



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 10 989 T2** 2006.12.14

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 421 377 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/48** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 10 989.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP02/08761**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 748 870.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/014731**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.08.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.02.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.05.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.04.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(30) Unionspriorität:

924125 07.08.2001 US

(73) Patentinhaber:

Euroscreen S.A., Brüssel/Brussels, BE

(74) Vertreter:

**Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80331
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**COMMUNI, Didier, B-1700 Dilbeek, BE; SUAREZ,
Nathalie, B-1070 Bruxelles, BE; DETHEUX, Michel,
B-7000 Mons, BE; BREZILLON, Stephane, B-1000
Bruxelles, BE; LANNOY, Vincent, B-5310 Liernu,
BE; PARMENTIER, Marc, B-1650 Beersel, BE;
BOEYNAEMS, Jean-Marie, B-1780 Wemmel, BE**

(54) Bezeichnung: **DER LIGAND FÜR DEN G-PROTEIN GEKOPPELTEN REZEPTOR GPR86 UND SEINE VERWEN-
DUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft den natürlichen Liganden für den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR86 und Verfahren seiner Verwendung.

[0002] Adenin- und Uridinnukleotide induzieren pharmakologische und physiologische Reaktionen über mehrere G-Protein gekoppelte Rezeptoren (P2Y) und ligandengesteuerte Kationenkanäle (P2X) (1, 2). Die P2Y-Familie umfasst zwei selektive Purinrezeptoren: Die humanen P2Y-P2Y₁₁-Rezeptoren, die vorzugsweise von ADP beziehungsweise ATP aktiviert werden (3–5). Nukleotidrezeptoren, die auf sowohl Adenin- als auch Uracilnukleotide reagieren, sind der P2Y₂-Rezeptor, der gleichermaßen von ATP und UTP (6, 7) aktiviert wird sowie der P2Y₈-Rezeptor von *Xenopus* (8) und der tp2y-Rezeptor aus dem Truthahn (9), die in gleicher Weise von allen Triphosphatnukleotiden aktiviert werden. Es gibt auch Pyrimidinrezeptoren: Der P2Y₃-Rezeptor aus dem Hühnchen (10) und der humane P2Y₆-Rezeptor (11–13) werden vorzugsweise von UDP aktiviert, und der humane P2Y₄-Rezeptor (13–15) wird vorzugsweise von UTP aktiviert. Alle diese P2Y-Subtypen sind mit dem Phosphoinositid-Reaktionsweg gekoppelt. Die P2Y₁-beziehungsweise tp2y-Rezeptoren sind darüber hinaus an die Stimulierung und Inhibierung der Adenylzyklase gekoppelt. Andere Rezeptoren (P2Ys (16), P2Y (17), P2Y₉ und P2Y₁₀) wurden fälschlicherweise in die P2Y-Familie miteingerechnet (18–20). Kürzlich wurde ein P2Y₁₂-Subtyp kloniert, der dem Blutplättchen-ADP-Rezeptor, der vormals P_{2T} genannt wurde, entspricht (21, 22). Er ist mit einer Inhibierung der Adenylzyklase gekoppelt und wird spezifisch in den Blutplättchen und im Gehirn exprimiert. Seine Primärstruktur ist nicht mit der der anderen P2Y-Rezeptoren verwandt; sie ist jedoch verwandt mit der des UDP-Glukose-Rezeptors (23).

[0003] Mehr als 300 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wurden bislang kloniert, und es wird im Allgemeinen angenommen, dass weit mehr als 1000 solcher Rezeptoren existieren. Mechanistisch gesehen, wirkt in etwa 30–50 % aller klinisch relevanten Wirkstoffe durch die Modulation der Funktionen verschiedener GPCRs (34).

[0004] Bekannte und unbekannte GPCRs stellen nunmehr wichtige Ziele für Wirkstoffwirkung und Wirkstoffentwicklung dar.

[0005] GPR86 ist ein Mitglied der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptorfamilie und wurde 1997 kloniert (24). Er zeigt eine Homologie von 49 % mit dem kürzlich identifizierten Blutplättchen-ADP-Rezeptor P2T.

[0006] Dem identifizierten offenen Leseraster (ORF) von 1002 bp Länge dieses Rezeptors geht 18 bp stromaufwärts ein Stoppkodon voraus, und das putative Poly(A)-Signal AATAAA befindet sich 1672 bp stromabwärts der kodierenden Sequenz. hGPR86 weist dieselbe genomische Lokalisierung auf Chromosom 3q24 wie hGPR87 auf, aber im Gegensatz zu hGPR87 ist seine kodierende Sequenz intronlos. Die abgeleitete 333 Aminosäurereste lange Sequenz von hGPR86 zeigt die typische 7-Transmembran (7TM)-Struktur eines GPCR und besitzt kein Signalpeptid. Er weist im Wesentlichen dieselben Motive auf, wie sie für GPR87 und KIAA0001 beschrieben sind und ist daher ebenfalls ein Mitglied der Familie 1-GPCRs. Anstelle des DRY-Motivs gibt es ein DRF-Motiv, das man auch in den Sequenzen von purinergen Rezeptoren, den C5A- und Bonzo-Rezeptoren und den Vorläufern des Thrombinrezeptors sehen kann.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft den GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor (im Folgenden als SEQ ID NO:1 identifiziert) (oder jede andere homologe Sequenz) und eine rekombinante Zelle (die mit einem geeigneten Vektor transformiert wurde), welche die Nukleotidsequenz umfasst, die den Rezeptor kodiert, sowie die natürlichen Liganden (ADP und äquivalente Moleküle wie 2MeSADP, ADPβS einschließlich jedes ADP-Analogons, die in US Pat. Nr. 5,700,786 präsentiert sind), die in Durchmusterungsassays zur Identifizierung von Agonisten, inversen Agonisten oder antagonistischen Verbindungen verwendet werden sollen, die nützlich sind für die Entwicklung neuer Wirkstoffe und die Verbesserung verschiedener Erkrankungsdiagnostiken.

[0008] Eine homologe Sequenz (die in anderen Säugetierarten oder spezifischen Gruppen von humanen Populationen vorliegen kann), wo Homologie Sequenzidentität anzeigt, bedeutet eine Sequenz, die eine hohe Sequenzidentität (mehr als 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % oder 98 % Sequenzidentität) mit der vollständigen humanen Nukleotid- oder Aminosäuresequenz, die nachfolgend beschrieben werden, und ist vorzugsweise durch dieselbe Pharmakologie gekennzeichnet, insbesondere durch eine Bevorzugung der Bindung an ADP >> IDP > UDP (die Affinität von ADP für GPR86 war etwa 1000-fach größer als die von IDP und UDP (ADP > IDP > UDP)).

[0009] Die erfindungsgemäße rekombinante Zelle ist eine rekombinante Zelle, die mit einem Plasmid oder vi-

ralen Vektor transformiert wurde, beispielsweise einem Baculovirus, einem Adenovirus, einem Semliki-Forest-Virus, und die Zelle kann ausgewählt werden aus bakteriellen Zellen, Hefezellen, Insektenzellen oder Säugtierzellen.

[0010] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Zelle aus COS 7-Zellen, einer CHO-Zelle, einer LM (TK-) Zelle, einer NIH 3T3-Zelle, HEK 293-Zelle, K 562-Zelle oder einer 1321N1-Astrocytom-Zelle, aber auch anderen transfizierbaren Zelllinien ausgewählt. Der Vektor kann all diejenigen regulatorischen Elemente, die mit der Polynukleotidsequenz, die den erfindungsgemäßen Rezeptor kodiert, funktional verbunden sind, umfassen, so dass sie seine Expression erlauben.

[0011] Wie dem Fachmann offensichtlich sein wird, kann gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung GPR86 in Zellmembranen vorliegen.

[0012] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines spezifischen, aktiven Anteils der Sequenzen. Wie hierin verwendet, betrifft ein „aktiver Anteil“ einen Anteil einer Sequenz, der eine ausreichende Größe aufweist, um eine normale oder beinahe normale Pharmakologie aufzuweisen (z.B. Rezeptoraktivität (wie sie hierin definiert ist), die Reaktion auf einen Aktivator oder Inhibitor oder die Ligandenbindung betragen wenigstens 90 % des Aktivitätsniveaus, der Reaktion oder Bindung, die ein wildtypischer Rezeptor aufweist). „Ein Anteil“, wie er eine Sequenz, die einen Rezeptor kodiert, betrifft, betrifft weniger als 100 % der Sequenz (d.h. 99, 90, 80, 70, 60, 50 % etc.). Der aktive Anteil könnte ein Rezeptor sein, der eine partielle Deletion der vollständigen Nukleotid- oder Aminosäuresequenz umfasst und der immer noch die aktive Stelle(n) und Proteindomäne(n) aufweist, die für die Bindung von und Interaktion mit einem spezifischen Liganden wie ADP notwendig ist/sind.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform der Verfahren, die hierin beschrieben sind, wird das In-Berührung-Bringen in oder auf synthetischen Liposomen (siehe Tajib Mirzabekov, Harry Kontos, Michael Farzan, Wayne Marasco, Joseph Sodroski (2000): Paramagnetic proteoliposomes containing a pure, native, and oriented seven-transmembrane segment protein, CCR5; Nature Biotechnology 18, 649–654) oder Virus-induzierten Knospungsmembranen, die ein GPR86-Polypeptide enthalten, ausgeführt (siehe Patentanmeldung WO 010255: Virus-like particles, their Preparation and their Use preferably in Pharmaceutical Screening and Functional Genomics (2001)).

[0014] Daher wird man verstehen, dass gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung GPR86 in einer Zelle vorliegt oder mit einer Zeller assoziiert sein kann, beispielsweise den Zellen, die oben beschrieben sind, Zellmembranen oder in oder auf Virus-induzierten Knospungsmembranen.

[0015] Wie hierin verwendet, betrifft „Ligand“ eine Einheit, die in der Lage ist, mit einem Rezeptor zu assoziieren oder an einen Rezeptor zu binden. Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren weisen ein Ligand und ein Rezeptor eine Bindungskonstante auf, die ausreichend stark ist, um die Bindung durch ein Assay-Verfahren nachzuweisen, das für den Nachweis einer Ligandenbindung an einen Rezeptor geeignet ist (z.B. ein Sekundärer-Botenstoff-Assay, um einen Anstieg oder ein Abfall in der Herstellung eines sekundären Botenstoffs in Reaktion auf Ligandenbindung an den Rezeptor nachzuweisen, ein Bindungsassay, um eine Protein-Liganden-Bindung zu messen oder ein Immunoassay, um Antikörper-Antigen-Interaktionen zu messen). Ein Ligand gemäß der vorliegenden Erfindung beinhaltet das tatsächliche Molekül, das an einen Rezeptor bindet (z.B. ist ADP ein Ligand für GPR86), oder ein Ligand kann jedes Nukleotid, jeder Antikörper, jedes Antigen, jedes Enzym, jedes Peptid, jedes Polypeptid oder jede Nukleinsäure sein, die/das in der Lage ist, an den Rezeptor zu binden. Ein Ligand kann ein Nukleotid sein, kann jedoch auch ein Polypeptid, ein Peptid oder eine Nukleinsäuresequenz beinhalten. Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren binden ein Ligand und Rezeptor spezifisch aneinander (z.B. mittels kovalenter Bindungen oder Wasserstoffbrücken-Bindung oder mittels einer Interaktion zwischen beispielsweise einem Protein und einem Liganden, einem Antikörper und einem Antigen oder Proteinuntereinheiten).

[0016] Wie hierin verwendet, betrifft „ADP“ ein Nukleotid, das durch Hydrolyse des endständigen Phosphats von ATP entsteht und eine Struktur aufweist, die Adenin, Ribose und zwei Phosphatgruppen umfasst ([Fig. 7](#)). Man geht davon aus, dass Analoga von ADP als ADP-Äquivalente betrachtet werden. ADP-Analoga gemäß der Erfindung beinhalten 2MeSADP, ADP β S, sind aber nicht darauf beschränkt. Ein ADP-Analogon gemäß der vorliegenden Erfindung wird dieselbe Grundstruktur wie ADP, wie sie oben definiert und in [Fig. 7](#) dargestellt ist, aufweisen sowie einen oder mehrere andere Substitutionsgruppen, die jeden der ADP-Analoga, die in US Pat. Nr. 5,700,786 dargestellt sind, beinhalten, aber nicht darauf beschränkt sind. Ein ADP-Analogon gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Bindung an GPR86 aufweisen, die zu ADP äquivalent ist.

[0017] Wie hierin verwendet, betrifft „GPR-Aktivität“ die Aktivität eines Rezeptors, der die in [Fig. 1](#) dargestellte Sequenz oder eine Sequenz aufweist, die wenigstens 70 % Identität (zum Beispiel 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 % etc.) mit der in [Fig. 1](#) dargestellten Sequenz aufweist. Ein Rezeptor, der „GPR-Aktivität“ aufweist, wird ADP mit einer Affinität binden, die wenigstens 100-fach oder 500-fach oder sogar 1000-fach größer ist, als die von IDP und UDP (ADP > IDP > UDP).

[0018] Homologe Sequenzen einer Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung kann eine Aminosäure- oder Nukleotidsequenz beinhalten, die einen ähnlichen Rezeptor kodiert, der in anderen Säugetieren, beispielsweise anderen Tierarten (Ratte, Maus, Katze, Hund, etc.) oder in spezifischen humanen Populationsgruppen existiert, der jedoch an dem selben biochemischen Reaktionsweg beteiligt ist. In ähnlicher Weise zieht die vorliegende Erfindung Orthologe in Erwägung, die per definitionem Gene in zwei unterschiedlichen Arten sind, die aus einem einzelnen Gen in ihrem gemeinsamen historischen Vorgänger entstanden sind. Bei Orthologen ist es wahrscheinlich, dass sie dieselbe Funktion in beiden Arten aufweisen.

[0019] Solche homologen Sequenzen können Additionen, Deletionen oder Substitutionen einer/eines oder mehrerer Aminosäure(n) oder Nukleotid(s)e umfassen, die die funktionalen Charakteristika des erfindungsgemäßigen Rezeptors nicht wesentlich verändern, beispielsweise die Bindung eines Liganden an den Rezeptor.

[0020] Solche homologen Sequenzen können auch Nukleotidsequenzen von mehr als 400, 600, 800 oder 1000 Nukleotiden sein, die in der Lage sind, an die gesamte humane Sequenz unter stringenten Hybridisierungsbedingungen zu hybridisieren (wie diejenigen, die in Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York, beschrieben sind).

[0021] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchmusterung, zum Nachweis und zur möglichen Wiedergewinnung von Kandidatenmodulatoren eines Rezeptors der vorliegenden Erfindung, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: In-Berührung-Bringen einer Zelle, die GPR86 exprimiert, mit ADP in Anwesenheit des Kandidatenmodulators unter Bedingungen, welche die Bindung von ADP an GPR86 erlauben, Ausführen eines Sekundärer-Botenstoff-Assays und Vergleichen der Ergebnisse des Sekundärer-Botenstoff-Assays, die in Anwesenheit und in Abwesenheit des Kandidatenmodulators erhalten wurden.

