.

Transient expression may last for a month or more with a non-replicating vector and even longer if appropriate replication elements are part of the vector system.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 46 -

As mentioned above, modifications of gene expression can be obtained by designing antisense molecules, DNA, RNA or PNA, to the control regions of the gene encoding hASIC1B, i.e., the promoters, enhancers, and introns. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between positions -10 and +10 from the 5' end of the transcript, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules. Recent therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature (Gee, J. E. et al. (1994) In: Huber, B. E. and Carr, B. I. Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y.). The antisense molecules may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Ribozymes, enzymatic RNA molecules, may also be used to catalyze the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Examples which may be used include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of sequences encoding hASIC1B.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide inoperable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 47 -

accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

- Antisense molecules and ribozymes of the invention may be prepared
- 5 by any method known in the art for the synthesis of RNA molecules. These include techniques for chemically synthesizing oligonucleotides such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding hASIC1B. Such DNA
- 10 sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, these cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly can be introduced into cell lines, cells, or tissues.
- 15 RNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends of the molecule or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the backbone of the molecule. This
- 20 concept is inherent in the production of PNAs and can be extended in all of these molecules by the inclusion of nontraditional bases such as inosine, queosine, and wybutosine, as well as acetyl-, methyl-, thio-, and similarly modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine, and uridine which are not as easily recognized by endogenous
- 25 endonucleases.

- Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For
- 30 *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection and by liposome injections may be achieved using methods that are well known in the art.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 48 -

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any suitable subject including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

- 5 An additional embodiment of the invention relates to the administration of a pharmaceutical composition, in conjunction with a pharmaceutically acceptable carrier, for any of the therapeutic effects discussed above. Such pharmaceutical compositions may consist of hASIC1B, antibodies to hASIC1B, mimetics, agonists, antagonists, or
10 inhibitors of hASIC1B. The compositions may be administered alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which may be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions may be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or
15 hormones.

- The pharmaceutical compositions utilized in this invention may be administered by any number of routes including, but not limited to,
20 oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, or rectal means. In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically-acceptable
25 carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Further details on techniques for formulation and administration may be found in the latest edition of Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

- 30 Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 49 -

dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

5

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee
10 cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium
15 carboxymethylcellulose; gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

20 Dragee cores may be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which may also contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or
25 dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, i.e., dosage.

Pharmaceutical preparations that can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of
30 gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate,

and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

- 5 Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions may contain substances, which increase the viscosity of the suspension, 10 such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Optionally, 15 the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

- For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the 20 particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

- The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured in a manner that is known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, 25 levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes.

- The pharmaceutical composition may be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, 30 sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 51 -

preparation may be a lyophilized powder which may contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.

5

After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. For administration of hASIC1B, such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

10 Pharmaceutical compositions suitable for use in the invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose. The determination of an effective dose is well within the capability of those skilled in the art.

15

For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays, e.g., of neoplastic cells, or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

20

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example hASIC1B or fragments thereof, antibodies of hASIC1B, agonists, antagonists or inhibitors of hASIC1B, which
25 ameliorates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., ED50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD50 (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio between therapeutic
30 and toxic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD50/ED50.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 52 -

Pharmaceutical compositions, which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED50 with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

10 The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Factors, which may be taken into account include the severity of the disease state, general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts may vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

30

Diagnostics

In another embodiment, antibodies that specifically bind hASIC1B may be used for the diagnosis of conditions or diseases characterized by expression of hASIC1B, or in assays to monitor patients being treated with hASIC1B, agonists, antagonists or inhibitors. The antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as those described above for therapeutics. Diagnostic assays for hASIC1B include methods that utilize the antibody and a label to detect hASIC1B in human body fluids or extracts of cells or tissues. The antibodies may be used with or without modification, and may be labeled by joining them, either covalently or non-covalently, with a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules, which are known in the art may be used, several of which are described above.

A variety of protocols including ELISA, RIA, and FACS for measuring hASIC1B are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of hASIC1B expression. Normal or standard values for hASIC1B expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, preferably human, with antibody to hASIC1B under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantified by various methods, but preferably by photometric means. Quantities of hASIC1B expressed in subject, control and disease, samples from biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding hASIC1B may be used for diagnostic purposes. The polynucleotides, which may be used include oligonucleotide sequences, antisense RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides may be used to detect and quantitate gene expression in biopsied tissues in which

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 54 -

expression of hASIC1B may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to distinguish between absence, presence, and excess expression of hASIC1B, and to monitor regulation of hASIC1B levels during therapeutic intervention.

5

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding hASIC1B or closely related molecules, may be used to identify nucleic acid sequences which encode hASIC1B. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., 10 unique nucleotides in the 5' regulatory region, or a less specific region, e.g., especially in the 3' coding region, and the stringency of the hybridization or amplification (maximal, high, intermediate, or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding hASIC1B, alleles, or related sequences.

Probes may also be used for the detection of related sequences, and should preferably contain at least 50% of the nucleotides from any of the hASIC1B encoding sequences. The hybridization probes of the subject invention may be DNA or RNA and derived from the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or from genomic sequence including promoter, enhancer elements, and introns of the naturally occurring hASIC1B.

25

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding hASIC1B include the cloning of nucleic acid sequences encoding hASIC1B or hASIC1B derivatives into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by means of the addition of the appropriate RNA polymerases and the appropriate labeled nucleotides. Hybridization probes may be labeled

30

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 55 -

by a variety of reporter groups, for example, radionuclides such as ^{32}P or ^{35}S , or enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding hASIC1B may be used for the
5 diagnosis of conditions or diseases that are associated with
expression of hASIC1B. Examples of such conditions or diseases
include neurological diseases including chronic pain, neuropathic pain
such as diabetic-, cancer-, and AIDS-related, neurodegenerative
diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease,
10 Huntington's disease, Creutzfeld-Jacob disease, and amyotrophic
lateral sclerosis, and dementias, such as AIDS-related, as well as
convulsions, epilepsy, stroke, and anxiety and depression,
cardiovascular diseases such as angina, congestive heart failure,
vasoconstriction, hypertension, atherosclerosis, restenosis, and
15 bleeding. The polynucleotide sequences encoding hASIC1B may be
used in Southern or northern analysis, dot blot, or other membrane-
based technologies; in PCR technologies; or in dip stick, pin, ELISA or
chip assays utilizing fluids or tissues from patient biopsies to detect
altered hASIC1B expression. Such qualitative or quantitative methods
20 are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding hASIC1B
may be useful in assays that detect activation or induction of various
neurological or other non-neurological disorders, particularly those
25 mentioned above. The nucleotide sequence encoding hASIC1B may
be labeled by standard methods, and added to a fluid or tissue sample
from a patient under conditions suitable for the formation of
hybridization complexes. After a suitable incubation period, the sample
is washed and the signal is quantitated and compared with a standard
30 value. If the amount of signal in the biopsied or extracted sample is
significantly altered from that of a comparable control sample, the
nucleotide sequence has hybridized with nucleotide sequences in the

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 56 -

sample, and the presence of altered levels of nucleotide sequences encoding hASIC1B in the sample indicates the presence of the associated disease. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease associated with expression of hASIC1B, a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, which encodes hASIC1B, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with those from an experiment where a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for disease. Deviation between standard and subject values is used to establish the presence of disease.

Once disease is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to evaluate whether the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in the normal patient. The results obtained from successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

With respect to neurological diseases, the presence of a relatively high amount of transcript in biopsied tissue from an individual may indicate a predisposition for the development of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 57 -

clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier thereby preventing the development or further progression of the disease.

5 Additional diagnostic uses for oligonucleotides encoding hASIC1B may involve the use of PCR. Such oligomers may be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced from a recombinant source. Oligomers will preferably consist of two
10 nucleotide sequences, one with sense orientation and another with antisense, employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantitation of
15 closely related DNA or RNA sequences.

Methods which may also be used to quantitate the expression of hASIC1B include radiolabeling or biotinylating nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto
20 which the experimental results are interpolated (Melby, P. C. et al. (1993) J. Immunol. Methods, 159:235-244; Duplaa, C. et al. (1993) Anal. Biochem. 229-236). The speed of quantitation of multiple samples may be accelerated by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a
25 spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantitation.

In another embodiment of the invention, the nucleic acid sequence that encodes hASIC1B may also be used to generate hybridization probes that are useful for mapping the naturally occurring genomic
30 sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. Such techniques include FISH, FACS, or artificial

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 58 -

chromosome constructions, such as yeast artificial chromosomes, bacterial artificial chromosomes, bacterial P1 constructions or single chromosome cDNA libraries as reviewed by Price, C. M. (1993; Blood Rev. 7:127-134), and Trask, B. J. (1991; Trends Genet. 7:149-154).

5

FISH (as described in Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York, N.Y.) may be correlated with other physical chromosome mapping techniques and genetic map data. Examples of genetic map data can be found in the 1994 Genome Issue of Science (265:1981f). Correlation between the location of the gene encoding hASIC1B on a physical chromosomal map and a specific disease, or predisposition to a specific disease, may help delimit the region of DNA associated with that genetic disease. The nucleotide sequences of the subject invention may be used to detect differences in gene sequences between normal, carrier, or affected individuals.

10

15

In situ hybridization of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers may be used for extending genetic maps. Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species, such as mouse, may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once the disease or syndrome has been crudely localized by genetic linkage to a particular genomic region, for example, AT to 11q22-23 (Gatti et al. (1988) Nature 336:577-580), any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the

20

25

30

chromosomal location due to translocation, inversion, etc. among normal, carrier, or affected individuals.

Screening assays

5 In another embodiment of the invention, hASIC1B, its catalytic or immunogenic fragments or oligopeptides thereof, can be used for screening libraries of compounds in any of a variety of drug screening techniques. The fragment employed in such screening may be free in
10 solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The formation of binding complexes, between hASIC1B and the agent being tested, may be measured. Thus, the polypeptides of the invention may also be used to assess the binding of small molecule substrates and ligands in, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures.
15 These substrates and ligands may be natural substrates and ligands or may be structural or functional mimetics. In general, such screening procedures involve producing appropriate cells, which express the receptor polypeptide of the present invention on the surface thereof.
20 Such cells include cells from mammals, yeast, insects (eg *Drosophila*) or bacteria (eg *E. coli*). Cells expressing the receptor (or cell membranes containing the expressed receptor) are then contacted with a test compound to observe binding, or stimulation or inhibition of a functional response (for example inhibition of proton-activated
25 currents).