[0022] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchmusterung, zum Nachweis und zur möglichen Wiedergewinnung von Kandidatenmodulatoren eines Rezeptors der vorliegenden Erfindung, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: In-Berührung-Bringen einer Zellmembran, die GPR86 exprimiert, mit ADP unter Bedingungen, welche die Bindung von ADP an GPR86 erlauben, Ausführen eines Sekundärer-Botenstoff-Assays und Vergleichen der Ergebnisse des Sekundärer-Botenstoff-Assays, die in Anwesenheit und in Abwesenheit des Kandidatenmodulators erhalten wurden.

[0023] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung eines Agens, das die Funktion von GPR86 moduliert, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) In-Berührung-Bringen eines GPR86-Polypeptids mit ADP in Anwesenheit oder in Abwesenheit eines Kandidatenmodulators unter Bedingungen, die die Bindung von ADP an das GPR86-Polypeptid erlauben; und b) Messen der Bindung des GPR86-Polypeptids an den Kandidatenmodulator, relativ zur Bindung in Abwesenheit des Kandidatenmodulators, wodurch der Kandidatenmodulator als ein Agens identifiziert wird, das die Funktion von GPR86 moduliert.

[0024] In einer weiteren Ausführungsform wird ein Kandidatenmodulator, Agens oder eine Verbindung ausgewählt aus einem natürlichen oder synthetischen Peptid, einem Polypeptid, einem Antikörper oder einem Antigen bindenden Fragment davon, einem Lipid, einem Kohlenhydrat, einer Nukleinsäure und einem kleinen organischen Molekül.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Schritt des Nachweises oder der Messung einer Signalaktivität des GPR86-Polypeptids den Nachweis einer Veränderung des Niveaus eines sekundären Botenstoffs.

[0026] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft den Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität, unbekannte agonistische und/oder antagonistische Verbindungen, die gemäß einem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhältlich sind, identifiziert und/oder wiedergewonnen werden, sowie einen diagnostischen Kit, der die (unbekannten) Verbindungen umfasst, oder eine pharmazeutische Zusammensetzung (einschließlich eines Vakzins), die einen adäquaten pharmazeutischen Träger und eine ausreichende Menge der (unbekann-

ten) Verbindung umfasst.

[0027] Man versteht, dass ein Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität ATP, 2MeSADP, ADP β S, 2MeSATP, Ap3A, RB-2, Suramin oder PPADS beinhaltet, jedoch nicht darauf beschränkt ist.

[0028] Eine antagonistische Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung bedeutet ein Molekül oder eine Gruppe von Molekülen, die in der Lage sind, an den erfindungsgemäßen Rezeptor zu binden und die Bindung von natürlichen Verbindungen wie ADP oder ein äquivalentes Molekül, zum Beispiel 2MeSADP, ADP β S, ATP, 2MeSATP oder Ap3A einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, eines der ADP-Analoga, die in US Pat. Nr. 5,700,786 präsentiert sind, zu blockieren oder zu vermindern. Antagonistische Verbindungen der vorliegenden Erfindung beinhalten RB-2, Suramin oder PPADS, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0029] Die Erfindung umfasst weiter ein Verfahren, die Anwesenheit eines Agens in einer Probe nachzuweisen, das die Funktion des GPR86 moduliert, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) In-Berührung-Bringen eines GPR86-Polypeptids mit der Probe; b) Nachweisen einer Signalaktivität des GPR86-Polypeptids in Anwesenheit der Probe; und c) Vergleichen der in Anwesenheit der Probe gemessenen Aktivität mit der Aktivität, die in einer Reaktion mit GPR86-Polypeptid und ADP bei einer EC₅₀ gemessen wurde, wobei ein Agens, das die Funktion von GPR86 moduliert, nachgewiesen wird, wenn die Menge der GPR86-spezifischen Aktivität, die in Anwesenheit der Probe gemessen wurde, wenigstens 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % oder mehr der Aktivität beträgt, die von der Menge von ADP induziert wird, die bei seiner EC₅₀ vorliegt.

[0030] Die Erfindung umfasst weiter ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) In-Berührung-Bringen einer Gewebeprobe mit einem Antikörper, der für ein GPR86-Polypeptid spezifisch ist; b) Nachweisen der Bindung des Antikörpers an die Gewebeprobe; und c) Vergleichen der Bindung, die in Schritt b) nachgewiesen wurde, mit einem Standard, wobei eine Differenz in der Bindung relativ zum Standard eine Erkrankung oder Störung, die von einer Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostiziert.

[0031] Die Erfindung umfasst weiter ein Verfahren zur Diagnostizierung einer Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) In-Berührung-Bringen einer Gewebeprobe mit einem Antikörper, der für einen GPR86-Liganden spezifisch ist; b) Nachweisen der Bindung des Antikörpers an die Gewebeprobe; und c) Vergleichen der Bindung, die in Schritt b) nachgewiesen wird, mit einem Standard, wobei eine Differenz in der Bindung relativ zum Standard eine Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet wird, diagnostiziert.

[0032] Die Erfindung umfasst ferner ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) In-Berührung-Bringen einer Gewebeprobe mit einem Antikörper, der für ein GPR86-Polypeptid spezifisch ist, und einem Antikörper, der für einen GPR86-Liganden spezifisch ist; b) Nachweisen der Bindung der Antikörper an die Gewebeprobe, und c) Vergleichen der Bindung, die in Schritt b) nachgewiesen wurde, mit einem Standard, wobei eine Differenz in der Bindung jedes einzelnen Antikörpers oder beider Antikörper relativ zum Standard eine Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostiziert.

[0033] Die Erfindung umfasst ferner ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) Isolieren von Nukleinsäure aus einer Gewebeprobe; b) Amplifizieren eines GPR86-Polynukleotids unter Verwendung der Nukleinsäure als Matrice; und c) Vergleichen der Menge oder der Sequenz des amplifizierten GPR86-Polynukleotids, das in Schritt b) hergestellt wurde, mit einem Standard, wobei eine Differenz der Menge oder Sequenz des GPR86-Polynukleotids relativ zum Standard eine Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostiziert.

[0034] Die Erfindung umfasst ferner ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) Isolieren von Nukleinsäure aus einer Gewebeprobe; b) Amplifizieren eines Polynukleotids, das einen GPR86-spezifischen Polypeptidliganden kodiert unter Verwendung der Nukleinsäure als Matrice; und c) Vergleichen der Menge oder der Sequenz des amplifizierten GPR86-spezifischen Ligandenpolynukleotids, das in Schritt b) hergestellt wurde, mit einem Standard, wobei eine Differenz in der Menge oder der Sequenz des

amplifizierten GPR86-spezifischen Ligandenpolynukleotids relativ zum Standard eine Erkrankung oder Störung, die von einer Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostiziert.

[0035] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Schritt der Amplifikation RT/PCR. In einer weiteren Ausführungsform ist der Standard SEQ ID NR:1. In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Schritt des Vergleichens der Sequenz Minisequenzierung. In einer weiteren Ausführungsform wird der Schritt des Vergleichens der Sequenz und der Menge auf einem Mikroarray ausgeführt.

[0036] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein transgenes, nicht humanes Säugetier, das eine homologe Rekombination (Knock-Out) des Polynukleotids umfasst, das den erfindungsgemäßen GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor kodiert, oder ein transgenes, nicht humanes Säugetier, welches das Polypeptid über dem natürlichen Expressionsniveau überexprimiert. Wie hierin verwendet, betrifft „über dem natürlichen Expressionsniveau“ ein Niveau, das wenigstens 2-fach oder 5-fach oder 10-fach oder sogar 100-fach oder mehr (d.h. 150-fach, 200-fach, 250-fach, 500-fach, 1000-fach, 10000-fach, etc.) im Vergleich zum Expressionsniveau des endogenen Rezeptors. Ein transgenes, nicht humanes Säugetier kann mittels eines Verfahrens erhalten werden, dass dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt ist, beispielsweise wie in Dokument WO 98/20112 beschrieben, unter Verwendung der klassischen Technik, die auf der Transfektion embryonaler Stammzellen beruht, vorzugsweise gemäß des Verfahrens, wie es von Carmeliet et al. (Nature, Vol. 380, S. 435–439, 1996) beschrieben wurde.

[0037] „Gen-Targeting“ ist eine An homologer Rekombination, die auftritt, wenn ein Fragment genomischer DNA in eine Säugetierzelle eingeführt wird und das Fragment in endogene homologe Sequenzen zu liegen kommt und mit diesen rekombiniert, wie dies in US Pat. Nr. 5,464,764 und US Pat. Nr. 5,777,195 beispielhaft dargestellt ist. Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „transgenes Tier“ ein nicht humanes Tier, in dem eine oder mehrere, oder im Wesentlichen alle Zellen des Tieres ein Transgen enthalten, das durch eine vom Menschen ausgeführte Handlung, beispielsweise durch im Stand der Technik bekannte Transgentechniken, eingeführt wurde. Das Transgen kann in die Zelle direkt oder indirekt eingeführt werden, indem es in einen Vorläufer der Zelle mittels gezielter genetischer Manipulation, beispielsweise durch Mikroinjektion oder durch Infektion mit einem rekombinanten Virus, eingeführt wird.

[0038] Das transgene, nicht humane Säugetier, das das Polynukleotid überexprimiert, welches den erfindungsgemäßen GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor kodiert, umfasst das Polynukleotid inkorporiert in einem DNA-Konstrukt mit einem induzierbaren Promotor, der die Überexpression des Rezeptors erlaubt, und möglicherweise auch mit Gewebe- und Zell-spezifischen regulatorischen Elementen.

[0039] Dementsprechend betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein nicht humanes Säugetier, das eine partielle oder vollständige Deletion der orthologen Sequenz des humanen Polynukleotids (SEQ ID NR:1) umfasst, beispielsweise ein nicht humanes Säugetier, das einen homologen rekombinanten Knock-Out des Polynukleotids umfasst, oder ein transgenes nicht humanes Säugetier, das das Polynukleotid über dem natürlichen Niveau überexprimiert.

[0040] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Antikörper und seine verschiedenen Verwendungen, der für ein GPR86-Polypeptid spezifisch ist, sowie einen Antikörper und seine Verwendungen, der für einen Modulator der GPR86-Aktivität spezifisch ist.

[0041] Das erfindungsgemäße Diagnosekit beinhaltet wenigstens einen GPR86-Rezeptor und getrennt verpackt, ADP und kann auch möglicherweise alle notwendigen Mittel und Medien umfassen, um einen Nachweis spezifischer Bindung (zum Beispiel von ADP) an den erfindungsgemäßen GPR86-Rezeptor auszuführen und gegebenenfalls den Nachweis spezifischer Bindung mit einem Verfahren der Überwachung eines oder mehrerer der Symptome der nachfolgend beschriebenen Erkrankungen zu korrelieren. Darüber hinaus kann das erfindungsgemäße Kit weitere Bestandteile eines Assays für sekundäre Botenstoffe umfassen.

[0042] Gegebenenfalls umfasst das Kit Elemente für eine spezifische Diagnostik oder Dosierung solcher gebundener Verbindungen mittels Hochdurchsatz-Durchmusterungstechniken, die dem Fachmann wohlbekannt sind, insbesondere diejenige, die in WO 00/02045 beschrieben ist. Die Hochdurchsatz-Durchmusterung einer diagnostischen Dosierung und Überwachung kann unter Verwendung verschiedener fester Träger, beispielsweise Mikrotiterplatten oder Biochips ausgeführt werden, die vom Fachmann ausgewählt werden.

[0043] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung den Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität, wie er hierin beschrieben ist, oder den Antikörper, wie er hierin beschrieben ist, zur Verwendung als eine

pharmazeutische Zusammensetzung oder ein Medikament zur Prävention, Behandlung und/oder Milderung von Erkrankungen oder Störungen, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet sind. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung des Kandidatenmodulators der GPR86-Aktivität, wie er hierin beschrieben ist, oder den Antikörper, wie er hierin beschrieben ist, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Medikaments zur Prävention, Behandlung und/oder Milderung von Erkrankungen oder Störungen, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet sind.

[0044] In der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung ist der adäquate pharmazeutische Träger ein Träger in fester, flüssiger oder gasförmiger Form, der vom Fachmann gemäß der Art der Verabreichung und gemäß den möglichen Nebenwirkungen der erfindungsgemäßen Verbindung ausgewählt werden kann. Das Verhältnis zwischen dem pharmazeutischen Träger und der spezifischen Verbindung kann vom Fachmann gemäß dem behandelten Patienten, der Verabreichung und den möglichen Nebenwirkungen der Verbindung sowie in Abhängigkeit von der Art der Erkrankung oder Störung, die behandelt oder einer spezifischen Prävention unterworfen wird, ausgewählt werden.

1. Die pharmazeutische Zusammensetzung findet ihre vorteilhaften Anwendungen auf dem Gebiet der Behandlung und/oder Prävention von verschiedenen Erkrankungen oder Störungen, die gegebenenfalls ausgewählt werden aus Knochenhypertrophie, Migräne, Erbrechen, psychotischen und neurologischen Störungen einschließlich Angstzustände, Schizophrenie, manischer Depression, Depression, Delirium, Demenz und ernster mentaler Retardation, degenerativen Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer Erkrankung oder M. Parkinson, und Dyskinesien wie Chorea Huntington oder Gilles de la Tourette-Syndrom, und anderen verwandten Erkrankungen einschließlich Thrombose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmun- und Entzündungserkrankungen.

2. Unter den genannten Erkrankungen der Anmeldung sind, beispielsweise, in Bezug auf therapeutische Agenzien, die an 7-TM-Rezeptoren angreifen, die eine Funktion in der Prävention, Verbesserung oder Korrigierung von Fehlfunktionen oder Erkrankungen spielen können, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Fruchtbarkeit, Fötusentwicklung, Infektionen wie bakterielle, pilzliche, protozoische und virale Infektionen, einschließlich Infektionen, die von HIV1 und HIV2 verursacht werden, Schmerz, Krebs, Anorexie, Bulimie, Asthma, Parkinson, akutes Herzversagen, Bluthochdruck, Harnverhaltung, Osteoporose, Angina pectoris, Myokardinfarkt, Geschwüre, Asthma, Allergien, gutartige Prostatahypertrophie, psychotische und neurologische Störungen einschließlich Ängstlichkeit, Depression, Migräne, Erbrechen, Schlaganfall, Schizophrenie, manische Depression, Delirium, Demenz, schwere mentale Retardation und Dyskinesien, wie Chorea Huntington oder Gilles de la Tourette-Syndrom, einschließlich Thrombose und andere kardiovaskuläre Erkrankungen, Autoimmun- und Entzündungserkrankungen.

[0045] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei das Verfahren den Schritt der Vermischung des erfindungsgemäßen Kandidatenmodulators oder des erfindungsgemäßen Antikörpers mit einem pharmazeutischen Träger umfasst.

[0046] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Zusammensetzung, die den Kandidatenmodulator, wie er hierin beschrieben ist, umfasst, beispielsweise ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP β S, Ap3A, RB-2, Suramin oder PPADS, oder den Antikörper, wie er hierin beschrieben ist.

[0047] Wie hierin verwendet, ist ein „Antagonist“ ein Ligand, der kompetitiv an den Rezeptor an dieselbe Stelle wie ein Agonist bindet, aber eine intrazelluläre Reaktion, die von einer aktiven Form eines Rezeptors initiiert wird, nicht aktiviert, und dabei die intrazelluläre Reaktion, die von einem Agonisten induziert wird, zum Beispiel ADP um wenigstens 10 % oder 15–25 % oder 25–50 % oder 50–100 % im Vergleich zu der intrazellulären Reaktion in Gegenwart eines Agonisten und in Abwesenheit eines Antagonisten inhibiert.

[0048] Wie hierin verwendet, betrifft ein „Agonist“ einen Liganden, der eine intrazelluläre Reaktion aktiviert, wenn er an einen Rezeptor in Konzentrationen bindet, die den ADP-Konzentrationen entsprechen, oder geringer sind, die eine intrazelluläre Reaktion induzieren. Ein erfindungsgemäßer Agonist kann die intrazelluläre Reaktion, die von einem Rezeptor vermittelt wird, um wenigstens das 2-fache oder 5-fache oder 10-fache oder 100-fache oder mehr (d.h. das 150-fache, 200-fache, 250-fache, 500-fache, 1000-fache, 10000-fache, etc.) erhöhen im Vergleich zu der intrazellulären Reaktion in Abwesenheit eines Agonisten. Ein Agonist kann gemäß der vorliegenden Erfindung die Internalisierung eines Zelloberflächenrezeptors solchermaßen abschwächen, dass die Expression eines Rezeptors auf der Zelloberfläche um wenigstens das 2-fache oder 5-fache oder 10-fache oder 100-fache oder mehr (d.h. 150-fach, 200-fach, 250-fach, 500-fach, 1000-fach, 10000-fach, etc.) erhöht ist im Vergleich zur Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren, die auf der Oberfläche einer Zelle in Abwesenheit eines Agonisten vorhanden sind. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung stabilisiert ein Ago-

nist einen Zelloberflächenrezeptor und erhöht die Expression eines Rezeptors auf der Zelloberfläche um wenigstens das 2-fache oder 5-fache oder 10-fache oder 100-fache oder mehr (d.h. 200-fach, 250-fach, 500-fach, 1000-fach, 10000-fach, etc.) im Vergleich zur Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren, die auf der Oberfläche einer Zelle in Abwesenheit eines Agonisten vorhanden sind.

[0049] Wie hierin verwendet, betrifft ein „inverser Agonist“ einen Liganden, der eine konstitutive Aktivität eines Zelloberflächenrezeptors abschwächt, wenn er an einen Rezeptor bindet. Ein erfindungsgemäßer inverser Agonist kann die konstitutive intrazelluläre Reaktion, die von einem Rezeptor vermittelt wird, um wenigstens das 2-fache oder 5-fache oder 10-fache oder 100-fache oder mehr (d.h. 150-fach, 200-fach, 250-fach, 500-fach, 1000-fach, 10000-fach, etc.) abschwächen im Vergleich zur intrazellulären Reaktion in Abwesenheit eines inversen Agonisten.

[0050] Eine „Inhibitor“-Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Molekül, das gegen den Rezeptor oder gegen den natürlichen Liganden für den Rezeptor gerichtet ist und das die Bindung des Liganden an den Rezeptor um wenigstens 10 % oder sogar 15–25 % oder sogar 25–50 % und sogar 50–100 % in Anwesenheit von ADP vermindert im Vergleich zur Bindung in Anwesenheit von ADP und in Abwesenheit eines Inhibitors. Eine „Inhibitor“-Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung kann die intrazelluläre Reaktion, die von einem Agonisten induziert wird, zum Beispiel ADP, um wenigstens 10 % oder 15–25 % oder sogar 25–50 % oder sogar 50–100 % abschwächen. Ein „Inhibitor“ betrifft auch eine Nukleotidsequenz, die eine erfindungsgemäße Inhibitorverbindung kodiert.

[0051] Wie hierin verwendet, betrifft ein „natürlicher Ligand“ einen natürlicherweise vorkommenden Liganden, der in der Natur gefunden werden kann, der an einen Rezeptor auf eine Weise bindet, die äquivalent ist zu derjenigen von ADP (d.h. mit einer Affinität für den Liganden, die größer ist als die Affinität von IDP und UDP (ADP > IDP > UDP)). Ein „natürlicher Ligand“ betrifft keinen künstlich hergestellten Liganden, der in der Natur nicht gefunden werden kann und der künstlich hergestellt worden ist, um einen Rezeptor zu binden, wo er es vorher nicht auf eine Weise tat, die, entweder in ihrem Ausmaß oder Art, von derjenigen unterschiedlich ist, für die er künstlich hergestellt worden ist; ein solcher ist nicht mehr natürlich vorkommend, sondern „unnatürlich“ und von einem natürlich vorkommenden Molekül abgeleitet.

[0052] Wie hierin verwendet, betrifft ein „Modulator“ und „ein Agens, das moduliert“, die hierin austauschbar verwendet werden, jede Verbindung, die „moduliert“, d.h. welche die Zelloberflächenexpression eines erfindungsgemäßen Rezeptors steigert oder absenkt, die Bindung eines Liganden an einen erfindungsgemäßen Rezeptor steigert oder absenkt, oder jede Verbindung, welche die intrazelluläre Reaktion, die von einer aktiven Form des erfindungsgemäßen Rezeptors initiiert wird, steigert oder absenkt, entweder in Gegenwart oder Abwesenheit eines Agonisten oder in Anwesenheit eines Liganden für den Rezeptor, zum Beispiel ADP. Ein Modulator beinhaltet einen Agonisten, Antagonisten, Inhibitor oder inversen Agonisten, wie hierin definiert. Ein Modulator kann ein Protein sein, eine Nukleinsäure, ein Antikörper oder Fragment davon, beispielsweise ein Antigen-bindendes Fragment, ein Protein, ein Polypeptid, ein Peptid, ein Lipid, ein Kohlenhydrat, ein kleines anorganisches oder organisches Molekül, etc. Kandidatenmodulatoren können natürliche oder synthetische Verbindungen sein, einschließlich, zum Beispiel, kleine Moleküle, Verbindungen, die in Tier-, Pflanzen-, Bakterien- oder Pilzzellextrakten enthalten sind, sowie im konditionierten Medium solcher Zellen.

[0053] Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „kleines Molekül“ eine Verbindung, die eine Molekularmasse von weniger als 3000 Daltons oder sogar weniger als 2000 oder 1500 oder sogar weniger als 1000 oder sogar weniger als 600 Daltons aufweist. Ein „kleines organisches Molekül“ ist ein kleines Molekül, das Kohlenstoff umfasst.

[0054] Wie hierin verwendet, betreffen die Ausdrücke „Veränderung in der Bindung“ oder „Veränderung in der Aktivität“ und die äquivalenten Ausdrücke „Differenz in der Bindung“ oder „Differenz in der Aktivität“ oder Differenz in der Menge von „amplifiziertem“ PCR-Produkt einen wenigstens 10 %-igen Anstieg oder Abfall in der Bindung relativ zum Standard, oder Signalaktivität oder mRNA-Konzentrationen relativ zum Standard in einem gegebenen Assay.

[0055] Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „Fehlregulation“ die Signalaktivität von GPR86 in einer Probe, wobei:

- a) ein 10 %-iger Anstieg oder Abfall in der Menge von GPR86 oder GPR86-Polypeptidligand-mRNA oder Polypeptidkonzentrationen relativ zum Standard, wie er hierin definiert ist, eines gegebenen Assays gemessen wird, oder;
- b) wenigstens ein einzelner Basenpaaraustausch in der kodierenden Sequenz für GPR86 oder GPR86-Po-

lypeptidligand relativ zum Standard, wie er hierin definiert ist, eines gegebenen Assays nachgewiesen wird und in einer Veränderung der Signalaktivität von GPR wie sie in den Absätzen a), c), oder d) definiert ist, resultiert oder;

c) ein 10 %-iger Anstieg oder Abfall in der Menge der GPR86-Ligandbindungsaktivität relativ zum Standard, wie er hierin definiert ist, eines gegebenen Assays gemessen wird, oder;

d) ein 10 %-iger Anstieg oder Abfall in Assays für sekundäre Botenstoffe, wie sie hierin definiert sind, relativ zum Standard, wie er hierin definiert ist, in einem gegebenen Assay gemessen wird.

[0056] Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „Bedingungen, welche die Bindung von ADP an GPR86 erlauben“ Bedingungen, von beispielsweise Temperatur, Salzkonzentration, pH und Proteinkonzentration, unter welchen ADP GPR86 bindet. Die exakten Bindungsbedingungen werden in Abhängigkeit von der Art des Assays variieren, beispielsweise ob der Assay lebensfähige Zellen oder nur eine Membranfraktion von Zellen verwendet. Allerdings werden bevorzugte Bedingungen, weil GPR86 ein Zelloberflächenprotein ist, im Allgemeinen eine physiologische Salzkonzentration (90 mM) und pH (etwa 7,0 bis 8,0) beinhalten. Bindungstemperaturen können von 15°C bis 37°C variieren, werden jedoch im Allgemeinen zwischen Raumtemperatur und etwa 30°C liegen. Die Konzentration von ADP und GPR86-Polypeptid in einer Bindungsreaktion wird ebenfalls variieren, wird jedoch vorzugsweise von etwa 0,1 nM (z.B. in einer Reaktion mit radioaktiv markiertem Tracer-ADP, wo die Konzentration im Allgemeinen unter dem K_d liegt) bis 1 μ M (z.B. ADP als Kompetitor) reichen.

[0057] Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „Probe“ die Quelle der Moleküle, die auf Anwesenheit eines Agens oder einer Modulatorbindung getestet werden, welche die Bindung an oder die Signalaktivität eines GPR86-Polypeptids moduliert. Eine Probe kann eine Umweltprobe, ein natürlicher Extrakt von Tier-, Pflanzen-, Hefe- oder Bakterienzellen oder – gewebe, eine klinische Probe, eine synthetische Probe oder konditioniertes Medium rekombinanter Zellen oder eines Fermentationsprozesses sein. Der Begriff „Gewebeprobe“ betrifft ein Gewebe, das auf die Anwesenheit, Menge, Qualität oder eine Aktivität eines GPR86-Polypeptids, eine Nukleinsäure, die ein GPR86-Polypeptid kodiert, oder eines Agens oder einer Verbindung, die die Ligandenbindung oder Aktivität eines GPR86-Polypeptids modifiziert oder moduliert, getestet wird.

[0058] Wie hierin verwendet, ist ein „Gewebe“ ein Aggregat von Zellen, das eine besondere Funktion in einem Organismus ausübt. Der Begriff „Gewebe“, wie er hierin verwendet wird, betrifft zelluläres Material von einer besonderen physiologischen Region. Die Zellen in einem besonderen Gewebe können mehrere verschiedene Zelltypen umfassen. Ein nicht beschränkendes Beispiel dessen würde Gehirngewebe sein, das ferner Neurone und Gliazellen umfasst, sowie Kapillarendothelzellen und Blutzellen, die alle in einem gegebenen Gewebeschnitt oder einer Gewebeprobe enthalten sind. Über feste Gewebe hinaus, soll der Begriff „Gewebe“ auch nicht feste Gewebe wie Blut umfassen.

[0059] Wie hierin verwendet, betreffen die Begriffe „Membranfraktion“ und „Zellmembran“ eine Zubereitung zellulärer Lipidmembranen, die ein GPR86-Polypeptid umfassen. Wie der Begriff hierin verwendet wird, ist eine „Membranfraktion“ oder eine „Zellmembran“ von einem zellulären Homogenat insofern verschieden, dass wenigstens ein Teil (d.h. wenigstens 10 % oder mehr) nicht Membran assoziierter zellulärer Bestandteile entfernt worden ist. Der Begriff „Membran assoziiert“ sowie ähnliche Begriffe wie „membrantragend“ und „in Zellmembranen vorkommend“ betreffen diejenigen zellulären Bestandteile, die entweder in eine Lipidmembran integriert sind oder physikalisch mit einem Bestandteil assoziiert sind, der in eine Lipidmembran integriert ist.

[0060] Wie hierin verwendet, kann der Nachweis oder die Messung einer Signalaktivität mittels eines Assays auf „sekundäre Botenstoffe“ ausgeführt werden, was die Messung von Guaninnukleotidbindung oder -austausch, Adenylatzyklase-Aktivität, intrazellulärem cAMP, intrazellulärem Inositolphosphat, der intrazellulären Diacylglycerin-Konzentration, der Arachinoidsäure-Konzentration, von MAP-Kinase(n)- oder Tyrosinkinase(n)-Aktivitäten, von Proteinkinase C-Aktivität, intrazellulärem Kalzium, Diacylglycerin, Phosphatidylinositol-Abbau oder von Reporterexpression umfasst oder einen Äquorin basierten Assay gemäß der Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, und hierin definiert sind.

[0061] Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „sekundärer Botenstoff ein Molekül, das durch die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) erzeugt wird oder dessen Konzentration dadurch variiert und das an der Transduktion eines Signals von diesem GPCR teilnimmt. Nicht beschränkende Beispiele von sekundären Botenstoffen beinhalten cAMP, Diacylglycerin, Inositoltriphosphat, Arachidonsäure-Freisetzung, Inositoltriphosphate und intrazelluläres Kalzium. Der Begriff „Änderung in der Konzentration eines sekundären Botenstoffs“ betrifft einen Anstieg oder Abfall von wenigstens 10 % der nachgewiesenen Konzentration eines gegebenen sekundären Botenstoffs relativ zu der Menge, die in einem Assay nachgewiesen wurde, der in Abwesenheit eines Kandidatenmodulators ausgeführt wurde.

[0062] Wie hierin verwendet, betrifft der Ausdruck „Äquorin basierter Assay“ einen Assay auf GPCR-Aktivität, der einen intrazellulären Kalziumfluss misst, der durch aktivierte GPCRs aktiviert wird, wobei der intrazelluläre Kalziumfluss mittels der Lumineszenz von Äquorin gemessen wird, das in der Zelle exprimiert wird. Die Erfindung betrifft die Verwendung eines humanen G-Protein gekoppelten Rezeptors, GPR86 (P2Y₁₃), als ein Durchmusterungswerkzeug, um Agonisten oder Antagonisten der Äquorin-Lumineszenz zu identifizieren, die aus der Expression dieses Rezeptors resultiert.

[0063] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „Bindung“ die physikalische Assoziierung eines Liganden (z.B. ADP oder eines Antikörpers) mit einem Rezeptor (z.B. GPR86). So wie der Begriff hierin verwendet wird, ist die Bindung „spezifisch“, wenn sie mit einem EC₅₀ oder einer K_d von 100 nM oder weniger, im Allgemeinen im Bereich von 100 nM bis 10 pM, auftritt. Zum Beispiel ist die Bindung spezifisch, wenn der EC₅₀ oder K_d 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 950 pM, 900 pM, 850 pM, 800 pM, 750 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 550 pM, 500 pM, 450 pM, 400 pM, 350 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 150 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM oder 10 pM oder weniger beträgt.