The assays may simply test binding of a candidate compound wherein adherence to the cells bearing the receptor is detected by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound or
30 in an assay involving competition with a labeled competitor. Further, these assays may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation of the receptor, using detection systems appropriate to the cells bearing the receptor at their surfaces (for

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 60 -

example increased ion permeation measured by patch clamp or, preferably by ion imaging). Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist (for example, protons) and the effect of the candidate compound on the activation by the agonist is observed. Standard methods for conducting such screening assays are well understood in the art. Typically, the response may be measured by use of a microelectrode technique accompanied by such measurement strategies as voltage clamping of the cell whereby activation of ion channels may be identified by inward or outward current flow as detected using the microelectrodes. ²²Na, ⁸⁶Rb, ⁴⁵Ca radiolabeled cations or ¹⁴C or ³H guanidine may be used to assess such ion flux; a sodium, calcium or potassium ion sensitive dye (such as Fura-2, or Indo) may also be used to monitor ion passage through the receptor ion channel, or a potential sensitive dye may be used to monitor potential changes, such as in depolarization.

Alternatively, it is also possible to mutate the hASIC1B cDNA in order to produce a constitutively active hASIC1B channel, as has been shown with other DEG/EnaC family members (Huang et al., Nature 367: 467; Waldman et al., J Biol Chem 1997: 271; 10433). Then, the constitutively active channel may be expressed in host cells to produce a screening assay where channel activity is permanent. The recording of channel activity may be carried out either by membrane voltage analysis, directly (patch clamp, for example) or indirectly (fluorescent probes, for example) or by sodium entry measurement (radioactive sodium influx, fluorescent probes, or reporter genes).

Another technique for drug screening, which may be used provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest as described in published PCT application W084/03564. In this method, as applied to hASIC1B large numbers of different small test compounds are synthesized on a solid

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 61 -

substrate, such as plastic pins or some other surface. The test compounds are reacted with hASIC1B, or fragments thereof, and washed. Bound hASIC1B is then detected by methods well known in the art. Purified hASIC1B can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on a solid support.

In another embodiment, one may use competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding hASIC1B specifically compete with a test compound for binding hASIC1B. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with hASIC1B.

In additional embodiments, the nucleotide sequences that encode hASIC1B may be used in any molecular biology techniques that have yet to be developed, provided the new techniques rely on properties of nucleotide sequences that are currently known, including, but not limited to, such properties as the triplet genetic code and specific base pair interactions.

EXAMPLES

The following examples are intended to further illustrate the invention and are not intended to limit the scope of the invention in any way. All references cited herein, whether previously or in the following examples, are expressly incorporated in their entirety by reference.

30 EXAMPLE 1: Cloning of full length cDNA encoding the hASIC1B protein

A blast search of the entire GenBank database using selected polypeptide motifs characteristic of rat ASIC1B N-terminal polypeptide,

retrieved a human genomic polynucleotide molecule (GenBank accession: AC025154, AC074032, AC025361). Subsequent methodological analysis of the above cited genomic DNA sequence based on sequence comparison and alignment with cloned ASIC family members as well as consensus intron/exon splicing sites allowed the identification of a cDNA sequence encoding a novel human ASIC subunit, herein named hASIC1B. The alignment with the published rat ASIC1b immediately revealed that both receptors differed at the 5-prime end and that the initiating methionine on the human receptor was not evident. The identified human sequence contained three potential initiation sites (see fig. 1) and accordingly three putative hASIC1B constructs were prepared. Functional analysis revealed that only the longest version of the hASIC1B receptor was functional and therefore constitutes the actual human receptor, as confirmed by RT-PCR. Alignment of the coding regions of ASIC receptors reveal that hASIC1B initiation segment shows similarities to the hASIC4 region. The actual construction of the hASIC1B was achieved by RT-PCR amplification of the 5-prime end of hASIC1B from reverse transcribed human trigeminal ganglion cDNA using specific oligonucleotide primers of SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with the EXPAND long-template polymerase mix, containing both Taq and Pwo polymerases (Roche Diagnostics, formerly from Boehringer Mannheim). Reaction conditions followed the manufacturers instructions. Briefly, reaction mix included: dNTPs 0.5 mM, forward and reverse primers 1 μ M each, RT-cDNA template 5 μ L, 10x PCR buffer 5 μ L and polymerase enzyme mix 0.75 μ L, all in a final volume of 50 μ L. Samples were kept at 4°C and the enzyme mix was added last. Tubes were then immediately transferred to the thermocycler preheated to 94°C, after which cycling was launched. Typical cycling conditions were as follows: Initial denaturation step: 2 min at 94°C, than 40 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 58°C and 2 min at 72°C,

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 63 -

followed by a final extension step of 10 min at 72°C. RT-cDNAs from human trigeminal ganglia was prepared from RNA or mRNA with the Superscript or Thermoscript enzyme mix according to the manufacturers directions (Gibco Life Sciences). RNA and mRNA were prepared using standard molecular biology protocols, such as described in Maniatis et al., (see above) or using commercially available kits, such as for example the S.N.A.P. total RNA isolation kit, Fast Track 2.0 and micro Fast Track 2.0 mRNA isolation kits (Invitrogen). The amplified fragment was subsequently purified and restriction digested with HindIII and NotI and then ligated to the 3-prime fragment of hASIC1A which is the common region to both splice variants.

EXAMPLE 2: Labeling and Use of Hybridization Probes

Hybridization probes derived from SEQ ID NO: 1 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base-pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger cDNA fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as GeneWorks 2.5.1 (Oxford Molecular), labeled by combining 50 pmol of each oligomer and 250 μ Ci of γ -³²P adenosine triphosphate (Amersham) and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston, Mass.). The labeled oligonucleotides are substantially purified with Sephadex G-25 superfine resin column (Pharmacia & Upjohn). Labelled sense and antisense oligonucleotides are then used in a typical membrane based hybridization analysis of human genomic DNA digested with one of the following endonucleases (Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba I or Pvu II; DuPont NEN).

The DNA from each digest is fractionated on a 0.7% agarose gel and transferred to nylon membranes (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham, N.H.). Hybridization is carried out for 16 hours at 40°C. To

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 64 -

remove nonspecific signals, blots are sequentially washed at room temperature under increasingly stringent conditions up to 0.1x saline sodium citrate and 0.5% sodium dodecyl sulfate. After XOMAT AR film (Kodak, Rochester, N.Y.) is exposed to the blots in a Phosphorimager cassette (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) for several hours, hybridization patterns are compared visually.

EXAMPLE 3 : Northern Blot Analysis

- 10 Northern analysis is a laboratory technique used to detect the presence of a transcript of a gene and involves the hybridization of a labeled nucleotide sequence to a membrane on which RNAs from a particular cell type or tissue have been bound (Sambrook et al., supra).
- 15 Northern blots containing 2 µg of poly(A)+RNA isolated from specific adult human tissues or from sections of the brain are obtained from commercial sources (Clontech). Probes are prepared by random prime labeling (Pharmacia Biotech Inc.), or as described above. PCR
- 20 primers (SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 6) specific for the 5' and 3' ends of the protein coding sequence of the first exon of hASIC1B cDNA were used in a PCR reaction to generate a fragment containing the entire hhASIC1B-specific sequence. This fragment was cloned into the pBluescript vector and used to probe the multiple tissue blots.
- 25 Filters were hybridized overnight at 42°C in a buffer containing 50% formamide, 5 X SSPE, 2% SDS, 10 X Denhardt's solution, and 100 µg/ml salmon sperm DNA. Filters were washed with 0.1 X SSC, 0.1% SDS at 55°C. and exposed to Kodak X-Omat AR film for 4 days at -70°C. Results indicate that hASIC1B is not detectable in peripheral
- 30 tissues and is mainly expressed in neuronal tissues. In the brain, hASIC1B is expressed mainly in the thalamus, caudal nucleus, the

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 65 -

p.g. of the cortex, cerebellum, substantia nigra, medula oblongata, putamen and lower levels in the corpus collosum.

EXAMPLE 4: Expression of hASIC1B in *Xenopus laevis* Oocytes

5 hASIC1B is expressed in *Xenopus* oocytes by nuclear injection of hASIC1B cDNA subcloned into pCDNA3 (1-5 ng). Control oocytes were injected with H₂O. Oocytes were maintained at 18°C in modified Barth's solution. Current was measured by two-electrode voltage clamp 1-3 days after injection. During voltage clamp (-60 mV/-100 mV)), oocytes were bathed in 116 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM acetic acid and 5 mM Hepes (pH 7.4 with NaOH). To determine proton-gating, bath solution was quickly switched to a solution of pH 5 for 10 sec, then returned to bath solution for washout.

15 The stimulating solution was prepared by lowering the pH of the original bath solution with hydrochloric acid. The osmolality of the solutions was verified with an osmometer and corrected with mannitol or choline chloride. To document ionic selectivity, NaCl was replaced with LiCl or KCl. Current-voltage relationships were determined by stepping from a holding potential of -60 mV to potentials between -100 and +60 mV for 10 seconds before and during stimulation with low pH solution. Similar functional characterizations are also performed in patch-clamp with COS cells transfected with the hASIC1B containing pcDNA vector. Typical current in response to pH 5 is shown in Fig 5 and Fig 6, respectively with COS cells and oocytes. Dose-response curves with varying pH (Fig. 7) as well as I/V curves (Fig. 8) for hASIC1B channels were obtained in a similar fashion.

EXAMPLE 5: Non-functional dominant-negative hASIC1B subunit generated by site-directed mutagenesis

30 DEG/EnaC ion channel subunits associate into homo and/or heteromultimeric complexes, which form the actual channel. It is therefore possible by artificially modifying specific amino acids in a

given sequence to render a particular subunit non-functional regarding, for example, channel activity, but still retaining its ability to interact with other subunits. The resulting complex, which comprises such non-functional mutant, also becomes inactive, even in the presence of agonist. Amino acids, which are targetted, are preferably highly conserved throughout a given family of ion channel subunits. We have targetted certain amino acids of the ASIC family and found that a conserved Gly residue (i.e position 439 in human ASIC3, or position 469 in hASIC1B), when substituted with an Arg residue, generates a dominant-negative mutant. When the hASIC3-G439R is expressed alone in oocytes, no current is observed in response to low pH under voltage clamp conditions. Furthermore, when the mutant is coinjected with a wild type ASIC3 subunit, no functional channel is expressed because of the dominant-negative effect of the G439R mutant. The substitution of Gly-469 from hASIC1B to an Arg residue is done using the commercially available mutagenesis kit "QuickChange" (Stragene), according to the kit's directives. Briefly, two antiparallel oligonucleotide primers, each complementary to opposite strands in the same region, are synthesized carrying the desired mutation as a single mismatch: a "C" replaces the "G" in the first position of the codon encoding Gly-469, the rest of the nucleotides being identical. The oligonucleotide primers are then extended during temperature cycling by *PfuTurbo* DNA polymerase using as template a pCDNA3 plasmid comprising the cDNA encoding the full length hASIC1B. On incorporation of the oligonucleotide primers, a mutated plasmid containing staggered nicks is generated. After temperature cycling, the product is treated with *Dpn* I. The *Dpn* I is used to digest the parental DNA template and select for the synthesized DNA containing mutations. Since DNA isolated from most *E. coli* strains is *dam* methylated, it is susceptible to *Dpn* I digestion, which is specific for methylated and hemimethylated DNA. The nicked vector DNA incorporating the desired mutations is then transformed into *E. coli*.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 67 -

Once the correct mutation has been confirmed by sequencing, the mutant hASIC1B is tested in oocytes or mammalian expression systems, as described herein.