[0064] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „EC₅₀“ die Konzentration einer Verbindung, bei der eine gegebene Aktivität, einschließlich der Bindung von ADP oder eines anderen Liganden und eine funktionale Aktivität eines GPR86-Polypeptids, 50 % des Maximums dieser GPR86-Aktivität ist, die unter Verwendung desselben Assays in Abwesenheit einer Verbindung messbar ist. Anders ausgedrückt ist „EC₅₀“ die Konzentration einer Verbindung, die 50 % Aktivierung ergibt, wenn 100 % Aktivierung als die Menge an Aktivität gesetzt ist, die bei einer weiteren Zugabe von Agonist nicht mehr ansteigt. Es sollte erwähnt werden, dass die „EC₅₀ von ADP“ gemäß der Identität des ADP-Analogons, das in dem Assay verwendet wird, variieren wird; beispielsweise können ADP-Analoga EC₅₀-Werte aufweisen, die höher als, niedriger als oder dieselben sind wie für ADP. Daher kann der Fachmann, wo ein ADP-Analogon sich von ADP unterscheidet, den EC₅₀ für dieses Analogon gemäß üblicher Verfahren bestimmen. Der EC₅₀ eines gegebenen ADP wird gemessen, indem ein Assay auf Aktivität einer festgelegten Menge von GPR86-Polypeptid in Anwesenheit von Dosen von ADP, die zumindest bis die GPR86-Reaktion gesättigt oder maximal ist, ansteigen, ausgeführt wird und dann die gemessene GPR86-Aktivität gegen die Konzentration von ADP aufgetragen wird.

[0065] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „Sättigung“ die Konzentration von ADP oder eines anderen Liganden, bei der weitere Erhöhungen der Ligandenkonzentration nicht in der Lage sind, die Bindung von ADP-Ligand oder GPR86-spezifische Signalaktivität zu erhöhen.

[0066] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „IC₅₀“ die Konzentration eines Antagonisten oder inversen Agonisten, welche die maximale Aktivierung eines GPR86-Rezeptors um 50 % reduziert.

[0067] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „Abnahme der Bindung“ eine Abnahme von wenigstens 10 % in der Menge der Bindung, die in einem gegebenen Assay mit einem bekannten oder vermuteten Modulator von GPR86 nachgewiesen wird, relativ zur Bindung in einem Assay, in dem dieser bekannte oder vermutete Modulator fehlt.

[0068] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „Zufuhr“, wenn er in Bezug auf einen Wirkstoff oder ein Agens verwendet wird, die Zugabe des Wirkstoffs oder Agens zu einem Assaygemisch oder zu einer Zelle in Kultur. Der Begriff betrifft auch die Verabreichung des Wirkstoffs oder Agens an ein Tier. Solch eine Verabreichung kann zum Beispiel durch Injektion (in einem geeigneten Träger, z.B. steriler physiologischer Kochsalzlösung oder Wasser) oder durch Inhalation oder über einen oralen, transdermalen, rektalen, vaginalen oder anderen üblichen Verabreichungsweg für einen Wirkstoff erfolgen.

[0069] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „Standard“ eine Probe, die von einem Individuum entnommen wurde, das nicht von einer Erkrankung oder Störung betroffen ist, die durch eine Fehlregulation der GPR86-Aktivität gekennzeichnet ist. Der „Standard“ wird als Referenz für den Vergleich von GPR86-mRNA-Konzentrationen und -qualität (d.h. mutant vs. wildtypisch) verwendet, sowie für den Vergleich von GPR86-Aktivitäten. Beispielsweise ist der „Standard“ die Sequenz, die von SEQ ID NR:1 charakterisiert ist.

[0070] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „Amplifizieren“, wenn er in Bezug auf eine Nukleinsäuresequenz verwendet wird, einen Vorgang, wodurch eine oder mehrere Kopie(n) einer Nukleinsäuresequenz, ausgehend von einer Matrizenukleinsäure erzeugt wird/werden. Ein geeignetes Verfahren für „Amplifizieren“ ist PCR oder RT/PCR.

[0071] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „G-Protein gekoppelter Rezeptor“ oder „GPCR“ ein Membran

assoziiertes Polypeptid mit 7 alpha-helikanen Transmembrandomänen. Funktionelle GPCRs assoziieren mit einem Liganden oder Agonisten und assoziieren auch mit und aktivieren G-Proteine(n). GPR86 ist ein GPCR.

[0072] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „Antikörper“ das konventionelle Immunglobulinmolekül sowie Fragmente davon, die ebenfalls mit einem der betreffenden Polypeptide oder Modulatoren spezifisch reagieren. Antikörper können unter Verwendung konventioneller Techniken fragmentiert werden, und die Fragmente können auf dieselbe Weise, wie sie im Folgenden für ganze Antikörper beschrieben ist, auf ihre Nützlichkeit hin durchmustert werden. Beispielsweise können $F(ab)_2$ -Fragmente durch Behandlung eines Antikörpers mit Pepsin erzeugt werden. Das resultierende $F(ab)_2$ -Fragment kann behandelt werden, um Disulfidbrücken zu reduzieren, um Fab-Fragmente herzustellen. Der erfindungsgemäße Antikörper soll weiter bispezifische, Einzelketten- und chimäre und humanisierte Moleküle beinhalten, die eine Affinität für ein Polypeptid aufweisen, die durch wenigstens eine CDR-Region des Antikörpers vermittelt wird. In anderen Ausführungsformen umfasst der Antikörper weiter eine an ihn angebrachte Markierung und ist dadurch in der Lage, nachgewiesen zu werden (z.B. die Markierung kann ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, eine chemilumineszente Verbindung, ein Enzym oder ein Enzym-Kofaktor sein). Die Antikörper, monoklonale oder polyklonale, und ihre hypervariablen Anteile (FAB, FAB", etc.) sowie die Hybridomzelle, welche die Antikörper erzeugt, sind ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung, der eine spezifische gewerbliche Anwendbarkeit auf dem Gebiet der Diagnose und Überwachung spezifischer Erkrankungen, vorzugsweise derjenigen, die im Folgenden beschrieben sind, findet.

[0073] Erfindungsgemäße Inhibitoren beinhalten markierte monoklonale oder polyklonale Antikörper oder hypervariable Anteile der Antikörper, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0074] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff „transgenes Tier“ jedes Tier, beispielsweise ein nicht humanes Säugetier, einen Vogel, einen Fisch oder ein Amphibium, in dem eine oder mehrere Zelle(n) des Tiers heterologe Nukleinsäure enthält, die mittels eines menschlichen Eingriffs, beispielsweise durch im Stand der Technik bekannte transgene Techniken, eingeführt wurde. Die Nukleinsäure wird in die Zelle direkt oder indirekt durch die Einführung in einen Vorläufer der Zelle eingeführt, unter Verwendung gezielter genetischer Manipulation, beispielsweise durch Mikroinjektion oder durch Infektion mit einem rekombinanten Virus. Der Begriff „genetische Manipulation“ beinhaltet keine klassische Kreuzungszüchtung oder In vitro-Fertilisation, sondern betrifft eher die Einführung eines rekombinanten DNA-Moleküls. Dieses Molekül kann in ein Chromosom integriert werden, oder es kann extrachromosomal replizierende DNA sein. In den typischen, hierin beschriebenen, transgenen Tieren veranlasst das Transgen Zellen, eine rekombinante Form eines der betreffenden Polypeptide zu exprimieren, z.B. entweder agonistische oder antagonistische Formen. Allerdings werden auch transgene Tiere, in denen das rekombinante Gen stillgelegt ist, in Betracht gezogen, beispielsweise die FLP- oder CRE-Rekombinase abhängigen Konstrukte, die unten beschrieben sind. Darüber hinaus beinhaltet ein „transgenes Tier“ auch diejenigen rekombinanten Tiere, in denen eine Gendisruption eines oder mehrerer Gene durch einen humanen Eingriff verursacht wurde, einschließlich von sowohl Rekombinations- und Antisense-Techniken.

[0075] [Fig. 1](#) stellt die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptors gemäß der vorliegenden Erfindung dar.

[0076] [Fig. 2](#) ist ein Dendrogramm, das die strukturelle Verwandtschaft des GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptors mit den anderen $P2Y$ -Subtypen darstellt.

[0077] [Fig. 3](#) stellt die Gewebeverteilung des humanen GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptors dar.

[0078] [Fig. 4A](#) bis [Fig. 4C](#) stellen jeweils das Folgende dar:

- Konzentrations-Wirkungs-Kurven von ADP, 2MeSADP und ADP β S auf die IP_3 -Akkumulierung in 1321N1- $G\alpha_{16}$ -Zellen, die den humanen GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptor exprimieren;
- agonistische Effekte von ADP, ATP und 2MeSATP auf die IP_3 -Akkumulierung in 1321N1-Zellen, die den humanen GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptor zusammen mit $G\alpha_{16}$ exprimieren und;
- der Effekt von Pertussistoxin auf die IP_3 -Akkumulierung, die von ADP in 1321N1-Zellen induziert wird, die den humanen GPR86-Rezeptor zusammen mit $G\alpha_{16}$ exprimieren.

[0079] [Fig. 5A](#) bzw. B stellen eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ADP auf die cAMP-Akkumulierung in CHO-K1-Zellen dar, welche den humanen GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptor exprimieren, und den Effekt von Pertussistoxin auf die cAMP-Akkumulierung, die von ADP in CHO-K1-Zellen induziert wird, welche den erfindungsgemäßen humanen GPR86 ($P2Y_{13}$)-Rezeptor exprimieren.

[0080] **Fig. 6** zeigt eine Western-Blot-Analyse von phosphorylierten Erk1- und Erk2-Proteinen in CHO-K1-Zellen, die den erfindungsgemäßen humanen GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor exprimieren.

[0081] **Fig. 7** zeigt die Struktur von ADP.

[0082] **Fig. 8** zeigt die Konzentrations-Reaktions-Kurve der GPR86-Aktivierung durch ATP und 2MeSATP.

[0083] **Fig. 9** zeigt die Aktivierung von GPR86 durch verschiedene Diadenosin-Polyphosphate.

[0084] **Fig. 10** zeigt die Konzentrations-Reaktions-Kurve der GPR86-Aktivierung durch Poly[A] und Poly[A].[G].

[0085] **Fig. 11** zeigt die Konzentrations-Reaktions-Kurve der GPR86-Aktivierung durch ADP in Anwesenheit der Rezeptorantagonisten RB-2, Suramin, PPADS, MRS-2179.

[0086] Die Erfindung betrifft die Entdeckung, dass ADP ein natürlicher Ligand für den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR86 ist, und Verfahren, die Bindung dieses Liganden an den Rezeptor in einem Wirkstoffdurchmusterungsverfahren zu verwenden. Der bekannte Ligand und seine Interaktion mit dem Rezeptor GPR86 stellt auch die Diagnose von Zuständen bereit, welche die Fehlregulation der Rezeptoraktivität beinhalten. Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der GPR86 (P2Y₁₃)- und homologe Sequenzen umfasst, sein entsprechendes Polynukleotid und/oder rekombinante Zellen, die das Polynukleotid exprimieren, um agonistische, antagonistische und invers agonistische Verbindungen des Rezeptorpolypeptids und/oder seines entsprechenden Polynukleotids zu identifizieren. Solche Kits sind nützlich für die Diagnose, Prävention und/oder eine Behandlung verschiedener Erkrankungen und Störungen.

[0087] Die Erfindung betrifft auch neuartige agonistische, antagonistische und invers agonistische Verbindungen des Rezeptorpolypeptids und seines entsprechenden Polynukleotids, die gemäß des Verfahrens der vorliegenden Erfindung identifiziert wurden.

[0088] Alle im Folgenden und im Vorhergehenden in Bezug genommenen Literaturstellen sind durch Bezugnahme vollständig hierin inkorporiert.

Sequenzen

[0089] Die Erfindung betrifft die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, die GPR86 kodieren (dargestellt in **Fig. 1**). Die Erfindung betrifft auch Orthologe und Sequenzen, die zu den Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, die GPR86 kodieren, homolog sind.

Berechnung der Sequenzhomologie

[0090] Die Sequenzidentität in Bezug auf jede der hierin dargestellten Sequenzen kann durch einen einfachen Vergleich „per Auge“ (d.h. ein genauer Vergleich) jeder der Sequenzen mit einer anderen Sequenz bestimmt werden, um zu sehen, ob diese andere Sequenz zum Beispiel wenigstens eine 70 %-ige Sequenzidentität zu der Sequenz/den Sequenzen aufweist.

[0091] Die relative Sequenzidentität kann auch mit käuflich erhältlichen Computerprogrammen bestimmt werden, welche die %-Identität zwischen zwei oder mehr Sequenzen berechnen können, indem sie jeden geeigneten Algorithmus zur Identitätsbestimmung verwenden, zum Beispiel unter Verwendung von Standardparametern. Ein typisches Beispiel für solch ein Computerprogramm ist CLUSTAL. Andere Computerprogrammverfahren, um die Identität und Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen zu bestimmen, beinhalten das GCG-Programm-Paket (Devereux et al. 1984, Nucleic Acids Research 12:387) und FASTA (Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 403–410), sind aber nicht darauf beschränkt.

[0092] Die %-Homologie kann auch über zusammenhängende Sequenzen berechnet werden, d.h. eine Sequenz wird an einer anderen Sequenz ausgerichtet (aligned) und jede einzelne Aminosäure in der einen Sequenz wird direkt mit der entsprechenden Aminosäure in der anderen Sequenz verglichen, immer ein Rest nach dem anderen. Dies wird ein „lückenloses“ Alignment (Ausrichtung) genannt. Üblicherweise werden solche lückenlose Alignments nur über eine relativ geringe Anzahl von Resten ausgeführt.

[0093] Obwohl dies ein sehr einfaches und beständiges Verfahren ist, zieht es nicht in Betracht, dass, zum

Beispiel, in einem ansonsten identischen Paar von Sequenzen eine Insertion oder Deletion dazu führt, dass die folgenden Aminosäurereste nicht mehr ausgerichtet sind, was daher möglicherweise zu einer großen Reduktion der %-Homologie führt, wenn ein Gesamtalignment ausgeführt wird. Demzufolge sind die meisten Sequenzvergleichsverfahren so ausgelegt, dass sie optimale Alignments produzieren, die mögliche Insertionen und Deletionen in Betracht ziehen, ohne den Gesamthomologiewert unangemessen zu verfälschen. Dies wird erreicht, indem „Lücken“ in das Sequenzalignment eingefügt werden, um zu versuchen, die lokale Homologie zu maximieren.

[0094] Allerdings weisen diese komplexeren Verfahren „Lückenfehler“ zu jeder Lücke, die in dem Alignment auftritt, zu, so dass für dieselbe Anzahl identischer Aminosäuren ein Sequenzalignment mit so wenig Lücken wie möglich – was einen höheren Verwandtschaftsgrad zwischen den zwei verglichenen Sequenzen widerspiegelt – einen höheren Wert erreichen wird, als eines mit vielen Lücken. Üblicherweise wird ein „affiner Lückenaufwand (affine gap costs)“ verwendet, der für das Auftreten einer Lücke einen relativ hohen Aufwand berechnet und einen geringeren Fehler für jeden folgenden Rest in der Lücke. Dies ist das am meisten allgemein verwendete Lückenbewertungssystem. Hohe Lückenfehler werden natürlich optimierte Alignments mit weniger Lücken erzeugen. Die meisten Alignment-Programme erlauben, dass die Lückenfehler modifiziert werden. Allerdings ist es bevorzugt, die Standardwerte zu verwenden, wenn eine solche Software für Sequenzvergleiche verwendet wird. Beispielsweise ist der Standard-Lückenfehler bei der Verwendung des GCG Wisconsin Bestfit-Pakets für Aminosäuresequenzen –12 für eine Lücke und –4 für jede Erweiterung.

[0095] Die Berechnung der maximalen %-Homologie erfordert daher zunächst die Erzeugung eines optimalen Alignments, wobei die Lückenfehler in Betracht gezogen werden. Ein geeignetes Computerprogramm, um solch ein Alignment auszuführen, ist das GCG Wisconsin Bestfit-Paket (University of Wisconsin, USA; Devereux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Beispiele für andere Software, die Sequenzvergleiche ausführen kann, beinhalten das BLAST-Paket (Ausubel et al., 1995, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3. Ausgabe, John Wiley & Sons), FASTA (Altschul et al., 1990, 1. *Mol. Biol.*, 403–410) und die GENWORKS Vergleichswerkzeug-Suite, sind aber nicht darauf beschränkt. Sowohl BLAST und FASTA sind für Offline- und Online-Suchen verfügbar (Ausubel et al., 1999, *supra*, Seiten 7–58 bis 7–60).

[0096] Obwohl die finale %-Homologie im Rahmen von Identität gemessen werden kann, beruht der Alignment-Vorgang selbst üblicherweise nicht auf einem Alles-oder-Nichts-Paarvergleich. Stattdessen wird im Allgemeinen eine skalierte Ähnlichkeitswert-Matrix verwendet, die, beruhend auf chemischer Ähnlichkeit oder evolutionärem Abstand, jedem paarweisen Vergleich Werte zuweist. Ein Beispiel solch einer Matrix, die allgemein verwendet wird, ist die BLOSUM62-Matrix – die Standardmatrix für die BLAST-Programmgruppe. GCG Wisconsin Programme verwenden im Allgemeinen entweder die öffentlichen Standardwerte oder eine angepasste Symbolvergleichstabelle, wenn eine solche zur Verfügung gestellt wird. Es ist bevorzugt, die öffentlichen Standardwerte für das GCG-Paket zu verwenden, oder im Fall anderer Software die Standardmatrix, beispielsweise BLOSUM 62.

[0097] Vorteilhafterweise wird der BLAST-Algorithmus verwendet, wobei die Parameter auf Standardwerte eingestellt sind. Der BLAST-Algorithmus ist im Detail beschrieben bei: http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html. Die Suchparameter sind wie folgt definiert und können vorteilhafterweise auf die definierten Standardparameter eingestellt werden.

[0098] Vorteilhafterweise gleicht die „wesentliche Identität“, wenn sie mit BLAST ermittelt wird, Sequenzen, die mit einem EXPECT-Wert von wenigstens etwa 7, vorzugsweise etwa 9 und am meisten bevorzugt 10 oder mehr übereinstimmen. Der Standardstellenwert für EXPECT in BLAST-Suchen ist üblicherweise 10.

[0099] BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ist der heuristische Suchalgorithmus, der von den Programmen blastp, blastn, blastx, tblastn und tblastx verwendet wird; diese Programme weisen ihren Funden unter Verwendung der statistischen Verfahren von Karlin und Altschul (Karlin und Altschul 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264–68; Karlin und Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873–7; siehe http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html) mit ein paar Verbesserung eine Signifikanz zu. Die BLAST-Programme sind auf Sequenzähnlichkeitssuchen zugeschnitten, beispielsweise um Homologe zu einer gegebenen Sequenz zu identifizieren. Für eine Diskussion grundsätzlicher Fragen bei Ähnlichkeitssuchen in Sequenzdatenbanken siehe Altschul et al. (1994) *Nature Genetics* 6:119–129.

[0100] Die fünf bei <http://www.ncbi.nih.gov> erhältlichen BLAST-Programme führen die folgenden Aufgaben aus: blastp – vergleicht eine Aminosäuresuchsequenz gegen eine Proteinsequenzdatenbank; blastn – vergleicht eine Nukleotidsuchsequenz gegen eine Nukleotidsequenzdatenbank; blastx – vergleicht die möglichen

Translationsprodukte der sechs Leseraster einer Nukleotidsuchsequenz (beide Stränge) gegen eine Proteinsequenzdatenbank; tblastn – vergleicht eine Proteinsuchsequenz gegen eine Nukleotidsequenzdatenbank, die dynamisch in alle sechs Leseraster (beide Stränge) translatiert wird; tblastx – vergleicht die Translationen aller sechs Leseraster einer Nukleotidsuchsequenz gegen die Translationen der sechs Leseraster einer Nukleotidsequenzdatenbank.

[0101] BLAST verwendet die folgenden Suchparameter:

HISTOGRAMM – stellt ein Histogramm von Werten für jede Suche dar; Standard ist Ja. (siehe Parameter H im BLAST Handbuch).

DESCRIPTIONS (Beschreibungen) – beschränkt die Anzahl von Kurzbeschreibungen der angezeigten passenden Sequenzen auf die spezifizierte Anzahl; Standardbegrenzung ist 100 Beschreibungen (siehe Parameter V auf der Handbuch-Seite).

EXPECT (erwartet) – der statistische Signifikanzschwellenwert für die Darstellung von Übereinstimmungen gegen die Datenbanksequenzen; der Standardwert ist 10, so dass 10 Übereinstimmungen erwartet werden, die nur zufällig gefunden werden, gemäß dem stochastischen Modell von Karlin und Altschul (1990). Wenn die statistische Signifikanz, der eine Übereinstimmung zugewiesen wird, größer als der EXPECT-Schwellenwert ist, wird die Übereinstimmung nicht angezeigt. Geringere EXPECT-Schwellenwerte sind stringenter und führen zu weniger Zufallsübereinstimmungen, die dargestellt werden. Teilwerte sind akzeptabel. (siehe Parameter E im BLAST-Handbuch).

CUTOFF (Endwert) – Cutoff(End-)Wert für die Darstellung hochbewerteter Segmentpaare. Der Standardwert wird vom EXPECT-Wert (siehe oben) aus berechnet. HSPs werden für eine Datenbanksequenz nur dargestellt, wenn die ihnen zugeschriebene statistische Signifikanz wenigstens so hoch ist, wie sie einem alleinigen HSP zugeschrieben würde, das einen Wert aufweist, der dem CUTOFF-Wert gleicht. Höhere CUTOFF-Werte sind stringenter und führen zu weniger Zufallsübereinstimmungen, die dargestellt werden (siehe Parameter S im BLAST-Handbuch). Üblicherweise können die Signifikanzschwellenwerte unter Verwendung von EXPECT intuitiver gesteuert werden.

ALIGNMENTS (Ausrichtungen) – beschränkt die Datenbanksequenzen auf die angegebene Anzahl, für die hoch bewertete Segmentpaare (HSPs) dargestellt werden; das Standardlimit ist 50. Wenn mehr Datenbanksequenzen als dies zufälligerweise dem statistischen Signifikanzschwellenwert zur Darstellung genügen (siehe EXPECT und CUTOFF unten), werden nur die Übereinstimmungen, denen die größte statistische Signifikanz zugeordnet wird, dargestellt (siehe Parameter B im BLAST-Handbuch).

MATRIX (Matrix) – spezifiziert eine alternative Bewertungsmatrix für BLASTP, BLASTX, TBLASTN und TBLASTX. Die Standardmatrix ist BLOSUM 62 (Henikoff & Henikoff 1992). Die gültige alternative Auswahl beinhaltet: PAM40, PAM120, PAM250 und IDENTITY. Für BLASTN sind keine alternativen Bewertungsmatrizes verfügbar; die Spezifizierung der MATRIX-Direktive in BLASTN-Anfragen ergibt eine Irrtüms (Error)-Antwort.

STRAND (Strang) – beschränkt eine TBLASTN-Suche auf nur den oberen oder unteren Strang der Datenbanksequenzen; oder beschränkt eine BLASTN-, BLASTX- oder TBLASTX-Suche nur auf die Leseraster auf den oberen oder unteren Strang der Suchsequenz.

FILTER (Filter) – maskiert Segmente der Suchsequenz, die eine niedrige Zusammensetzungskomplexizität aufweisen, wie sie durch das SEG-Programm von Wootton & Federhen (1993), Computers and Chemistry 17:149-163 bestimmt wird, oder von Segmenten, die aus in kurzen Abständen vorkommenden internen Wiederholungen bestehen, wie sie durch das XNU-Programm von Claverie & States (1993), Computers and Chemistry 17:191-201 oder, für BLASTN, durch das DUST-Programm von Tatusov und Lipman bestimmt werden (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Filterung kann statistisch signifikante aber biologisch uninteressante Darstellungen des blast-Ergebnisses eliminieren (z.B. Treffer gegen allgemein vorkommende saure, basische oder prolinreiche Bereiche), was die biologisch interessanteren Bereiche der Suchsequenz übrig lässt, die für eine spezifische Übereinstimmung gegen Datenbanksequenzen zur Verfügung stehen.

[0102] Eine Sequenz niedriger Komplexizität, die von einem Filterprogramm gefunden wird, wird unter Verwendung des Buchstabens „N“ in der Nukleotidsequenz ersetzt (z.B. „NNNNNNNNNNNN“) und unter Verwendung des Buchstabens „X“ in Proteinsequenzen (z.B. „XXXXXXXXXX“).

[0103] Die Filterung wird nur auf die Suchsequenz (oder ihre Translationsprodukte) angewendet, nicht auf die Datenbanksequenzen. Die Standardfilterung ist DUST für BLASTN, SEG für andere Programme.

[0104] Es ist keinesfalls ungewöhnlich, durch SEG, XNU oder beide maskiert zu werden, wenn sie auf Sequenzen in SWISS-PROT angewendet werden, so dass man von der Filterung nicht erwarten sollte, dass sie immer eine Wirkung zeigt.

[0105] Darüber hinaus werden in manchen Fällen Sequenzen vollständig maskiert, was anzeigt, dass die sta-

tistische Signifikanz jeder dargestellten Übereinstimmung gegen die ungefilterte Suchsequenz mit Skepsis betrachtet werden muss.

[0106] NCBI-gi – führt dazu, dass NCBI gi-Namen im Ergebnis gezeigt werden, zusätzlich zur Zugangsnummer und/oder dem Lokusnamen.

[0107] Am meisten bevorzugt werden Sequenzvergleiche unter Verwendung des einfachen BLAST-Suchalgorithmus ausgeführt, der auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> bereitgestellt wird. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden keine Lückenfehler verwendet, wenn die Sequenzidentität bestimmt wird.

Hybridisierung

[0108] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nukleotidsequenzen, die in der Lage sind, an die hierin dargestellten Sequenzen oder jedes Fragment oder Derivat davon oder an die komplementären Stränge von all den vorgenannten zu hybridisieren.

[0109] Hybridisierung bedeutet einen „Vorgang, in dem ein Strang einer Nukleinsäure sich mit einem Komplementärstrang mittels Basenpaarung verbindet“ (Coombs J. (1994), Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York NY) sowie den Vorgang der Amplifikation, wie sie in einer Polymerase-Kettenreaktion-Technologie, wie sie in Dieffenbach CW und GS Dveksler (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY) beschrieben ist, ausgeführt wird.

[0110] Hybridisierungsbedingungen beruhen auf der Schmelztemperatur (T_m) des Nukleinsäurebindungskomplexes, wie in Berger und Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA) gelehrt wird, und führen zu einer definierten „Stringenz“, wie unten erklärt ist.

[0111] Nukleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung, die in der Lage sind, selektiv an die hierin dargestellten Nukleotidsequenzen zu hybridisieren, oder zu ihrem Komplementärstrang, werden im Allgemeinen wenigstens zu 70 % oder wenigstens zu 75 % oder wenigstens zu 85 oder 90 % oder sogar wenigstens zu 95 % oder 98 % zu den entsprechenden Nukleotidsequenzen, die hierin dargestellt sind, über eine Region von wenigstens 20 oder wenigstens 25 oder 30, beispielsweise wenigstens 40, 60 oder 100 oder mehr zusammenhängende Nukleotide, homolog sein.

[0112] Der Begriff „selektiv hybridisierbar“ bedeutet, dass die Nukleotidsequenz, die als Sonde verwendet wird, unter Bedingungen verwendet wird, unter denen eine Zielnukleotidsequenz der Erfindung an die Sonde zu einem signifikanten Ausmaß über den Hintergrund hinaus hybridisiert. Die Hintergrundhybridisierung kann auftreten, weil andere Nukleotidsequenzen vorhanden sind, beispielsweise in der cDNA- oder genomischen DNA-Bank, die durchmustert wird. In diesem Fall impliziert der Hintergrund eine Stärke des Signals, das durch die Interaktion zwischen der Sonde und einem nicht-spezifischen DNA-Mitglied der Bank erzeugt wird, die weniger als 10-fach oder sogar weniger als 100-fach so stark ist wie die spezifische Interaktion, die mit der Ziel-DNA beobachtet wird. Die Intensität der Interaktion kann beispielsweise mittels radioaktiver Markierung der Sonde, z.B. mit ^{32}P , gemessen werden.

[0113] Der Umfang der vorliegenden Erfindung beinhaltet auch Nukleotidsequenzen, die in der Lage sind, an die Nukleotidsequenzen, die hierin dargestellt sind, unter Bedingungen intermediärer bis maximaler Stringenz zu hybridisieren. Hybridisierungsbedingungen beruhen auf der Schmelztemperatur (T_m) des Nukleinsäurebindungskomplexes, wie in Berger und Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA) gelehrt wird, und führen zu einer definierten „Stringenz“, wie unten erklärt ist.

[0114] Maximale Stringenz tritt üblicherweise bei etwa $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C unter der T_m der Sonde) auf; hohe Stringenz bei etwa 5°C bis 10°C unter T_m ; intermediäre Stringenz bei etwa 10°C bis 20°C unter T_m und geringe Stringenz bei etwa 20°C bis 25°C unter T_m . Der Fachmann wird verstehen, dass eine Maximalstringenzhybridisierung verwendet werden kann, um identische Nukleotidsequenzen zu identifizieren oder nachzuweisen, während eine Intermediär- (oder Niedrig-) – Stringenzhybridisierung verwendet werden kann, um ähnliche oder verwandte Nukleotidsequenzen zu identifizieren oder nachzuweisen.

[0115] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung Nukleotidsequenzen, die an

eine oder mehrere der GPCR-Nukleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung unter stringenten Bedingungen (z.B. 65°C und $0,1 \times \text{SSC}$ { $1 \times \text{SSC} = 0,15 \text{ M NaCl}$, $0,015 \text{ M Na}_3\text{-Zitrat pH 7,0}$ }) hybridisieren können. Wo die Nukleotidsequenz der vorliegenden Erfindung doppelsträngig ist, sind beide Stränge der Duplexstruktur, entweder einzeln oder in Kombination, von der vorliegenden Erfindung umfasst. Wo die Nukleotidsequenz einzelsträngig ist, versteht man, dass die Komplementärsequenz dieser Nukleotidsequenz ebenfalls im Umfang der vorliegenden Erfindung beinhaltet ist.