- 5 Such dominant-negative mutants may be used as tools to investigate the different combinations of subunit interactions, and to study physiological role of hASIC1B and its involvement pathophysiological conditions by breeding transgenic animals carrying the dominant-negative mutant. These mutants can also be used as an alternative to
10 antisense oligonucleotides, for example in gene therapy.

EXAMPLE 6: Extension of hASIC1B-Encoding Polynucleotides to Full Length or to Recover Regulatory Sequences

- 15 Full length hASIC1B-encoding nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 1) is used to design oligonucleotide primers for extending a partial nucleotide sequence to full length or for obtaining 5' or 3', intron or other control sequences from genomic libraries. One primer is synthesized to initiate extension in the antisense direction (R) and the
20 other is synthesized to extend sequence in the sense direction (F). Primers are used to facilitate the extension of the known sequence "outward" generating amplicons containing new, unknown nucleotide sequence for the region of interest. The initial primers are designed from the cDNA using GeneWorks 5.0.1 (Oxford Molecular, Cambridge,
25 UK), or another appropriate program, to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68.degree.-72.degree. C. Any stretch of nucleotides which would result in hairpin structures and primer-primer dimerizations is avoided.

30

The original, selected cDNA libraries, or a human genomic library are used to extend the sequence; the latter is most useful to obtain 5' upstream regions. If more extension is necessary or desired,

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 68 -

additional sets of primers are designed to further extend the known region.

By following the instructions for the EXPAND long template PCR kit
5 (Roche Diagnostics) and thoroughly mixing the enzyme and reaction
mix, high fidelity amplification is obtained. Beginning with 40 pmol of
each primer and the recommended concentrations of all other
components of the kit, PCR is performed using the Peltier Thermal
Cycler (PTC200; M.J. Research, Watertown, Mass.) and the following
10 parameters:

	Step 1	94°C for 1 min (initial denaturation)
	Step 2	65°C for 1 min
	Step 3	68°C for 6 min
15	Step 4	94°C for 15 sec
	Step 5	65°C for 1 min
	Step 6	68°C for 7 min
	Step 7	Repeat step 4-6 for 15 additional cycles
	Step 8	94°C for 15 sec
20	Step 9	65°C for 1 min
	Step 10	68°C for 7:15 min
	Step 11	Repeat step 8-10 for 12 cycles
	Step 12	72°C for 8 min
25	Step 13	4°C (and holding)

A 5-10 uL aliquot of the reaction mixture is analyzed by
electrophoresis on a low concentration (about 0.6-0.8%) agarose mini-
gel to determine which reactions were successful in extending the
sequence. Bands thought to contain the largest products are selected
30 and removed from the gel. Further purification involves using a
commercial gel extraction method such as QIAQuick.TM. (QIAGEN
Inc., Chatsworth, CA). After recovery of the DNA, Klenow enzyme is
used to trim single-stranded, nucleotide overhangs creating blunt ends
which facilitate religation and cloning.

35

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 69 -

After ethanol precipitation, the products are redissolved in 13 μ L of ligation buffer, 1 μ L T4-DNA ligase (15 units) and 1 μ L T4 polynucleotide kinase are added, and the mixture is incubated at room temperature for 2-3 hours or overnight at 16.degree. C. Competent E. coli cells (in 40 μ L of appropriate media) are transformed with 3 μ L of ligation mixture and cultured in 80 μ L of SOC medium (Sambrook et al., supra). After incubation for one hour at 37°C., the whole transformation mixture is plated on Luria Bertani (LB)-agar (Sambrook et al., supra) containing 2.times. Carb. The following day, several colonies are randomly picked from each plate and cultured in 150 μ L of liquid LB/2.times. Carb medium placed in an individual well of an appropriate, commercially-available, sterile 96-well microtiter plate. The following day, 5 μ L of each overnight culture is transferred into a non-sterile 96-well plate and after dilution 1:10 with water, 5 μ L of each sample is transferred into a PCR array.

For PCR amplification, 18 μ L of concentrated PCR reaction mix (3.3.times.) containing 4 units of rTth DNA polymerase, a vector primer, and one or both of the gene specific primers used for the extension reaction are added to each well. Amplification is performed using the following conditions:

Step 1	94°C for 60 sec
Step 2	94°C. for 20 sec
Step 3	55°C for 30 sec
Step 4	72°C for 90 sec
Step 5	Repeat steps 2-4 for an additional 29 cycles
Step 6	72°C for 180 sec
Step 7	4°C (and holding)

Aliquots of the PCR reactions are run on agarose gels together with molecular weight markers. The sizes of the PCR products are compared to the original partial cDNAs, and appropriate clones are selected, ligated into plasmid, and sequenced.

EXAMPLE 7: Antisense Molecules

Antisense molecules to the hASIC1B-encoding sequence, or any part thereof, is used to inhibit *in vivo* or *in vitro* expression of naturally occurring hASIC1B. Although use of antisense oligonucleotides, comprising about 20 base-pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger cDNA fragments. An oligonucleotide based on the coding sequences of hASIC1B, as shown in Fig. 1, is used to inhibit expression of naturally occurring hASIC1B. The complementary oligonucleotide is designed from the most unique 5' sequence as shown in Fig. 1 and used either to inhibit transcription by preventing binding to the upstream untranscribed sequence or translation of an hASIC1B-encoding transcript by preventing ribosomes from binding. Using an appropriate portion of the 5' sequence of SEQ ID NO: 1, an effective antisense oligonucleotide includes any 15-20 nucleotides spanning the region which translates into the 5' coding sequence of the polypeptide as shown in Fig. 1.

EXAMPLE 8: Expression of hASIC1B

Expression of hASIC1B is accomplished by subcloning the cDNA into appropriate vectors and transforming the vectors into host cells. In this case, the cloning vector, pSport is used to express hASIC1B in *E. coli*. Upstream of the cloning site, this vector contains a promoter for β -galactosidase, followed by sequence containing the amino-terminal Met, and the subsequent seven β -galactosidase. Immediately following these eight residues is a bacteriophage promoter useful for transcription and a linker containing a number of unique restriction sites.

Induction of an isolated, transformed bacterial strain with IPTG using standard methods produces a fusion protein which consists of the first

eight residues of β -galactosidase, about 5 to 15 residues of linker, and the full length protein. The signal residues direct the secretion of hASIC1B into the bacterial growth media which can be used directly in the following assay for activity.

5

EXAMPLE 9: Production of hASIC1B Specific Antibodies

hASIC1B that is substantially purified using PAGE electrophoresis (Sambrook, supra), or other purification techniques, is used to
10 immunize rabbits and to produce antibodies using standard protocols. The amino acid sequences deduced from SEQ ID NO: 2 are analyzed using MacVector 6.0.1 (Oxford Molecular) to determine regions of high immunogenicity and a corresponding oligopolypeptide is synthesized and used to raise antibodies by means known to those of skill in the
15 art. Selection of appropriate epitopes, such as those near the C-terminus or in hydrophilic regions, is described by Ausubel et al. (supra), and others.

Typically, the oligopeptides are 15 residues in length, synthesized
20 using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 431 A using fmoc-chemistry, and coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH, Sigma, St. Louis, Mo.) by reaction with N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS; see "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow E and Lane D, eds., 1998, CSHL Press, Plainview,
25 N.Y.). Rabbits are immunized with the oligopeptide-KLH complex in complete Freund's adjuvant. The resulting antisera are tested for antipeptide activity, for example, by binding the peptide to plastic, blocking with 1% BSA, reacting with rabbit antisera, washing, and reacting with radioiodinated, goat anti-rabbit IgG.

30

EXAMPLE 10: Purification of Naturally Occurring hASIC1B Using Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant hASIC1B is substantially purified
5 by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for
hASIC1B. An immunoaffinity column is constructed by covalently
coupling hASIC1B antibody to an activated chromatographic resin,
such as CnBr-activated Sepharose (Pharmacia & Upjohn). After the
coupling, the resin is blocked and washed according to the
10 manufacturer's instructions.

Media containing hASIC1B is passed over the immunoaffinity column,
and the column is washed under conditions that allow the preferential
absorbance of hASIC1B (e.g., high ionic strength buffers in the
15 presence of detergent). The column is eluted under conditions that
disrupt antibody/hASIC1B binding (e.g., a buffer of pH 2-3 or a high
concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and
hASIC1B is collected.

EXAMPLE 11: Identification of Molecules Which Interact with hASIC1B

Permanently or transiently transfected COS cell lines in multiwell
plates expressing hASIC1B are loaded with potential-sensitive dyes
25 and the fluorescence emission is measured following application of a
low pH buffer (pH 5.0). The responses in the presence and absence of
candidate compounds is compared to identify compounds which
stimulate, inhibit or modulate hASIC1B.

30 Alternatively, hASIC1B or biologically active fragments thereof are
labeled with ¹²⁵I-Bolton-Hunter reagent (Bolton et al. (1973) Biochem.
J. 133:529). Candidate molecules previously arrayed in the wells of a
multi-well plate are incubated with the labeled hASIC1B, washed and
any wells with labeled hASIC1B complex are assayed. Data obtained

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 73 -

using different concentrations of hASIC1B are used to calculate values for the number, affinity, and association of hASIC1B with the candidate molecules.