[0116] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nukleotidsequenzen, die in der Lage sind, an die Sequenzen zu hybridisieren, die zu den hierin dargestellten Sequenzen oder jedem Fragment oder Derivat davon, komplementär sind. Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung Nukleotidsequenzen, die zu Sequenzen komplementär sind, die in der Lage sind, an die Sequenz der vorliegenden Erfindung zu hybridisieren. Diese Typen von Nukleotidsequenzen sind Beispiele varianter Nukleotidsequenzen. In diesem Zusammenhang umfasst der Begriff „variant“ Sequenzen, die zu Sequenzen komplementär sind, die in der Lage sind, an die hierin dargestellten Nukleotidsequenzen zu hybridisieren. Allerdings umfasst der Begriff „variant“ auch Sequenzen, die zu Sequenzen komplementär sind, die in der Lage sind, unter stringenten Bedingungen (z.B. 65°C und $0,1 \times \text{SSC}$ { $1 \times \text{SSC} = 0,15 \text{ M NaCl}$, $0,015 \text{ M Na}_3\text{-Zitrat pH 7,0}$ }) an die hierin dargestellten Nukleotidsequenzen zu hybridisieren.

Zellen

[0117] Eine Zelle, die gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich ist, kann aus Bakterienzellen, Hefezellen, Insektenzellen oder Säugetierzellen ausgewählt werden.

[0118] Eine Zelle, die gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich ist, kann jede Zelle sein, in die eine Nukleinsäuresequenz, die einen erfindungsgemäßen Rezeptor kodiert, eingeführt kann oder vorhanden ist, so dass der Rezeptor in natürlichen Mengen oder über den natürlichen Mengen, wie sie hierin definiert sind, exprimiert wird. Ein erfindungsgemäßer Rezeptor, der in einer Zelle exprimiert wird, kann eine normale oder fast normale Pharmakologie, wie sie hierin definiert ist, aufweisen. Ein erfindungsgemäßer Rezeptor, der in einer Zelle exprimiert wird, kann die Nukleotid- oder Aminosäuresequenz, wie sie in [Fig. 1](#) dargestellt ist, oder eine Nukleotid- oder Aminosäuresequenz aufweisen, die wenigstens zu 70 % identisch ist zu der Aminosäuresequenz, wie sie in [Fig. 1](#) dargestellt ist. Ein erfindungsgemäßer Rezeptor, der in einer Zelle exprimiert wird, kann ADP mit einer Affinität binden, die wenigstens 100-fach oder 500-fach oder sogar 1000-fach größer ist als die Affinität für IDP und UDP.

[0119] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Zelle aus COS7-Zellen, einer CHO-Zelle, einer LM (TK)-Zelle, einer NIH 3T3-Zelle, HEK 293-Zelle, K562-Zelle oder einer 1321N1-Astrozytomzelle, aber auch anderen transfizierbaren Zelllinien ausgewählt. Es ist offensichtlich, dass die Zellmembranen der vorliegenden Erfindung von diesen Zellen abgeleitet werden können.

I. Assays für die Identifizierung von Agenzien, welche die Aktivität von GPR86 modulieren

[0120] Agenzien, welche die Aktivität von GPR86 modulieren, können in einer Anzahl von Wegen identifiziert werden, welche die Interaktion des Rezeptors mit ADP oder jedem anderen Liganden vorteilhaft ausnützen. Zum Beispiel stellt die Fähigkeit, eine GPR86/ADP-Bindung entweder *ir vitro*, auf kultivierten Zellen oder *in vivo* zu rekonstituieren, ein Ziel für die Identifizierung von Agenzien bereit, die diese Bindung lösen. Assays, die auf dem Lösen von Bindung basieren, können Agenzien identifizieren, zum Beispiel kleine organische Moleküle aus Banken oder Sammlungen solcher Moleküle. Alternativ können solche Assays Agenzien in Proben oder Extrakten aus natürlichen Quellen, z.B. Pflanzen-, Pilz- oder Bakterienextrakten oder sogar in humanen Gewebeproben (z.B. Tumorgewebe) identifizieren. In einem Aspekt können die Extrakte aus Zellen hergestellt werden, die eine Bank varianter Nukleinsäuren, Peptide oder Polypeptide exprimieren. Modulatoren der GPR86/ADP-Bindung können anschließend unter Verwendung eines Bindungsassays oder eines Funktionalitätsassays durchmustert werden, welche die stromabwärts gerichtete Signalgabe durch den Rezeptor messen.

[0121] Ein anderer Ansatz, der die GPR86/ADP-Interaktion direkter verwendet, um Agenzien zu identifizieren, welche die GPR86-Funktion modulieren, misst Veränderungen in der GPR86 stromabwärts gerichteten Signalgabe, die von Kandidatenagenzien oder Kandidatenmodulatoren induziert werden. Diese Funktionalitätsassays können mit isolierten Zellmembranfraktionen oder mit Zellen, die den Rezeptor auf ihren Oberflächen exprimieren, ausgeführt werden.

[0122] Die Entdeckung, dass ADP ein Ligand des GPR86-Rezeptors ist, erlaubt Durchmusterungsassays, um Agonisten, Antagonisten und inverse Agonisten der Rezeptoraktivität zu identifizieren. Die Durchmusterungsassays werden zwei allgemeine Ansätze aufweisen.

1) Ligandenbindungsassays, in den Zellen, die GPR86 exprimieren, Membranextrakte solcher Zellen, virusinduzierte Knospungsmembranen, die ein GPR86-Polypeptid enthalten, oder immobilisierte Lipidmembranen, die GPR86 umfassen, werden markiertem ADP und Kandidatenverbindungen ausgesetzt. Nach der Inkubation wird das Reaktionsgemisch auf spezifische Bindung des markierten ADP an den GPR86-Rezeptor gemessen. Verbindungen, die mit der Bindung interferieren, oder markiertes ADP verdrängen, können Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten der GPR86-Aktivität sein. Eine nachfolgende Funktionalitätsanalyse kann dann mit positiven Verbindungen ausgeführt werden, um zu bestimmen, in welche dieser Kategorien sie gehören.

2) Funktionalitätsassays, in denen eine Signalgabe-Aktivität von GPR86 gemessen wird.

a) Für die Durchmusterung auf Agonisten werden Zellen, die GPR86 exprimieren, oder Membranen, die von diesen präpariert wurden, mit einer Kandidatenverbindung inkubiert, und eine Signalgabe-Aktivität von GPR86 wird gemessen. Die von Verbindungen, welche die Rezeptoraktivität modulieren, induzierte Aktivität wird mit derjenigen verglichen, die durch ADP induziert wird. Ein Agonist oder partieller Agonist wird eine maximale biologische Aktivität aufweisen, die mindestens 10 % der Maximalaktivität von ADP entspricht, wenn der Agonist oder partielle Agonist bei 10 nM oder weniger vorhanden ist und wird sogar eine Potenz aufweisen, die wenigstens der von ADP entspricht.

b) Für die Durchmusterung auf Antagonisten oder inverse Agonisten werden Zellen, die GPR86 exprimieren, oder Membranen, die von diesen isoliert wurden, auf Signalgabe-Aktivität in Anwesenheit von ADP mit oder ohne eine Kandidatenverbindung untersucht. Antagonisten werden das Niveau der ADP-stimulierten Rezeptoraktivität um wenigstens 10 % relativ zu Reaktionen, bei denen der Antagonist in Anwesenheit von ADP fehlt, reduzieren. Inverse Agonisten werden die konstitutive Aktivität des Rezeptors um wenigstens 10 % relativ zu Reaktionen ohne den inversen Agonisten reduzieren.

c) Für Durchmusterungen auf inverse Agonisten werden Zellen, die eine konstitutive GPR86-Aktivität exprimieren, oder Membranen, die von diesen isoliert wurden, in einem Funktionalitätsassay verwendet, der eine Aktivität des Rezeptors in Anwesenheit einer Kandidatenverbindung misst. Inverse Agonisten sind diejenigen Verbindungen, welche die konstitutive Aktivität des Rezeptors um wenigstens 10 % reduzieren. Eine Überexpression von GPR86 kann zu einer konstitutiven Aktivierung führen. GPR86 kann überexprimiert werden, indem es unter die Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors, z.B. den CMV frühen Promotor, gestellt wird. Alternativ neigen bestimmte Mutationen der konservierten GPCR-Aminosäuren oder Aminosäuredomänen dazu, zu konstitutiver Aktivität zu führen. Siehe zum Beispiel: Kjelsberg et al., 1992, J. Biol. Chem., 267:1430; McWhinney et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:2087; Ren et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:16483; Samama et al., J. Biol. Chem. 268:4625; Parma et al., 1993, Nature 365:649; Parma et al., 1998, J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:85 und Parent et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:7949.

Ligandenbindungs- und Verdrängungsassays:

[0123] Man kann GPR86-Polypeptide, die auf einer Zelle exprimiert werden, oder isolierte Membranen, die Rezeptorpolypeptide enthalten, zusammen mit ADP verwenden, um auf Verbindungen zu durchmustern, welche die Bindung von ADP an GPR86 inhibieren. Wenn sie in einem Assay, der die Bindung oder die ADP-Verdrängung alleine misst, identifiziert wurden, werden die Verbindungen funktionalen Tests unterworfen werden müssen, um zu bestimmen, ob sie als Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten agieren.

[0124] Für Verdrängungsexperimente werden Zellen, die ein GPR86-Polypeptid (im Allgemeinen 25×10^3 Zellen pro Assay oder 1 bis 100 µg Membranextrakt) in Bindungspuffer mit markiertem ADP in Anwesenheit oder Abwesenheit von steigenden Konzentrationen eines Kandidatenmodulators inkubiert. Um den Assay zu validieren und zu kalibrieren, können Kompetitionskontrollreaktionen unter Verwendung steigender Konzentrationen von unmarkiertem ADP ausgeführt werden. Nach der Inkubation werden Zellen extensiv gewaschen und gebundenes, markiertes ADP wird gemessen, so wie es für die gegebene Markierung geeignet ist (z.B. Szintillationszählung, Fluoreszenz, etc.). Eine Abnahme von wenigstens 10 % in der Menge von markiertem ADP, das in Gegenwart eines Kandidatenmodulators gebunden ist, zeigt eine Verdrängung von Bindung durch den Kandidatenmodulator an. Von Kandidatenmodulatoren wird angenommen, dass sie in diesem oder anderen Assay(s), wie sie hierin beschrieben sind, spezifisch binden, wenn sie 50 % des markiertem ADP (unter der ADP-Sättigungsdosis) bei einer Konzentration von 10 nM oder weniger verdrängen.

[0125] Alternativ kann die Bindung oder Verdrängung von Bindung mittels Oberflächenplasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) überwacht werden. Oberflächenplasmon-Resonanz-Assays können als ein quantitatives Verfahren verwendet werden, um die Bindung zwischen zwei Molekülen durch die Massenän-

derung in der Nähe eines immobilisierten Sensors zu messen, die von der Bindung oder dem Verlust der Bindung von ADP aus der wässrigen Phase an ein in einer Membran des Sensors immobilisiertes GPR86-Polypeptid verursacht wird. Diese Massenveränderung wird als Resonanzeinheiten gegen die Zeit nach Injektion oder Entfernung des ADP oder des Kandidatenmodulators gemessen, und sie wird unter Verwendung eines Biacore Biosensors (Biacore AB) gemessen. GPR86 kann auf einem Sensorchip (zum Beispiel hochreiner CM5-Chip, Biacore AB) in einer Dünnschichtlipidmembran gemäß den Verfahren, die von Salamon et al. beschrieben sind, immobilisiert werden (Salamon et al., 1996, *Biophys. J.* 71:283–294; Salamon et al., 2001, *Biophys. J.* 80:1557–1567; Salamon et al., 1999, *Trends Biochem. Sci.* 24:213–219). Sarrio et al. zeigten, dass SPR verwendet werden kann, um Ligandenbindung an den GPCR A(1)-Adenosinrezeptor nachzuweisen, der in einer Lipidschicht auf dem Chip immobilisiert ist (Sarrio et al., 2000, *Mol. Cell. Biol.* 20:5164–5174). Bedingungen für die ADP-Bindung an GPR86 in einem SPR-Assay können vom Fachmann unter Verwendung der Bedingungen, die von Sarrio et al. als Startpunkt beschrieben sind, feinjustiert werden.

[0126] SPR kann auf Modulatoren der Bindung auf wenigstens zwei Arten testen. Zunächst kann ADP zuerst an immobilisiertes GPR86-Polypeptid immobilisiert werden, gefolgt von einer Injektion von Kandidatenmodulator bei einer Konzentration, die von 0,1 nM bis 1 µM reicht. Die Verdrängung des gebundenen ADP kann quantifiziert werden, was den Nachweis der Modulatorbindung erlaubt. Alternativ kann membrangebundenes GPR86-Polypeptid mit einem Kandidatenmodulator vorinkubiert und dann ADP ausgesetzt werden. Eine Differenz in der ADP-Bindung an GPR86, das dem Modulator ausgesetzt ist, relativ zu der auf einem Chip, der dem Modulator nicht vor-ausgesetzt war, wird die Bindung oder Verdrängung von ADP in Anwesenheit des Modulators zeigen. In beiden Assays zeigt eine Abnahme von 10 % oder mehr in der Menge von gebundenem ADP in Gegenwart eines Kandidatenmodulators relativ zu der Menge von gebundenem ADP in Abwesenheit des Kandidatenmodulators an, dass der Kandidatenmodulator die Interaktion von GPR86 und ADP inhibiert.

[0127] Ein weiteres Verfahren zum Nachweis der Inhibierung der Bindung von ADP an GPR86 verwendet Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET). FRET ist ein quantenmechanisches Phänomen, dass zwischen einem Fluoreszenzdonor (D) und einem Fluoreszenzakzeptor (A) in enger Nachbarschaft zueinander (üblicherweise < 100 Å Abstand) auftritt, wenn das Emissionsspektrum von D mit dem Anregungsspektrum von A überlappt. Die zu testenden Moleküle, z.B. ADP und ein GPR86-Polypeptid, werden mit einem komplementären Paar von Donor- und Akzeptorfluorophoren markiert. Während sie durch die GPR86 : ADP-Interaktion eng zusammengebunden sind, wird die nach Anregung des Donorfluorophors emittierte Fluoreszenz eine andere Wellenlänge haben als die, die in Reaktion auf diese Anregungswellenlänge emittiert wird, wenn das ADP und GPR86-Polypeptid nicht gebunden sind, was eine Quantifizierung von gebundenen versus ungebundenen Molekülen durch Messung der Emissionsintensität bei jeder Wellenlänge zur Verfügung stellt. Donorfluorophore, mit denen das GPR86-Polypeptid markiert werden soll, sind im Stand der Technik bekannt. Von Interesse sind Varianten des GFP von *A. victoria*, die als Cyan FP (CFP, Donor (D)) und Gelb FP (YFP, Akzeptor (A)) bekannt sind. Beispielsweise kann die YFP-Variante als ein Fusionsprotein mit GPR86 hergestellt werden. Vektoren für die Expression von GFP-Varianten als Fusionen (Clontech) sowie Fluorophor-markierte ADP-Verbindungen (Molecular Probes) sind im Stand der Technik bekannt. Die Zugabe eines Kandidatenmodulators in das Gemisch von markiertem ADP und YFP-GPR86-Protein wird zu einer Inhibierung des Energietransfers führen, was beispielsweise durch einen Abfall in der YFP-Fluoreszenz relativ zu einer Probe ohne den Kandidatenmodulator nachgewiesen wird. In einem Assay unter Verwendung von FRET für den Nachweis einer GPR86 : ADP-Interaktion zeigt ein 10 %-iger oder größerer Abfall in der Intensität der Fluoreszenzemission bei der Akzeptorwellenlänge in Proben mit einem Kandidatenmodulator relativ zu Proben ohne den Kandidatenmodulator an, dass der Kandidatenmodulator die GPR86:ADP-Interaktion inhibiert.