- 5 All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described method and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection
- 10 with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 74 -

WHAT IS CLAIMED IS :

1. A purified and isolated human proton-gated ion channel protein
5 (hASIC1B) selected from the following: a hASIC1B having at least 80% identity with the amino acid sequence defined in SEQ ID NO:2, a hASIC1B having at least 85% identity with the amino acid sequence defined in SEQ ID NO:2, a hASIC1B having at least 90% identity with the amino acid sequence defined in SEQ ID NO:2, a
10 hASIC1B having at least 95% identity with the amino acid sequence defined in SEQ ID NO:2, a hASIC1B having at least 98% identity with the amino acid sequence defined in SEQ ID NO:2 and a hASIC1B having at least 99% identity with the amino acid sequence defined in SEQ ID NO:2.
15
2. The protein of claim 1, which is characterized by the activation of protons (acids, low pH solutions).
3. The protein of claim 2 which has the amino acid sequence defined
20 in SEQ ID NO:2.
4. A nucleic acid which encodes a protein as defined in any one of claims 1-3.
- 25 5. The nucleic acid of claim 4, which is capable of hybridizing to SEQ ID NO:1.
6. The nucleic acid of claim 4, which has the sequence defined in
SEQ ID NO: 1.
30
7. A recombinant vector, comprising the nucleic acid of any one of claims 4-6.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 75 -

8. The recombinant vector of claim 7, which is an expression vector.
9. A host comprising the recombinant vector of claim 7 or 8.
- 5 10. A host cell comprising the recombinant vector of claim 8.
11. A process for producing a human proton-gated ion channel protein (hASIC1B) comprising culturing the host cell of claim 10 under conditions sufficient for the production of said protein and
10 recovering said protein from the culture.
12. A process for producing a cell which produces a protein as defined in any one of claims 1-3.
- 15 13. A process as defined in claim 12, further comprising transforming or transfecting a host cell with the recombinant vector of claim 8.
14. An antibody immunospecific for a hASIC1B protein as defined in any one of claims 1-3.
- 20 15. A hybridoma producing an antibody as defined in claim 14.
16. A method for the treatment of a subject in need of enhanced activity or expression of a hASIC1B protein as defined in any one
25 of claims 1-3 comprising:
(a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an agonist to said hASIC1B protein; or
(b) providing to the subject a nucleic acid as defined in any one of
30 claims 4-6 in a form so as to effect production of said hASIC1B protein activity *in vivo*.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 76 -

17. A method for the treatment of a subject having a need to inhibit activity or expression of a hASIC1B protein as defined in any one of claims 1-3 comprising:
- 5 (a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an antagonist to said hASIC1B protein; or
- (b) administering to the subject a nucleic acid molecule that inhibits the expression of the nucleotide sequence encoding said hASIC1B protein; or
- 10 (c) administering to the subject a therapeutically effective amount of a protein that competes with said hASIC1B protein for its ligand.
18. A process for diagnosing a disease or a susceptibility to a disease in a subject related to the expression or activity of a hASIC1B protein as defined in any one of claims 1-3 in a subject comprising:
- 15 (a) determining the presence or absence of a mutation in the nucleotide sequence encoding said hASIC1B protein in the genome of said subject; or
- (b) analyzing for the presence or amount of hASIC1B protein expression in a sample derived from said subject.
- 20 19. A method for identifying agonists to a hASIC1B protein as defined in any one of claims 1-3 comprising:
- (a) putting cells produced by the process of claim 11 in contact with candidate compound(s); and
- 25 (b) determining whether the candidate compound induces or modulates a biological activity or signal transduced by the hASIC1B receptor; or
- (c) determining whether the candidate compound induces inward currents or modulates proton-induced inward currents
- 30 transduced by the hASIC1B receptor.
20. An agonist identified by the method of claim 19.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

- 77 -

21. An agonist of claim 20, which is, or is an adjuvant to, an antidepressant, a desensitizing agent, an antipruritic, an analgesic, a chemotherapeutic or antineoplastic agent, an antipsychotic, a
5 psychotherapeutic agent, a respiratory and cerebral stimulant, a cognitive stimulant, memory stimulant, a promoter of neuronal regeneration, a stimulant of cell growth or proliferation, an insecticide, a pesticide or an anthelmintic, or any combination thereof.
- 10 22. The method for identifying antagonists to a hASIC1B protein as defined in any one of claims 1-3 comprising:
(a) putting cells produced by the process of claim 11 in contact with a low pH solution (pH < 7.4) or any other agonist, including
15 an agonist as defined in claim 20; and
(b) determining whether the signal generated by protons or said agonist is modulated, diminished or abolished in the presence of candidate compound(s).
- 20 23. An antagonist identified by the method of claim 22.
24. An antagonist as defined in claim 23, which is, or is an adjuvant to, an analgesic, an antipyretic, an antipruritic, an anxiolytic, sedative or hypnotic, a psychotherapeutic agent, an anticonvulsant, a
25 neuroprotectant, a general anesthetic, a local anesthetic, a hypotensive agent, a muscle relaxant, an antidiarrhea agent, an antacid, or any combination thereof.

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

1/16

ATGCCCATCCAGATCTTCTGCTCCATGTCATCTCCTCTGGAGAGGAAGCCCCAGGGCCC
M P I Q I F C S M S F S S G E E A F G P>

TTGGGAGATATTTGGGGTCCCAACCACATCAGCAGCAGCAGACATCTCAGAAATCGAA
L G D I W G P H H H Q Q Q Q D I S E S E>

GAGGAGGAAGAAAGGAAGGAAGGAGGCACTGAGGAAGGAGGCCAGTGAAGGGGCAITCA
E E E E E K E K E A V R K E A S E G H S>

CCCATGGACTTGTGGGCTTTGGCCACAGCTGCACCCCTCCATGGCACCAACACATTTT
P M D L V A F A N S C T L H G T N H I F>

GTGGAGGGGGGTCCAGGGCCAAAGCAGGTGCTGTGGTGGGTGGCCTTTGTCTGCACTG
V E G G P G P R Q V L W S V A F V L A L>

GGTGCCCTTCTGTGCCAGGTAGGGGACCGCTTGCTTATTACCTCAGCTACCCACAGTG
G A F L C Q V G D R V A Y Y L S Y P H V>

ACCCTTCTAAACGAAGTGGCCACCAAGAGCTGGCCTTCCAGCAGTCACCCCTCTGCAAC
T L L N E V A T T R L A F P A V T L C N>

ACTAATGCTGTGCGGCTGTCCAGCTCAGCTACCCCTGACTTGTCTTATTGGCCCCCATG
T N A V R L S Q L S Y P D L L Y L A P M>

CTGGGACTGGATGAAGATGATGACCCGGGGTGCCCTCGCTCCACCGGGCCCTGAGGCC
L G L D E S D D P G V P L A P P G P B A>

TTCTCTGGGGAGCCCTTTAACCTGCACCGCTTCTACAATCGCTCCTGCCACCGGCTGGAG
F S G E P F N L H R F Y N R S C H R L E>

GACATGCTGCTCTATGCTCTCTACCAAGGGGACCCCTGCGGCCCTCACAACCTTCTAGTG↓
D M L L Y C S Y Q G G P C G P H N F S V>↓

GTCTTCACACGCTATGGAAAGTGCTACACGTTCAACTCGGGCCGAGATGGGGCGCGCGG
V F T R Y G K C Y T F N S G R D G R P R>

CTGAAGACCAATGAAGATGGGACGGGCAATGGGCTGGAATCATGCTGGACATCCAGCAG
L K T M K D G T G N G L E I M L D I Q Q>

GACGAGTACCTGCTGTGTGGGGGAGACT↓GACGAGACGTCCCTTGAAGCAGGCATCAAA
D E Y L P V W G E T↓D E T S F E A G I K>

GTGCAGATCCATAGTCAGGATGAACCTCCTTTTCATCGACACGCTGGGCTTTGGCGTGGCC
V Q I H S Q D E P P F I D Q L G F G V A>

CCAGGCTTCCAGACCTTTGTGGCCTGCCAGGACGACGG↓CTCATCTACCTGCCCCACCC
P G F Q T F V A C Q E Q R↓L I Y L P P P>

TGGGGCACCTGCAAGCTGTTACCATGGACTCGGATTTGGATTCTTCGACTCCTACAGC
W G T C K A V T M D S D L D F F D S Y S>

ATCAGTGCCTGCGCATCGACTGTGAGACGGCTACCTGGTGGAGAACTGCAACTGCCGC
I T A C R I D C E T R Y L V E N C N C R>

ATGGTGACATGCCA↓GGGGATGCCCATACGTACTCCAGAGCAGTACAAGGAGTGTGCA
M V H M P↓G D A P Y C T P E Q Y K E C A>

Fig 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

2/16

GATCCTGCTCTG↓GACTTCCTGGTGGAGAGGACCAAGGAGTACTGCGTGTGTGAATGCCT
D P A L ↓ D P L V E K D Q E Y C V C E H P>
TGCAACCTGACCCGCTATGGCAAAGAGCTGTCCATGGTCAAGATCCCGACGAAAGCCTCA
C N L T R Y G K E L S M V K I F S K A S>
GCCAAGTACCTGGCCAGAAGTTCAACAAATCTGAGCAATACATAGGG↓GAGAACATCCTG
A K Y L A K K F N K S E Q Y I G ↓ E N I L>
GTGCTGGACATTTCTTTGAAGTCTCTCAACTATGAGACCATTTGAACAGAGAGAGCCCTAT
V L D I F F E V L N Y E T I E Q K K A Y>
GAGATTGCAGGGCTCCTG↓GGTGACATCGGGGCCAGATGGGGCTGTTCAATCGGGGCCAGC
E I A G L L ↓ G D I G G Q H G L F I G A S>
ATCCTCACGGTGTCTGGAGCTCTTTGACTACGGCTACGAG↓GTCAATTAAGCACAAAGCTGTGC
I L T V L E L F D Y A Y E ↓ V I K H K L C>
CGACGAGGAAATGGCCAGAAGGAGGCCAAAGGAGCAGTGCAGACAGGGCGCTGGCCCTC
R R G K C Q K E A K R S S A D K G V A L>
AGCCTGGACGCTCAAAAGACAC↓AAACCCGTGCGAGAGCCTTCGGGGCCACCTTGCCTGGG
S L D D V K R H ↓ N P C E S L R G H P A G>
ATGACATACGCTGCCACATCTCTACCTACCAATCCGGCCGAGGCACGTTGAGGACTTT
M T Y A A N I L P H H P A R G T F E D F>
ACCTGCTGA
T C *>
3'UTR
GCCCGCAGGCCGCTGAACCAAAGGCTAGATGGGAGGACTAGGAGAGCGGGGGGGCCC
CCAGCTGCTCTCCATCTGCGCTGGGACTCCCAACACTCCGGGGCAGATCTTTCCTC
TTGTCTGTGTAAAGGAAGGAGTCTTACCATAGAGTCTCTCTGCTCTATCCCATTC
YTTTACATTAAACAAACTAATCTAAAAAGAACTAAAAAGGGAGAACGGGGCAAGGGA
CCTCAGGCTGCCCCCTCTCTCCTCCATGCTGCTCCCTAGCTCCAGGCTGAATCTCTGT
TATCTAGCTGTCTGCGCTCTGAGTGTCCATCTACATCTGCTGCCACGCTACCAAAAG
CCCTTCCAGTGAAGGGTGAAGGGATCTCTGGGGTCTGGAATTTGGCCCAAACAGAG
AATGTACCTTAAGGGGGAGGGCTAGTGTGGGGAGGGAGGCTTCCCGAGCCTTAAGAGAG
CCTCTCAGCCCACTGACTGTCCCAAACCAAGTCTCTGGAAGGAACTAAACCTCAGC
CCCACTCTCTCACACCATGTGGAATCTCTGGGGGTGGGGATCCCTTAAGAAAGTGGTA
ATGGGGAAGAATCGGGCCCTGTGTCTAGGCTACATCTCTGATACCTATAGTTACCCC
CCACCCACAGCTGCTGGAGAGAAATCCCAAGAGGCAGCCCTTCTCACCATCCCATTA
AGACCKGGCTGTAGCTGCTCAGCTCAGGAGAGGGCGCTAGTGCCTAACCTCAGTGGT
CCCTCTCCGGAGGCCCTTGTAGAGGGCCAGTCCATAAATTTCTTATGGAATCTCCC
ACATCTCTTCCCAACTTCATTTGCTTCTCTCAACACCTCATCTGCATTTCTATTTTC
TATATGATACAGACTCTATATGTCTATATCTCTGTATATCTTCCAGCCCTGTCTGT
TCCACCCATCCCTCTTGTCTCTGAGAACCATCTCCACCCCAAGTCCACCTTCTAT
GTTTCTACTCCCTCCCTGGTCTCTGAATGCCCTTGGCTGTATAAAGAGTTGAGCTCTCT
CCCTGGTGTCTGTCTGTACACACATCCCTCTGAGAGACAAAGGAGACGACACGCGC
ATGTAACTTTGCACTGTCTCAGTGGGACAAAGGAGCTGTGAATCACAAGCTCTGCC
TCTTCTGGCCTCACCTCTCCCAACCCGGGCACCTCGGCCCTCCCTGACGCTTAA
CATCTCTCTCCCTGTCTCTCTATCCCATTTGCCCTCTGCCAGCTGACAGTGGCATCCC
CAGGGAAGGGTTGTGTAGAGATAGCCCCCAGGGGAGTGGAGGTCTACCTGGACA
CTAAGCCAAGTGTGTAGAGACAGAAAGGAGCTGGGATTTGGCGACTCTGAAGTTGGGG
CAGTGGGATGTGACAGGCAGAGCTGAGGCTCTCAGTCACTGGCCCTTCTCTCTCTGG
GTGCCAGCCCTTTCTCTACCTGATACCAAGCCACCACTTTTATTTCTGGTGAAG

Fig 1 (cont.)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

3/16

TGGGTTTGGGAGGAAGAGAGGCCTAGAGGAGGAGTTGAAAGCTCTGCTGTGTCTCACC
CTATCTTAATGAGAGACAACTGAGGTGGAGGGCTGCCCCCTCCCTCCACCAGACACT
CCTCCAGGCTGAGCCCCAACCCCTCTTCAGGCTTCCCTTCCTAGCTGTGTCTTGGTC
TTCAATCCAGAACAGGACCTGTGAGAGCTGCAITGGCTGGAGCTGGAGAGTAAAGGT
GTAGGATCTTGGATCTCTTGGTTCTAAGACTTCTCAGAGATCATACCTCCCCAGA
GGGAAGCAGGAATGAGGCCAAAAAGTGTGCATTGGATAGGGGACAGCAGGCAGGGCTCT
GGGTGACGCATSCCTCTGCTTAATAAACTGGGTTTCAACCAAAAAA

Fig 1 (*cont.*)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

4/16

hASIC1B 1 M P I Q I F C S M S F S S G E E A P G P L G D I W 25
hASIC1B 1 0
hASIC1A 1 0
hASIC2A 1 0
hASIC2B 1 M S R I G G A G L P A A A L 14
hASIC4 1 M P I E I V C K I K F - - - - - 11
hASIC3 1 0

hASIC1B 26 G P H H H Q Q Q D I S E S E E E E E E K E K E A 50
hASIC1B 1 0
hASIC1A 1 0
hASIC2A 1 0
hASIC2B 15 T G P G R F R M A R E E P A P A A L A A A G Q P G 39
hASIC4 12 - - - - - A E E D A K P K E K E A G 24
hASIC3 1 0

hASIC1B 51 V R K E A S E G H S - - - B M D L V A F A N S C 71
hASIC1B 1 M E A G S E L D E G D D S B R B L V A F A N S C 24
hASIC1A 1 M E L K A E E E E V G G V Q P V S I Q A F A S S S 25
hASIC2A 1 M D L K E S P S E G S L Q E S S I Q I F A N T S 24
hASIC2B 40 G G R G G E R A L Q G P G V A R R G R P S L S R A 64
hASIC4 25 D E Q S L L G A V A P G A A B R D L A T F A S T S 49
hASIC3 1 M K P T S G P E E A R R Q P S D I R V F A S N C 24

hASIC1B 72 T L H G T N H I F V E - - - G P G P R Q V L W 92
hASIC1B 25 T L H G A S H V E V E - - - G P G P R Q A L W 45
hASIC1A 20 T L H G L A H I F S Y - - - E R L S L K R A L W 46
hASIC2A 25 T L H G I R H I F V Y - - - G P L T I R R V L W 45
hASIC2B 65 K L H G T R B M C A G R T A A G S F Q R R A L W 89
hASIC4 50 T L H G E G R A C G P - - - G P H G L R R T L W 70
hASIC3 25 S M H G L G H V F G P - - - G S L S L R R G M W 45

hASIC1B 93 S V A F V L A L G A F L C Q V G D R V A Y Y L S Y 117
hASIC1B 46 A V A F V I A L G A F L C Q V G D R V A Y Y L S Y 70
hASIC1A 47 A L C F L G S L A V L L C V C T E R V Q Y Y F H Y 71
hASIC2A 46 A V A F V G S L G L L L V E S S E R V S Y Y F S Y 70
hASIC2B 90 V L A C T S F G L L L S W S S N R L L L W L S F 114
hASIC4 71 A L A L L T S L A A F Y Q A A G L A R G Y L T R 95
hASIC3 46 A A V V L S V A T F L Y Q V A E R V R Y Y R E F 70

Fig 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

5/16

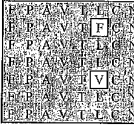
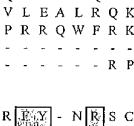
<i>hASIC1B</i>	118	P	T	V	T	L	E	N	E	V	A	T	T	E	F	A	-	-	-	-	-	-	141
<i>rASIC1B</i>	71	H	V	T	L	L	D	E	V	A	T	S	E	V	-	-	-	-	-	-	-	94	
<i>hASIC1A</i>	72	H	V	T	K	L	D	E	V	A	S	Q	E	T	-	P	P	A	V	T	L	95	
<i>hASIC2A</i>	71	Q	E	V	T	K	V	D	E	V	A	Q	S	E	T	-	P	P	A	V	T	94	
<i>hASIC2B</i>	115	P	S	H	T	R	V	H	R	E	W	S	R	Q	E	P	-	-	-	-	-	138	
<i>hASIC4</i>	95	P	H	L	V	A	M	D	P	A	A	P	A	P	V	A	G	-	-	-	-	120	
<i>hASIC3</i>	71	H	Q	E	F	A	L	D	E	R	E	S	H	R	E	V	-	-	-	-	-	94	
																							
<i>hASIC1B</i>	142	N	A	V	R	L	S	Q	E	S	Y	P	D	L	L	Y	L	A	P	M	E	G	156
<i>rASIC1B</i>	95	N	A	V	R	L	S	Q	E	S	Y	P	D	L	L	Y	L	A	P	M	E	G	119
<i>hASIC1A</i>	96	N	E	F	R	F	S	Q	V	S	K	N	D	L	Y	H	A	G	E	L	A	N	120
<i>hASIC2A</i>	95	N	G	F	R	F	S	R	E	T	T	N	D	L	Y	H	A	G	E	L	A	N	119
<i>hASIC2B</i>	139	N	P	L	R	F	P	R	L	S	K	G	D	E	Y	H	A	G	H	W	E	L	163
<i>hASIC4</i>	121	N	R	F	R	H	S	A	L	S	D	A	D	I	F	H	L	A	N	L	T	G	145
<i>hASIC3</i>	95	N	P	L	R	S	R	L	T	P	N	D	E	H	W	A	G	S	A	T	L	G	119
																							
<i>hASIC1B</i>	167	-	-	-	-	D	D	P	G	V	P	E	A	P	P	-	-	-	-	-	-	176	
<i>rASIC1B</i>	120	-	-	-	-	D	D	P	G	V	P	E	A	P	P	-	-	-	-	-	-	129	
<i>hASIC1A</i>	121	R	-	-	-	Y	E	I	P	D	T	Q	M	A	D	E	K	Q	L	E	I	142	
<i>hASIC2A</i>	120	N	-	-	-	L	Q	I	P	D	P	H	E	A	D	P	S	V	L	E	A	141	
<i>hASIC2B</i>	164	N	R	T	A	R	P	L	V	S	E	L	L	R	G	D	E	P	R	R	Q	168	
<i>hASIC4</i>	146	-	-	-	-	D	R	D	G	H	R	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	154	
<i>hASIC3</i>	120	-	-	-	-	A	E	H	A	A	F	L	R	A	L	G	-	-	-	-	R	133	
																							
<i>hASIC1B</i>	177	G	P	E	A	F	S	G	E	P	-	-	F	N	L	H	R	E	Y	-	N	197	
<i>rASIC1B</i>	130	G	P	E	A	F	S	G	E	P	-	-	F	N	L	H	R	E	Y	-	N	150	
<i>hASIC1A</i>	143	N	F	R	S	F	K	P	K	P	-	-	E	N	M	R	E	Y	-	D	R	163	
<i>hASIC2A</i>	142	N	F	K	H	Y	K	P	K	-	-	-	Q	E	S	M	L	E	F	L	-	162	
<i>hASIC2B</i>	189	A	D	F	R	L	F	L	P	P	R	H	F	E	G	I	S	A	A	F	M	213	
<i>hASIC4</i>	155	-	-	-	-	L	R	Y	P	E	P	-	-	D	-	M	V	D	I	L	-	171	
<i>hASIC3</i>	134	A	P	P	G	F	M	P	S	P	-	-	T	E	D	M	A	Q	L	Y	-	155	
																							
<i>hASIC1B</i>	198	R	L	E	D	M	L	L	Y	C	S	Y	Q	G	G	P	C	G	P	H	N	221	
<i>rASIC1B</i>	151	R	L	E	D	M	L	L	Y	C	S	Y	Q	G	G	P	C	G	P	H	N	175	
<i>hASIC1A</i>	164	D	I	R	D	M	L	L	S	C	H	F	R	G	E	V	C	S	A	E	D	188	
<i>hASIC2A</i>	163	D	L	K	D	M	L	L	Y	C	K	F	K	G	Q	E	C	G	H	Q	D	187	
<i>hASIC2B</i>	214	Q	L	E	D	M	L	L	S	C	K	Y	R	G	E	L	C	G	P	H	N	238	
<i>hASIC4</i>	172	Q	L	E	A	D	M	L	K	S	C	N	E	S	G	H	E	S	A	S	N	196	
<i>hASIC3</i>	156	S	E	D	D	M	L	L	D	C	R	E	R	G	Q	P	C	G	R	E	N	180	