[0128] Eine Variation von FRET verwendet Fluoreszenz-Quenchen (Fluoreszenz-Auslöschung), um molekulare Interaktionen zu überwachen. Ein Molekül im interagierenden Paar kann mit einem Fluorophor markiert werden, und das andere mit einem Molekül, das die Fluoreszenz des Fluorophors quencht, wenn sie in große Nähe zueinander gebracht werden. Eine Veränderung in der Fluoreszenz nach Anregung zeigt eine Änderung in der Assoziierung der Moleküle an, die mit dem Fluorophor: Quencher-Paar markiert sind. Im Allgemeinen zeigt ein Anstieg in der Fluoreszenz des markierten GPR86-Polypeptids an, dass das ADP-Molekül, das den Quencher trägt, verdrängt worden ist. Für Quench-Assays zeigt ein 10 %-iger oder größerer Anstieg in der Intensität der Fluoreszenzemission in Proben mit einem Kandidatenmodulator relativ zur Proben ohne den Kandidatenmodulator an, dass der Kandidatenmodulator die GPR86 : ADP-Interaktion inhibiert.

[0129] Zusätzlich zu den Oberflächenplasmon-Resonanz- und FRET-Verfahren ist eine Fluoreszenzpolarisierungsmessung nützlich, um Bindung zu quantifizieren. Der Fluoreszenzpolarisierungswert für ein fluoreszenzmarkiertes Molekül hängt von der Rotationskorrelationszeit oder Taumelrate ab. Komplexe, wie diejenigen, die

von GPR86, das mit einem fluoreszenzmarkierten ADP assoziiert, ausgebildet werden, besitzen höhere Polarisationswerte als unkomplexiertes, markiertes ADP. Das Miteinbeziehen eines Kandidateninhibitors der GPR86 : ADP-Interaktion führt zu einem Abfall der Fluoreszenzpolarisation relativ zu einem Gemisch ohne den Kandidateninhibitor, wenn der Kandidateninhibitor die Interaktion von GPR86 mit ADP löst oder inhibiert. Fluoreszenzpolarisation ist für die Identifizierung kleiner Moleküle, welche die Ausbildung von Rezeptor : Liganden-Komplexen lösen, gut geeignet. Ein Abfall von 10 % oder mehr in der Fluoreszenzpolarisation in Proben mit einem Kandidatenmodulator relativ zur Fluoreszenzpolarisation in einer Probe, in der ein Kandidatenmodulator fehlt, zeigt an, dass der Kandidatenmodulator die GPR86 : ADP-Interaktion inhibiert.

[0130] Eine weitere Alternative, um GPR86 : ADP-Interaktionen zu überwachen, verwendet einen Biosensor-Assay. ICS-Biosensoren wurden im Stand der Technik beschrieben (Australian Membrane Biotechnology Research Institute, <http://www.ambri.com.au/>; Cornell B., Braach-Maksvytis V., King L., Osman P., Raguse B., Wieczorek L. und Pace R. „A biosensor that uses ion-channel switches" *Nature* 1997, 387, 580). In dieser Technologie ist die Assoziation von GPR86 und seines Liganden mit dem Schließen von Gramacidin-abhängigen Ionenkanälen in suspendierten Membrandoppelschichten und daher mit einer messbaren Veränderung in der Zugänglichkeit (ähnlich zum Widerstand) des Biosensors gekoppelt. Dieser Ansatz ist über sechs Größenordnungen der Zugänglichkeitsveränderung linear und ist ideal für Hochdurchsatzdurchmusterungen im großen Maßstab von kombinatorischen Banken kleiner Moleküle geeignet. Eine 10 %-ige oder größere Änderung (Anstieg oder Abfall) in der Zugänglichkeit in einer Probe mit einem Kandidatenmodulator relativ zu der Zugänglichkeit einer Probe, in der der Kandidatenmodulator fehlt, zeigt an, dass der Kandidatenmodulator die Interaktion von GPR86 und ADP inhibiert. Es ist wichtig zu erwähnen, dass in Assays, welche die Interaktion von GPR86 mit ADP testen, es möglich ist, dass ein Modulator der Interaktion nicht notwendigerweise direkt mit der Domäne / den Domänen des Proteins interagiert, das physikalisch mit ADP interagiert. Es ist auch möglich, dass ein Modulator an einer Stelle interagiert, die von der Interaktionsstelle entfernt ist und beispielsweise eine Konformationsänderung in dem GPR86-Polypeptid verursacht. Modulatoren (Inhibitoren oder Agonisten), die auf diese Weise agieren, sind nichtsdestotrotz von Interesse als Agenzien, welche die Aktivität von GPR86 modulieren.

[0131] Demgemäß kann ein Verfahren zur Durchmusterung nach einem Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität unter Verwendung von Zellen, die GPR86 exprimieren, folgende Schritte umfassen: a) Inkubieren einer ersten Probe der Zellen in Anwesenheit eines Kandidatenmodulators und einer zweiten Probe der Zellen in Abwesenheit des Kandidatenmodulators, wobei beide Proben unter Bedingungen inkubiert werden, welche das Binden von ADP an GPR86 erlauben; b) Nachweisen einer Signalaktivität des GPR86-Polypeptids in dieser ersten und zweiten Probe, und; c) Vergleichen der Ergebnisse der Sekundärer-Botenstoff-Assays für die erste und zweite Probe. Ein Verfahren der Durchmusterung nach einem Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität unter Verwendung von Zellmembranen, die GPR86 tragen, kann folgende Schritte umfassen: a) Inkubieren einer ersten Probe der Zellmembranen in Anwesenheit des Kandidatenmodulators und einer zweiten Probe der Zellmembranen in Abwesenheit des Kandidatenmodulators, wobei beide Proben unter Bedingungen inkubiert werden, welche die Bindung von ADP an GPR86 erlauben; b) Nachweisen einer Signalaktivität des GPR86-Polypeptids in dieser ersten und zweiten Probe, und; c) Vergleichen der Ergebnisse der Sekundärer-Botenstoff-Assays für die erste und zweite Probe. Darüber hinaus kann ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Kandidatenmodulator die Aktivität von GPR86 steigert oder absenkt, unter Verwendung von Zellen, die GPR86 exprimieren, die folgenden Schritte umfassen. a) Inkubieren einer ersten Probe von Zellen in Anwesenheit des Kandidatenmodulators und einer zweiten Probe der Zellen in Abwesenheit des Kandidatenmodulators, wobei beide Proben unter Bedingungen inkubiert werden, welche die Bindung von ADP an GPR86 erlauben; b) Nachweis einer Signalaktivität des GPR86-Polypeptids in der ersten und zweiten Probe, und; c) Vergleichen der Ergebnisse der Sekundärer-Botenstoff-Assays für die erste und zweite Probe. Als nächstes kann ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Kandidatenmodulator die Aktivität von GPR86 steigert oder absenkt, unter Verwendung von Zellmembranen, die GPR86 tragen, folgende Schritte umfassen: a) Inkubieren einer ersten Probe der Zellmembranen in Anwesenheit des Kandidatenmodulators und einer zweiten Probe der Zellmembranen in Abwesenheit des Kandidatenmodulators, wobei beide Proben unter Bedingungen inkubiert werden, welche die Bindung von ADP an GPR86 erlauben; b) Nachweisen einer Signalaktivität des GPR86-Polypeptids in der ersten und zweiten Probe, und; c) Vergleichen der Ergebnisse der Sekundärer-Botenstoff-Assays für die erste und zweite Probe.

3. Andere Liganden

[0132] Man sollte verstehen, dass all die hierin beschriebenen Verfahren oder Bindungsassays mit einem Nicht-ADP-Liganden (zum Beispiel Agonisten, Antagonisten, etc.) von GPR86 ausgeführt werden können, z.B. einem kleinen Molekül, das wie hierin beschrieben identifiziert wurde, oder ADP-Analoga, einschließlich der

ADP-Analoga, die in US Pat. Nr. 5,700,786 präsentiert sind, einem natürlichen oder synthetischen Peptid, einem Polypeptid, einem Antikörper oder einem Antigen-bindenden Fragment davon, einem Lipid, einem Kohlenhydrat und einem kleinen organischen Molekül, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0133] Alle die hierin beschriebenen Verfahren oder Bindungsassays können verwendet werden, um die Anwesenheit eines Agens in einer Probe, z.B. einer Gewebeprobe, zu bestimmen, das an das GPR86-Rezeptormolekül bindet, oder das die Bindung von ADP an den Rezeptor beeinflusst. Um dies zu tun, wird das GPR86-Polypeptid mit ADP oder einem anderen Liganden in Anwesenheit oder Abwesenheit der Probe umgesetzt, und die ADP- oder Liganden-Bindung wird gemessen, so wie es für den Bindungsassay, der verwendet wird, geeignet ist. Eine Abnahme von 10 % oder mehr in der Bindung von ADP oder einem anderen Liganden zeigt an, dass die Probe ein Agens enthält, das die ADP- oder Liganden-Bindung an das Rezeptorpolypeptid moduliert.

[0134] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren wie sie hierin beschrieben sind, wobei ADP durch einen Modulator, wie er hierin beschrieben ist, ersetzt wird, beispielsweise durch ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP β S, Ap3A, RB-2, Suramin oder PPADS.

[0135] Weiter kann das Agens oder der Modulator, der durch die vorliegende Erfindung identifiziert oder charakterisiert wurde, in einem Verfahren zur Modulation der GPR86-Aktivität eines Polypeptids in einer Zelle verwendet werden, wobei das Verfahren den Schritt umfasst, dieser Zelle ein Agens, das die GPR86-Aktivität eines Polypeptids moduliert, zuzuführen, so dass die GPR86-Aktivität moduliert wird.

Funktionalitätsassays der Rezeptoraktivität

i. GTPase/GTP-Bindungsassays:

[0136] Für GPCRs wie GPR86 ist die Bindung von GTP durch Zellmembranen, welche Rezeptoren enthalten eine Maß der Rezeptoraktivität. In dem von Traynor und Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol. 47:848-854 beschriebenen Verfahren misst man die G-Protein Kopplung an Membranen im Wesentlichen durch den Nachweis der Bindung von markiertem GTP. Für GTP-Bindungsassays werden Membranen, die von Zellen isoliert wurden, welche den Rezeptor exprimieren, in einem Puffer mit 20 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl und 10 mM MgCl₂, 80 pM ³⁵S-GTP γ S und 3 μ M GDP inkubiert. Das Assay-Gemisch wird 60 Minuten lang bei 30°C inkubiert, nach denen ungebundenes markiertes GTP mittels Filtration durch GF/B-Filter entfernt wird. Gebundenes, markiertes GTP wird mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen. Um auf Modulation von ADP-induzierter GPR86-Aktivität zu untersuchen, werden Membranen, die von Zellen präpariert wurden, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren, mit ADP gemischt, und der GTP-Bindungsassay wird in Anwesenheit und Abwesenheit eines Kandidatenmodulators der GPR86-Aktivität ausgeführt. Ein Abfall von 10 % oder mehr in der Bindung von markiertem GTP, wie sie durch Szintillationszählung gemessen wird, in einem Assay dieser Art, der einen Kandidatenmodulator enthält, relativ zu einem Assay ohne den Modulator, zeigt an, dass der Kandidatenmodulator die GPR86-Aktivität inhibiert. Ein ähnlicher GTP-Bindungsassay kann ohne ADP ausgeführt werden, um Verbindungen zu identifizieren, die als Agonisten wirken. In diesem Fall wird eine ADP-stimulierte GTP-Bindung als Standard verwendet. Eine Verbindung wird als Agonist betrachtet, wenn sie wenigstens 50 % des Niveaus der GTP-Bindung induziert, die von ADP induziert wird, wenn die Verbindung in einer Konzentration von 1 μ M oder weniger vorhanden ist, oder ein Niveau induziert wird, welches dasselbe oder höher ist als dasjenige, das von ADP induziert wird. Die GTPase-Aktivität wird gemessen, indem die Membranen, die ein GPR86-Polypeptid enthalten, mit γ ³²P-GTP inkubiert werden. Aktive GTPase wird die Markierung als anorganisches Phosphat freisetzen, das nachgewiesen wird, indem freies anorganisches Phosphat in einer 5 %-igen Aktivkohlesuspension in 20 mM H₃PO₄ aufgetrennt wird, gefolgt von einer Szintillationszählung. Kontrollen beinhalten Assays unter Verwendung von Membranen, die von Zellen isoliert wurden, die kein GPR86 exprimieren (leer-transfiziert), um mögliche unspezifische Effekte der Kandidatenverbindung auszuschließen.

[0137] Um die Wirkung eines Kandidatenmodulators auf eine GPR86-regulierte GTPase-Aktivität zu untersuchen, werden Membranproben mit ADP mit und ohne den Modulator induziert, gefolgt von dem GTPase-Assay. Eine Veränderung (Anstieg oder Abfall) von 10 % oder mehr in dem Niveau der GTP-Bindung oder GTPase-Aktivität relativ zu Proben ohne Modulator zeigt eine GPR86-Modulation durch einen Kandidatenmodulator an.

ii. Assays der Aktivierung des stromabwärts gelegenen Reaktionswegs:

a. Kalziumfluss – Der auf Äquorin basierende Assay:

[0138] Der Äquorin-Assay zieht seinen Vorteil aus der Reaktivität von mitochondrialem Apoäquorin gegenüber intrazellulärer Kalziumfreisetzung, die durch die Aktivierung von GPCRs induziert wird (Stables et al., 1997, Anal. Biochem. 252:115-126; Detheux et al., 2000, J. Exp. Med., 192 1501-1508). Kurzgesagt werden GPR86-exprimierende Klone transfiziert, so dass sie mitochondriales Apoäquorin und $G\alpha_{16}$ koexprimieren. Zellen werden mit 5 μ M Koelenterazin H (Molecular Probes) 4 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert, in DMEM-F12-Kulturmedium gewaschen und in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Zellen werden dann mit Testagonistmolekülen gemischt, und die Lichtemission durch das Äquorin wird mit einem Luminometer 30 Sekunden lang aufgenommen. Die Ergebnisse werden als relative Lichteinheiten (RLU) ausgedrückt. Kontrollen beinhalten Assays unter Verwendung von Membranen, die von Zellen isoliert wurden, die kein GPR86 exprimieren (leer-transfiziert), um mögliche unspezifische Effekte der Kandidatenverbindung auszuschließen.