Fig 2 (cont.)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

6/16

hASIC1B	222	T R Y G K C Y T F N S G R D G R P R K T M K D Q	246
rASIC1B	176	T R Y G K C Y T F N S G Q D G R P R K T M K G G	200
hASIC1A	189	T R Y G K C Y T F N S G R D G R P R K T M K D Q	213
hASIC2A	188	T K Y G K C Y M F N S G E D G K L L T V K G G	212
hASIC2B	239	T K Y G K C Y M F N S G E D G K L L T V K G G	263
hASIC4	197	T R Y G K C Y T F N - A D P R S S L P S R A Q G	219
hASIC3	181	T R M G K C Y T F N S G A D G A E L L T T R G G	205
hASIC1B	247	T G N G L E I M L D I Q O D E Y L P V W G E T D E	271
rASIC1B	201	T G N G L E I M L D I Q O D E Y L P V W G E T D E	225
hASIC1A	214	T G N G L E I M L D I Q O D E Y L P V W G E T D E	238
hASIC2A	213	T G N G L E I M L D I Q O D E Y L P V G E T E E	237
hASIC2B	264	T G N G L E I M L D I Q O D E Y L P V G E T E E	288
hASIC4	220	M S G E E I M L D I Q Q E Y L L I V R E L N E	244
hASIC3	206	M G N G L E D I M L D V Q Q E E M L P V W R D N E T	230
hASIC1B	272	T S T E A G I K V Q I H S Q D P P P F I D Q I G F	296
rASIC1B	226	T S T E A G I K V Q I H S Q D P P P F I D Q I G F	250
hASIC1A	239	T S T E A G I K V Q I H S Q D P P P F I D Q I G F	263
hASIC2A	238	T T T E A G V K V Q I H S Q S P P F I Q E I G T	262
hASIC2B	289	T T T E A G V K V Q I H S Q S P P F I Q E I G T	313
hASIC4	245	T S T E A Q I R V Q I H S Q E P P P Y I H Q T G F	269
hASIC3	231	H P E E V G L R V Q I H S Q E P P P I T D Q L G L	255
hASIC1B	297	G V A P G F Q T F V A C Q E Q R L I Y L P P P W G	321
rASIC1B	251	G V A P G F Q T F V S C Q E Q R L I Y L P P P W G	275
hASIC1A	264	G V A P G F Q T F V A C Q E Q R L I Y L P P P W G	288
hASIC2A	263	G V A P G F Q T F V A T O E Q R L T Y L P P P W G	287
hASIC2B	314	G V A P G F Q T F V A T O E Q R L T Y L P P P W G	338
hASIC4	270	G V S P G F Q T F V S C Q E Q R L T Y L P Q P W G	294
hASIC3	265	G V S P G Y Q T F V S C Q Q Q Q L S F L P P P W G	280
hASIC1B	322	T C K A V T M D S - - D L - - - - - D	333
rASIC1B	276	T C N A V T M D S - - D L - - - - - D	285
hASIC1A	289	T C K A V T M D S - - D L - - - - - D	300
hASIC2A	288	E C R S S E M G L - - - - - D	297
hASIC2B	339	E C R S S E M G L - - - - - D	348
hASIC4	295	N C R A E S E L R - - E P E - - - - L Q	308
hASIC3	281	D C S S A S L N P N Y E P E P S D P L G S P S P S	305

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

7/16

<i>hASIC1B</i>	334	F	D	S	Y	S	T	A	C	R	I	D	C	E	T	R	Y	L	V	E	N	C	N	G	358		
<i>hASIC1B</i>	286	F	D	S	Y	S	T	A	C	R	I	D	C	E	T	R	Y	L	V	E	N	C	N	C	310		
<i>hASIC1A</i>	301	F	D	S	Y	S	T	A	C	R	I	D	C	E	T	R	Y	L	V	E	N	C	N	C	325		
<i>hASIC2A</i>	298	F	E	P	V	S	T	A	C	R	I	D	C	E	T	R	Y	L	V	E	N	C	N	C	322		
<i>hASIC2B</i>	349	F	E	P	V	S	T	A	C	R	I	D	C	E	T	R	Y	L	V	E	N	C	N	C	373		
<i>hASIC4</i>	309	G	Y	S	A	V	S	A	C	R	L	R	C	E	K	E	A	V	L	Q	R	G	H	G	333		
<i>hASIC3</i>	306	P	S	P	P	T	L	M	G	C	E	R	L	A	C	E	T	R	Y	V	A	R	K	G	G	330	
<i>hASIC1B</i>	359	R	M	V	H	M	P	G	D	A	P	Y	C	T	P	E	O	Y	K	E	C	A	D	P	A	383	
<i>hASIC1B</i>	311	R	M	V	H	M	P	G	D	A	P	Y	C	T	P	E	O	Y	K	E	C	A	D	P	A	335	
<i>hASIC1A</i>	326	R	M	V	H	M	P	G	D	A	P	Y	C	T	P	E	O	Y	K	E	C	A	D	P	A	350	
<i>hASIC2A</i>	323	R	M	V	H	M	P	G	D	A	P	F	O	T	P	E	Q	H	R	E	C	A	E	P	A	347	
<i>hASIC2B</i>	374	R	M	V	H	M	P	G	D	A	P	F	O	T	P	E	Q	H	R	E	C	A	E	P	A	368	
<i>hASIC4</i>	334	R	M	V	H	M	P	G	N	E	T	I	C	P	E	N	I	V	I	L	C	A	H	T	I	358	
<i>hASIC3</i>	331	R	M	V	H	M	P	G	D	V	E	V	G	S	P	Q	O	L	E	K	N	C	A	H	P	A	355
<i>hASIC1B</i>	384	D	F	L	V	L	K	D	Q	E	N	G	V	C	E	M	P	C	N	L	T	R	Y	G	K	E	408
<i>hASIC1B</i>	336	D	F	L	V	L	K	D	Q	E	N	G	V	C	E	M	P	C	N	L	T	R	Y	G	K	E	360
<i>hASIC1A</i>	351	D	F	L	V	L	K	D	Q	E	N	G	V	C	E	M	P	C	N	L	T	R	Y	G	K	E	375
<i>hASIC2A</i>	348	G	L	L	A	E	K	D	S	N	Y	C	L	E	R	T	P	C	N	L	T	R	Y	N	G	E	372
<i>hASIC2B</i>	399	G	L	L	A	E	K	D	S	N	Y	C	L	E	R	T	P	C	N	L	T	R	Y	N	G	E	423
<i>hASIC4</i>	359	D	S	L	G	G	G	P	E	G	P	C	F	C	P	T	P	C	N	L	T	R	Y	G	K	E	383
<i>hASIC3</i>	356	D	A	I	L	R	K	D	S	-	-	G	A	C	P	N	P	C	A	S	T	R	Y	A	K	E	378
<i>hASIC1B</i>	409	L	S	M	V	K	I	P	S	K	A	S	A	K	Y	L	A	K	K	T	N	K	S	E	Q	Y	433
<i>hASIC1B</i>	361	L	S	M	V	K	I	P	S	K	A	S	A	K	Y	L	A	K	K	T	N	K	S	E	Q	Y	385
<i>hASIC1A</i>	376	L	S	M	V	K	I	P	S	K	A	S	A	K	Y	L	A	K	K	T	N	K	S	E	Q	Y	400
<i>hASIC2A</i>	373	L	S	M	V	K	I	P	S	K	T	S	A	K	Y	L	E	K	K	E	N	K	S	E	K	397	
<i>hASIC2B</i>	424	L	S	M	V	K	I	P	S	K	T	S	A	K	Y	L	E	K	K	E	N	K	S	E	K	448	
<i>hASIC4</i>	384	L	S	M	V	R	I	P	N	R	G	S	A	R	Y	L	A	R	K	Y	N	R	N	E	T	Y	408
<i>hASIC3</i>	379	L	S	M	V	R	I	P	S	R	A	A	A	R	F	L	A	R	K	L	N	R	S	E	A	Y	403
<i>hASIC1B</i>	434	G	E	N	F	L	V	L	D	I	F	F	E	V	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	458	
<i>hASIC1B</i>	386	G	E	N	F	L	V	L	D	I	F	F	E	V	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	410	
<i>hASIC1A</i>	401	G	E	N	F	L	V	L	D	I	F	F	E	V	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	425	
<i>hASIC2A</i>	398	S	E	N	F	L	V	L	D	I	F	F	E	V	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	422	
<i>hASIC2B</i>	449	S	E	N	F	L	V	L	D	I	F	F	E	V	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	473	
<i>hASIC4</i>	409	T	R	E	N	F	L	V	L	D	I	F	F	E	V	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	433
<i>hASIC3</i>	404	E	A	E	N	V	L	A	E	D	L	F	R	E	A	L	N	Y	E	T	I	E	O	K	K	A	428

Fig 2 (cont.)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

8/16

hASIC1B	459	Y E I A G L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T V	483
rASIC1B	411	Y E I A G L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T V	435
hASIC1A	426	Y E I A G L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T V	450
hASIC2A	423	Y E V A A L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T I	447
hASIC2B	474	Y E V A A L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T I	498
hASIC4	434	Y G L S A L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T L	458
hASIC3	429	Y E M S E L L G D L C G Q M G L F I G A S I L T I	453
hASIC1B	484	L E F E D Y A Y E V L K H K L C R R G K C Q - K E	507
rASIC1B	436	L E F E D Y A Y E V L K H R L C R R G K C Q - K E	459
hASIC1A	451	L E F E D Y A Y E V L K H K L C R R G K C Q - K E	474
hASIC2A	448	L E F E D Y I Y E L K E K L L D L L G - K E E D	471
hASIC2B	499	L E F E D Y I Y E L K E K L L D L L G - K E E D	522
hASIC4	459	L E I L D Y I G E V S W D R L - K R V W R R P K T	482
hASIC3	454	L E I L D Y L C E V F R D K V L G Y F W N R Q H S	478
hASIC1B	508	A K R S S A D K G V A E S L D D V K R H N P C E S	532
rASIC1B	460	A K R S S A D K G V A E S L D D V K R H N P C E S	484
hASIC1A	475	A K R S S A D K G V A E S L D D V K R H N P C E S	499
hASIC2A	472	E G S H D E N - V S T - - - - - C D T	484
hASIC2B	523	E G S H D E N - V S T - - - - - C D T	536
hASIC4	483	P L R T S T G G I S T E G L Q E L K E Q S P C P S	507
hASIC3	479	Q R H L S S T N L L Q E G L G S H R T Q V P H L S L	503
hASIC1B	533	L R G H E A G - - M T Y A A N - I L P H H P A R G	554
rASIC1B	485	L R G H E A G - - M T Y A A N - I L P H H P A R G	506
hASIC1A	500	L R G H E A G - - M T Y A A N - I L P H H P A R G	521
hASIC2A	485	M P N H S E - - T I S H T V N - - V P L Q T T L G	505
hASIC2B	536	M P N H S E - - T I S H T V N - - V P L Q T T L G	556
hASIC4	508	E G R A E G G G V S S L L P N H H H P H G T P G G	532
hASIC3	504	G P R P R - - - T P P C A V T K T L S A S H R T C	525
hASIC1B	555	T F E D F T G	561
rASIC1B	507	T F E D F T C	513
hASIC1A	522	T F E D F T C	528
hASIC2A	506	L E E I A C	512
hASIC2B	557	L E E I A C	563
hASIC4	533	L F E D F A C	539
hASIC3	526	Y L V T Q L	531

Fig 2 (cont.)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

9/16

hASIC1B	1	M P I Q I F C S M S F S S G E E A P G P L G D I W	25
rASIC1B	1		0
hASIC1B	26	G P H H H Q Q Q D I S E S E E E E E E K E K	50
rASIC1B	1		3
hASIC1B	51	V R K E A S E G H S P M D L V A F A N S C T L H G	75
rASIC1B	4	G S E L D E G D D S P R D L V A F A N S C T L H G	28
hASIC1B	76	T N T I E V E G C P G P R Q V L W S V A E V L A L	100
rASIC1B	29	A S H V E V E G C P G P R Q A L W A M A E V I A L	53
hASIC1B	101	G A F L C Q V G D R V A Y V T S Y P H V T L N E	125
rASIC1B	54	G A F L C Q V G D R V A Y V T S Y P H V T L D E	78
hASIC1B	126	V A T T E L A E P A V T L C N T N A V R E S Q L S	150
rASIC1B	79	N A T S E L E V E P A V T L C N T N A V R L S Q L S	103
hASIC1B	151	V P D L L Y L A P M L G L D E S D D P G V P L A P	175
rASIC1B	104	V P D L L Y L A P M L G L D E S D D P G V P L A P	129
hASIC1B	176	P C P P A P S G E P F N L H R E Y N R S C H R L E	200
rASIC1B	129	P G P E A S G E P F N L H R E Y N R S C H R L E	153
hASIC1B	201	D M L L Y C S Y Q G G P C G P H N P S V V F T R Y	225
rASIC1B	154	D M L L Y C S Y C G G P C G P H N P S V V F T R Y	178
hASIC1B	226	G K C V T F N S G R I D G R P R L K T M K D G T G N	250
rASIC1B	179	G K C V T F N S G Q I D G R P R L K T M K G G T G N	203
hASIC1B	251	G L F E L M T D L Q Q D E Y L P V W G E T D E T S R	275
rASIC1B	204	G L F E L M T D L Q Q D E Y L P V W G E T D E L S F	228
hASIC1B	276	E A G L K V Q L H S Q D E P P E I D Q L G F G V A	300
rASIC1B	229	E A G L K V Q L H S Q D E P P E I D Q L G F G V A	253

Fig 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

10/16

hASIC1B	301	P G R Q T F V A G Q E Q R E L M L R	P	P W G T C K	325
rASIC1B	254	P G R Q T F V S G Q E Q R E L M L R	S	P W G T C N	278
hASIC1B	326	A V T M D S D L D F R D S Y S I L E A C R I D C E T			350
rASIC1B	279	A V T M D S - - D F R D S Y S I L E A C R E I D C E T			301
hASIC1B	351	R Y T H A P N C N C R M V H M P G D A P Y C I P F E Q			375
rASIC1B	302	R Y T H V P N C N C R M V H M P G D A P Y C I P F E Q			328
hASIC1B	376	Y K E C A D P A L D D F E V E R D Q R Y C V C E M P			400
rASIC1B	327	Y K E C A D P A L D D F E V E R D Q R Y C V C E M P			351
hASIC1B	401	C N L T R Y G R E L S M V K P S K A S A K Y L A			425
rASIC1B	352	C N L T R Y G R E L S M V K P S K A S A K Y L A			376
hASIC1B	426	K K F N K S E Q Y L G B N L L V L D F F F E V L N			450
rASIC1B	377	K K F N K S E Q Y L G B N L L V L D F F F E V L N			401
hASIC1B	451	Y E T L E Q K K A Y E K A G U E G D I G G Q M G L			475
rASIC1B	402	Y E T L E Q K K A Y E K A G U E G D I G G Q M G L			428
hASIC1B	476	F L I G A S T Y L T V L E E L D X A Y E V L K H K L C			500
rASIC1B	427	F L I G A S T Y L T V L E L F D X A N E H A K H R L C			451
hASIC1B	501	R R G K C Q K E A K R S S A D K G M A T S L D D V			525
rASIC1B	452	R R G K C Q K E A K R S S A D K G V A T S L D D V			476
hASIC1B	526	K R H N P C E S L R G H A G M T Y A A N L L P H			550
rASIC1B	477	K R H N P C E S L R G H A G M T Y A A N L L P H			501
hASIC1B	551	H P A R G T F E D T C			562
rASIC1B	502	H P A R G T F E D T C			513

Fig 3 (cont.)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

11/16

<i>hASIC1B</i>	1	M	P	H	Q	L	F	C	S	M	S	F	S	S	G	E	E	A	P	G	P	L	G	D	I	W	25		
<i>hASIC4</i>	1	M	P	H	E	L	V	C	K	I	K	F	A	E	E	D	A	K	P	-	-	-	-	-	-	-	18		
<i>hASIC1B</i>	26	G	P	H	H	Q	Q	Q	D	I	S	E	S	E	E	E	E	E	E	K	E	K	E	A	50				
<i>hASIC4</i>	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	E	K	E	A	23					
<i>hASIC1B</i>	51	V	R	K	E	A	S	E	G	H	-	-	-	S	P	M	D	E	V	A	R	A	N	S	70				
<i>hASIC4</i>	24	G	D	E	Q	S	L	L	G	A	V	A	P	G	A	A	P	R	D	E	A	T	F	A	S	48			
<i>hASIC1B</i>	71	C	T	N	F	L	Q	T	N	H	I	F	V	E	G	P	G	P	R	Q	V	L	W	S	V	A	95		
<i>hASIC4</i>	49	S	T	N	F	L	Q	L	G	R	A	C	G	P	G	P	H	G	L	R	R	T	L	W	A	L	A	73	
<i>hASIC1B</i>	96	F	V	L	A	E	G	A	P	F	L	C	Q	V	G	D	R	V	A	Y	T	S	Y	F	H	V	120		
<i>hASIC4</i>	74	L	L	T	S	E	A	A	E	L	Y	Q	A	A	G	L	A	R	G	E	L	T	R	F	H	L	98		
<i>hASIC1B</i>	121	T	L	L	N	E	V	A	T	T	B	L	A	-	F	P	A	V	T	L	C	N	T	N	A	V	144		
<i>hASIC4</i>	99	V	A	M	D	P	A	A	P	A	P	V	A	G	F	P	A	V	T	L	G	N	I	N	R	F	123		
<i>hASIC1B</i>	145	R	L	S	Q	L	S	Y	P	D	L	Y	L	A	P	M	L	G	L	D	E	S	D	D	P	169			
<i>hASIC4</i>	124	R	H	S	A	L	S	D	A	D	I	F	H	L	A	N	L	T	G	L	P	P	K	D	R	D	148		
<i>hASIC1B</i>	170	G	V	P	L	A	P	P	G	P	E	A	F	S	G	E	P	F	N	L	H	R	F	Y	N	R	194		
<i>hASIC4</i>	149	G	H	R	A	A	G	L	R	Y	P	E	P	-	-	-	D	M	V	D	I	L	N	R	T	G	170		
<i>hASIC1B</i>	195	S	C	H	R	L	E	D	M	E	L	Y	G	S	Y	Q	G	G	P	G	P	H	N	F	S	219			
<i>hASIC4</i>	171	H	Q	L	A	-	-	D	M	E	K	S	C	N	F	S	G	H	H	G	S	A	S	N	E	S	193		
<i>hASIC1B</i>	220	V	V	F	F	E	R	Y	G	K	C	V	T	E	N	S	G	R	D	G	R	P	R	L	K	T	M	244	
<i>hASIC4</i>	194	V	V	Y	F	E	R	Y	G	K	C	V	T	E	N	-	-	A	D	P	R	S	S	L	P	S	R	216	
<i>hASIC1B</i>	245	K	D	G	T	G	N	G	N	E	F	M	L	D	A	I	O	O	D	E	V	I	P	E	V	W	G	E	269
<i>hASIC4</i>	217	A	G	C	M	S	G	L	E	F	M	L	D	A	I	O	O	E	E	V	I	P	I	W	R	E	241		

Fig 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

12/16

hASIC1B	270	T	D	F	F	S	T	R	A	G	L	K	V	Q	I	H	S	Q	D	E	P	F	T	D	Q	294		
hASIC4	242	H	N	E	T	S	E	E	A	G	F	R	V	Q	I	H	S	Q	E	E	P	F	Y	H	Q	266		
hASIC1B	295	L	G	F	G	V	A	P	G	F	Q	T	F	V	A	C	Q	E	R	L	I	Y	L	P	P	319		
hASIC4	267	L	G	F	G	V	S	P	G	F	Q	T	F	V	S	C	Q	E	R	L	T	Y	L	P	Q	291		
hASIC1B	320	F	W	G	T	E	K	A	V	T	M	D	S	D	L	D	-	-	F	F	D	S	Y	S	I	T	342	
hASIC4	292	F	W	G	N	G	R	A	E	S	E	L	R	E	P	E	L	Q	G	Y	S	A	Y	S	V	S	316	
hASIC1B	343	A	C	R	I	D	C	E	T	R	Y	L	V	E	N	C	N	C	R	M	V	H	M	P	G	D	367	
hASIC4	317	A	C	R	L	R	C	H	E	A	V	L	Q	R	C	H	C	R	M	V	H	M	P	G	N	341		
hASIC1B	368	A	P	Y	C	T	F	E	Q	Y	K	E	C	A	D	P	A	L	E	D	F	E	V	E	K	D	392	
hASIC4	342	E	T	I	C	P	E	N	I	Y	I	E	C	A	D	H	T	H	D	S	L	G	G	G	P	E	366	
hASIC1B	393	E	Y	C	V	C	E	M	P	C	N	T	R	Y	G	E	E	L	S	M	V	K	E	P	S	417		
hASIC4	367	G	P	C	F	C	P	T	E	C	N	T	R	Y	G	K	E	I	S	M	V	R	I	P	N	391		
hASIC1B	418	K	A	S	A	K	N	L	A	K	K	F	N	K	S	E	Q	Y	I	G	E	N	I	L	V	B	442	
hASIC4	392	R	G	S	A	R	N	L	A	R	K	Y	N	R	N	E	T	Y	I	R	E	N	F	L	V	L	416	
hASIC1B	443	D	I	E	E	E	V	E	N	Y	E	T	I	E	Q	K	K	A	Y	E	I	A	G	L	L	Q	467	
hASIC4	417	D	V	E	E	E	A	L	T	S	E	A	M	E	Q	R	A	A	Y	G	L	S	A	L	L	G	441	
hASIC1B	468	D	I	G	G	O	M	G	E	F	L	G	A	S	I	L	P	T	V	I	E	L	F	D	Y	A	Y	492
hASIC4	442	D	L	G	G	O	M	G	L	F	I	G	A	S	I	L	P	T	L	E	B	I	L	D	Y	I	Y	466
hASIC1B	493	B	W	I	K	H	K	L	C	R	R	G	K	C	Q	-	K	E	A	K	R	S	S	A	D	K	516	
hASIC4	467	B	W	S	W	D	R	L	-	K	R	V	W	R	P	K	T	P	L	R	T	S	T	G	G	490		
hASIC1B	517	G	V	A	F	F	S	M	D	V	K	R	H	N	P	C	E	S	L	R	G	H	P	A	G	M	541	
hASIC4	491	I	S	T	T	G	E	Q	E	L	K	E	Q	S	P	C	P	S	L	G	R	A	E	G	G	515		
hASIC1B	542	T	Y	A	N	I	L	P	H	H	F	A	R	G	T	-	-	F	E	D	F	T	C	562				
hASIC4	516	V	S	S	L	L	P	N	H	H	H	P	H	G	P	P	G	G	L	F	E	D	F	A	C	539		

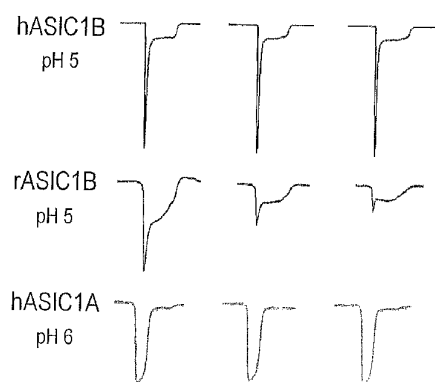
Fig 4 (cont.)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

13/16

**Fig 5**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008448

PCT/CA02/01120

14/16

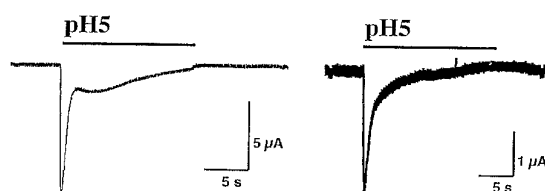


Fig 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

15/16

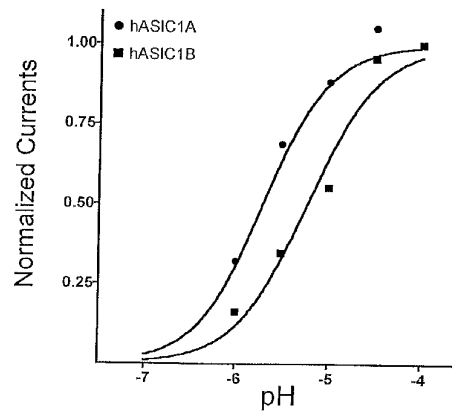


Fig 7

16/16

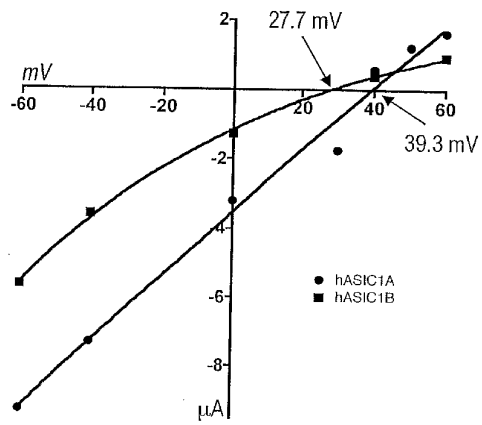


Fig 8

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008448 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/705, 16/28, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/68,
C12Q 1/68Naima [CA/CA]; 6235 Noyelles Street, Saint-Leonard,
Quebec H1P 1K3 (CA). CATARSI, Stefano [CA/CA];
3470 Simpson Street, Apt. #206, Montreal, Quebec H3G
2J5 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA02/01120

(74) Agents: DUBUC, J. et al.; Goudreau Gage Dubuc, Stock
Exchange Tower, Suite 3400, 800 Place Victoria, P.O. Box
242, Montreal, Quebec H4Z 1E9 (CA).

(22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

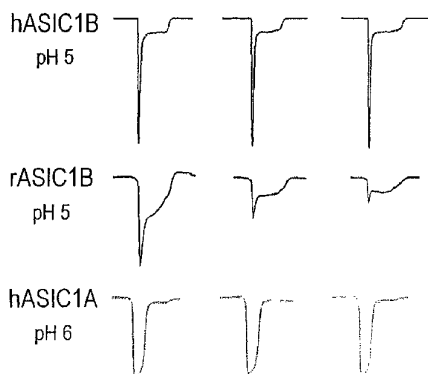
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 2,352,702 18 July 2001 (18.07.2001) CA

(71) Applicant (for all designated States except US): MCGILL
UNIVERSITY [CA/CA]; 3550 University Street, Mon-
treal, Quebec H3A 2A7 (CA).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL HUMAN PROTON-GATED CHANNELS



(57) Abstract: The present invention provides a novel human proton-gated ion channel (hASIC1B) and polynucleotides which identify and encode hASIC1B. The invention also provides genetically engineered expression vectors and host cells comprising the nucleic acid sequences encoding hASIC1B and a method for producing hASIC1B. The invention also provides for use of hASIC1B, and agonists, antibodies or antagonists specifically binding hASIC1B, in the prevention and treatment of diseases associated with expression of hASIC1B. Additionally, the invention provides for the use of antisense molecules to polynucleotides encoding of hASIC1B for the treatment of diseases associated with the expression of hASIC1B. The invention also provides diagnostic assays, which utilize the polynucleotides, or fragments or the complements thereof, and antibodies specifically binding hASIC1B.

WO 03/008448 A3

WO 03/008448 A3 

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:
30 May 2003

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/01120
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 A61K38/17 A61K48/00 G01N33/68 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, EMBL, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, MEDLINE, SCISEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 11784 A (ENGLAND STEVE ;UNIV LONDON (GB); CHEN CHIH CHENG (GB); AKOPIAN ARM) 11 March 1999 (1999-03-11) claims; examples 3,4	1-19,22
X	WO 98 35034 A (HEURTEAUX CATHERINE ;CHAMPIGNY GUY (FR); LINGUEGLIA ERIC (FR); WAL) 13 August 1998 (1998-08-13) SEQ ID N°1,4 page 34 -page 37; claims --- -/-	1-19,22
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 February 2003		Date of mailing of the international search report 13/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pilat, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. Application No. PCT/CA 02/01120
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN CC ET AL: "A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 95, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 10240-10245, XP002086506 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-19,22
X	BAESSLER EVA-LOTTA ET AL: "Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 36, 7 September 2001 (2001-09-07), pages 33782-33787, XP002232758 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-19,22
X	GARCIA-ANOVEROS J ET AL: "BNAC1 AND BNAC2 CONSTITUTE A NEW FAMILY OF HUMAN NEURONAL SODIUM CHANNELS RELATED TO DEGENERINS AND EPITHELIAL SODIUM CHANNELS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 94, no. 4, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 1459-1464, XP002051359 ISSN: 0027-8424 hBNAC2	4,5,7,8
X	DATABASE EMBL 'Online! EMBL; 14 March 2000 (2000-03-14) MUZY ET AL.: "Homo sapiens 12 BAC RP11-469H8 complete sequence" retrieved from EBI Database accession no. AC025154 XP002232759 abstract	4,5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/CA 02 /01120

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20,21,23,24

Present claims 20,21,23,24 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely agonizing or antagonizing the effect of HASIC1B.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, no search has been carried out for these claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	Into national application No. PCT/CA 02/01120
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 16,17 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: 20,21,23,24 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/CA 02/01120

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911784	A	11-03-1999	AU 8876098 A	22-03-1999
			WO 9911784 A1	11-03-1999
			ZA 9807855 A	28-02-2000
WO 9835034	A	13-08-1998	FR 2759372 A1	14-08-1998
			FR 2759373 A1	14-08-1998
			EP 0977844 A1	09-02-2000
			WO 9835034 A1	13-08-1998
			JP 2001514487 T	11-09-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10 1 0 3	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	4 C 0 8 6
A 6 1 P 15/08	A 6 1 P 15/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705 Z N A	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 5/00 A	
// A 6 1 K 31/7088	C 1 2 N 5/00 B	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 39/395 D	
	A 6 1 K 39/395 N	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 セグエラ, フィリップ

カナダ国 エイチ 2 ヴイ 4 ビー 5 ケベック, オートレモント, ダヴァー 8 9 0

(72)発明者 バビンスキ, カジミヤーズ

カナダ国 エイチ 9 エス 1 エイチ 4 ケベック, ドーヴァル, バークレイ サークル 3 6 4

(72)発明者 アバディ, ナイマ

カナダ国 エイチ 1 ピー 1 ケイ 3 ケベック, セイントーレオナルド, ノイエレス ストリート 6 2 3 5

(72)発明者 カターシ, ステファノ

カナダ国 エイチ 3 ジー 2 ジェイ 5 ケベック, モントリオール, シンプソン ストリート 3 4 7 0, アパートメント # 2 0 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA01 DA02 GA01 GA11 HA20

4B063 QA18 QQ79 QQ91 QR77 QS24 QS36 QX04

4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084	AA13	BA02	BA22	BA23	BA44	NA14	ZA01	ZA02	ZA05	ZA06
	ZA08	ZA12	ZA15	ZA16	ZA18	ZA36	ZA42	ZA45	ZA53	ZA59
	ZA94	ZB22	ZB26	ZC35						
4C085	AA13	AA14	BB17	CC21	DD88	EE01				
4C086	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA01	ZA02	ZA05	ZA06	ZA08
	ZA12	ZA15	ZA16	ZA18	ZA36	ZA42	ZA45	ZA53	ZA59	ZA94
	ZB22	ZB26	ZC35							
4H045	AA10	AA11	BA10	CA40	DA50	DA76	EA20	EA50	FA74	