[0139] Die Äquorin-Aktivität oder die intrazellulären Kalziumspiegel sind „verändert“, wenn in einer Probe von Zellen, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren und mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, relativ zu einer Probe von Zellen, die das GPR86-Polypeptid exprimieren, aber nicht mit dem Kandidatormodulator behandelt wurden, oder relativ zu einer Probe von Zellen, die kein GPR86-Polypeptid exprimieren (leer-transformierte Zellen), aber mit dem Kandidatenmodulator behandelt wurden, um 10 % oder mehr ansteigt oder abfällt.

[0140] Wenn der Assay in Abwesenheit von ADP ausgeführt wird, kann der Assay verwendet werden, um einen Agonisten der GPR86-Aktivität zu identifizieren. Wenn der Assay in Anwesenheit von ADP ausgeführt wird, kann er verwendet werden, um auf einen Antagonisten zu testen.

b. Adenylatzyklase-Assay:

[0141] Assays auf Adenylatzyklase-Aktivität sind von Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20:585-591 beschrieben. Dieser Assay ist eine Modifikation des von Solomon et al., 1974, Anal. Biochem. 58:541-548 gelehrten Assays. Kurzgesagt: 100 μ l-Reaktionen enthalten 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$, 20 mM Kreatinphosphat (Dinatriumsalz), 10 Einheiten Kreatinphosphokinase (71 μ g Protein), 1 mM α - ^{32}P -ATP (Tetranatriumsalz, 2 μ Ci), 0,5 mM zyklisches AMP, G- 3H -markiertes zyklisches AMP (etwa 10.000 cpm), 0,5 mM Ro-20-1724, 0,25 % Ethanol und 50-200 μ g des zu testenden Proteinhomogenats (d.h. ein Homogenat von Zellen, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren oder nicht exprimieren, die mit ADP entweder behandelt oder nicht behandelt wurden, mit oder ohne einen Kandidatenmodulator). Die Reaktionsgemische werden im Allgemeinen bei 37°C 6 Minuten lang inkubiert. Nach der Inkubation werden die Reaktionsgemische durch die Zugabe von 0,9 ml kalter 6 %-iger Trichloressigsäure deproteinisiert. Die Reaktionsröhrchen werden bei 1800 \times g 20 Minuten lang zentrifugiert und jede Überstandslösung wird auf eine Dowex AGSOW-X4-Säule aufgetragen. Die cAMP-Fraktion wird mit 4 ml 0,1 mM Imidazol-HCl (pH 7,5) von der Säule in ein Zählröhrchen eluiert. Die Assays sollten in 3-fach-Tests ausgeführt werden. Kontrollreaktionen sollten ebenfalls unter Verwendung von Proteinhomogenat von Zellen ausgeführt werden, die kein GPR86-Polypeptid exprimieren.

[0142] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die Adenylatzyklase-Aktivität „verändert“, wenn sie in einer Probe, die von Zellen genommen wurde, die mit einem Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität behandelt wurden, relativ zu einer ähnlichen Probe von Zellen, die nicht mit dem Kandidatenmodulator behandelt wurden, oder relativ zu einer Probe von Zellen, die kein GPR86-Polypeptid exprimieren (leer-transfizierte Zellen), aber mit dem Kandidatenmodulator behandelt wurden, um 10 % oder mehr ansteigt oder abnimmt.

c. cAMP-Assay:

[0143] Intrazelluläres oder extrazelluläres cAMP wird unter Verwendung eines cAMP-Radioimmunoassays (RIA) oder eines cAMP-bindenden Proteins gemäß Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, gemessen. Beispielsweise beschreiben Horton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41:91-105 einen RIA für cAMP.

[0144] Eine Anzahl von Kits für die Messung von cAMP sind kommerziell erhältlich, wie der High Efficiency Fluorescence Polarization-beruhende homogene Assay, der von LJI Biosystems und NEN Life Science Products vermarktet wird. Kontrollreaktionen unter Verwendung von Extrakten von leer-transfizierten Zellen sollten

ausgeführt werden, um mögliche unspezifische Effekte einiger Kandidatenmodulatoren auszuschließen.

[0145] Das Niveau von cAMP ist „verändert“, wenn das Niveau von cAMP, das in Zellen nachgewiesen wird, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren und mit einem Kandidatenmodulator der GPR86-Aktivität behandelt wurden (oder in Extrakten solcher Zellen), unter Verwendung des RIA-beruhenden Assays von Horton & Baxendale, 1995, supra, um wenigstens 10 % ansteigt oder abnimmt, relativ zu dem cAMP-Niveau in ähnlichen Zellen, die nicht mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden.

d. Phospholipidabbau, DAG-Produktion und Inositol-Triphosphat-Niveaus:

[0146] Rezeptoren, die den Abbau von Phospholipiden aktivieren, können auf Veränderungen überwacht werden, die auf der Aktivität von bekannten oder vermeintlichen Modulatoren von GPR86 beruhen, indem der Phospholipidabbau und die daraus resultierende Produktion des sekundären Botenstoffs DAG und/oder von Inositol-Triphosphat (IP₃) überwacht wird. Verfahren zum Nachweis von diesen sind in Phospholipid Signalling Protocols, herausgegeben von Ian M. Bird, Totowa, NJ, Humana Press, 1998, beschrieben. Siehe auch Rudolph et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:11824-11831, die ebenfalls einen Assay für den Abbau von Phosphatidylinositol beschreiben. Die Assays sollten unter Verwendung von Zellen oder Extrakten von Zellen ausgeführt werden, die GPR86 exprimieren, die mit ADP entweder behandelt oder nicht behandelt sind, mit oder ohne einen Kandidatenmodulator. Kontrollreaktionen sollten unter Verwendung von leer-transfizierten Zellen oder Extrakten von diesen ausgeführt werden, um mögliche unspezifische Effekte einiger Kandidatenmodulatoren auszuschließen.

[0147] Gemäß der vorliegenden Erfindung sind der Phosphatidylinositol-Abbau und die Diacylglycerin- und/oder Inositol-Trisphosphat-Niveaus „verändert“, wenn sie in einer Probe von Zellen, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren und mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, relativ zu dem Niveau, das in einer Probe von Zellen beobachtet wird, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren, das nicht mit dem Kandidatenmodulator behandelt wurde, um wenigstens 10 % ansteigen oder abfallen.

e. PKC-Aktivierungsassa

[0148] Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinasen können ein Signal über einen Reaktionsweg weiterleiten, an dem die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) beteiligt ist, die eine Familie von Phospholipid- und Kalzium-aktivierten Proteinkinasen darstellt. Eine PKC-Aktivierung resultiert letztendlich in der Transkription einer Reihe von Protoonkogenen Transkriptionsfaktorkodierenden Genen, einschließlich c-fos, c-myc und c-jun, Proteasen, Proteaseinhibitoren, einschließlich Kollagenase Typ I und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, und Adhäsionsmoleküle, einschließlich intrazelluläres Adhäsionsmolekül I (ICAM I). Assays, die darauf ausgerichtet sind, den Anstieg von Genprodukten nachzuweisen, der von einer PKC induziert wird, können verwendet werden, um die PKC-Aktivierung und damit die Rezeptoraktivität zu überwachen. Darüber hinaus kann die Aktivität von Rezeptoren, die die Signale über PKC weitergeben, durch die Verwendung von Reportergenkonstrukten überwacht werden, die von den Kontrollsequenzen der Gene angetrieben werden, die von einer PKC-Aktivierung aktiviert werden. Dieser Typ von Reportergen basiertem Assay wird unten im Detail erläutert.

[0149] Für eine direktere Messung der PKC-Aktivität kann das Verfahren von Kikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:13341 verwendet werden. Dieser Assay misst die Phosphorylierung eines PKC-Substratpeptids, das nachfolgend durch Bindung an Phosphozellulosepapier abgetrennt wird. Dieses PKC-Assay-System kann verwendet werden, um die Aktivität aufgereinigter Kinase oder die Aktivität in rohen Zellextrakten zu messen. Eine Proteinkinase C-Probe kann in 20 mM HEPES/2 mM DTT direkt vor Ausführung des Assays verdünnt werden.

[0150] Das Substrat für den Assay ist das Peptid Ac-FKKSFKL-NH₂, das von dem myristoylierten alaninreichen Proteinkinase C-Substratprotein (MARCKS) abstammt. Der K_m des Enzyms für dieses Peptid ist etwa 50 µM. Andere basische Proteinkinase C-selektive Peptide, die im Stand der Technik bekannt sind, können ebenfalls verwendet werden, bei einer Konzentration von wenigstens 2 bis 3 Mal ihrem K_m. Kofaktoren, die für den Assay benötigt werden, beinhalten Kalzium, Magnesium, ATP, Phosphatidylserin und Diacylglycerin. In Abhängigkeit von der Absicht des Verwenders, kann der Assay ausgeführt werden, um die Menge von PKC zu bestimmen, die vorhanden ist (aktivierende Bedingungen) oder die Menge aktiver PKC, die vorhanden ist (nicht-aktivierende Bindungen). Für die meisten Zwecke gemäß der vorliegenden Erfindung werden nicht-aktivierende Bedingungen verwendet werden, so dass die PKC, die in der Probe aktiv ist, wenn sie isoliert wird, gemessen wird, eher als dass die PKC gemessen wird, die aktiviert werden kann. Für nicht-aktivierende Bedingungen wird Kalzium zugunsten EGTA aus dem Assay weggelassen.

[0151] Der Assay wird in einem Gemisch ausgeführt, der 20 mM HEPES; pH 7,4, 1-2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 µM ATP, ~1 µCi γ-³²-P-ATP, 100 µg/ml Peptidsubstrat (~100 µM), 140 µM/3,8 µM Phosphatidylserin/Diacylglycerin-Membranen und 100 µM Kalzium (oder 500 µM EGTA) enthält. 48 µl der Probe, verdünnt in 20 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM DTT wird in einem finalen Reaktionsvolumen von 80 µl verwendet. Die Reaktionen werden bei 30°C 5–10 Minuten lang ausgeführt, gefolgt von der Zugabe von 25 µl 100 mM ATP, 100 mM EDTA, pH 8,0, was die Reaktionen beendet.

[0152] Nachdem die Reaktion beendet ist, wird ein Teil (85 µl) jeder Reaktion auf einen Whatman P81-Zellulosephosphatfilter aufgetropft, gefolgt durch folgende Waschschriffe: 4 Mal 500 ml in 0,4 % Phosphorsäure (5–10 min. pro Waschschriff); und einem finalen Waschschriff in 500 ml 95 % EtOH, 2-5 min. lang. Gebundene Radioaktivität wird durch Szintillationszählung gemessen. Die spezifische Aktivität (cpm/nmol) des markierten ATP wird bestimmt, indem eine Probe der Reaktion auf P81-Papier aufgetropft wird und ohne Waschschriffe gezählt wird. Die Einheiten der PKC-Aktivität, definiert als nmol Phosphat, das pro min. transferiert wird, werden wie folgt berechnet:

Die Aktivität, in EINHEITEN (nmol/min) ist:

$$= \frac{(\text{cpm auf Papier}) \times (105 \mu\text{l gesamt} / 85 \mu\text{l aufgetropft})}{(\text{Assayzeit, min.}) (\text{spezifische Aktivität von ATP cpm/nmol})}$$

[0153] Ein alternativer Assay kann unter Verwendung eines Proteinkinase C-Assaykits, der von PanVera (Kat.-Nr. P2747) verkauft wird, ausgeführt werden.

[0154] Die Assays werden mit Extrakten von Zellen ausgeführt, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren, entweder mit ADP behandelt oder nicht behandelt wurden, mit oder ohne einen Kandidatenmodulator. Kontrollreaktionen sollten unter Verwendung leer-transfizierter Zellen, oder Extrakten aus diesen, ausgeführt werden, um mögliche unspezifische Effekte einiger Kandidatenmodulatoren auszuschließen.

[0155] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die PKC-Aktivität durch einen Kandidatenmodulator „verändert“, wenn die PKC-Einheiten, die durch einen der oben beschriebenen Assays gemessen wurden, in Extrakten aus Zellen, die GPR86 exprimieren und mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, relativ zu einer Reaktion, die mit einer ähnlichen Probe von Zellen ausgeführt wurde, die nicht mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, um wenigstens 10 % ansteigt oder abnimmt.

f. Kinaseassays:

[0156] Die MAP-Kinaseaktivität kann unter Verwendung eines beliebigen von mehreren kommerziell erhältlichen Kits, zum Beispiel den p38 MAP-Kinase Assay Kit, der von New England Biolabs (Kat.-Nr. 9820) oder den FlashPlate™ MAP-Kinaseassays, die von Perkin-Elmer Life Sciences verkauft werden, untersucht werden.

[0157] Die MAP-Kinaseaktivität ist „verändert“, wenn das Niveau der Aktivität in einer Probe von Zellen, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren und mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, relativ zu einer MAP-Kinaseaktivität in einer Probe von ähnlichen Zellen, die nicht mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, um 10 % oder mehr ansteigt oder abfällt.

[0158] Direkte Assays für Tyrosin-Kinaseaktivität unter Verwendung bekannter synthetischer oder natürlicher Tyrosin-Kinasesubstrate und markiertem Phosphat sind wohlbekannt, genauso wie ähnliche Assays für andere Kinasentypen (z.B. Ser/Thr-Kinasen). Kinaseassays können sowohl mit aufgereinigten Kinasen als auch Rohextrakten ausgeführt werden, die von Zellen zubereitet wurden, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren, die entweder mit ADP behandelt oder nicht behandelt wurden, mit oder ohne einen Kandidatenmodulator. Kontrollreaktionen sollten unter Verwendung leer-transfizierter Zellen, oder Extrakte aus diesen ausgeführt werden, um mögliche unspezifische Effekte einiger Kandidatenmodulatoren auszuschließen. Substrate können entweder Proteine voller Länge oder synthetische Peptide sein, die das Substrat darstellen. Pinna & Ruzzene (1996, Biochem. Biophys. Acta 1314:191–225) listen eine Anzahl von Substratstellen für Phosphorylierung auf, die für den Nachweis von Kinaseaktivitäten nützlich sind. Eine Anzahl von Kinasesubstratpeptiden ist kommerziell erhältlich. Eines, das besonders nützlich ist, ist das „Src-verwandte Peptid“, RRLIEDAEYAARG (erhältlich von Sigma Nr. A7433), das ein Substrat für viele Rezeptor- und nicht Rezeptor-Tyrosinkinasen ist. Weil der unten beschriebene Assay die Bindung von Peptidsubstraten an Filter benötigt, sollten die Peptidsubstrate eine positive Nettoladung aufweisen, um die Bindung zu erleichtern. Im Allgemeinen sollten Peptidsubstrate wenigstens zwei basische Reste und einen freien Aminoterminus besitzen. Reaktionen verwenden im Allgemei-

nen eine Peptidkonzentration von 0,7 bis 1,5 mM.

[0159] Die Assays werden im Allgemeinen in einem 25 µl-Volumen ausgeführt, das 5 µl eines 5X Kinasepuffers (5 mg/ml BSA, 150 mM Tris-HCl(pH 7,5), 100 mM MgCl₂; in Abhängigkeit von der Kinase, die untersucht wird, kann MnCl₂ anstelle von oder zusätzlich zu MgCl₂ verwendet werden), 5 µl 1,0 mM ATP (0,2 mM Endkonzentration), γ-³²P-ATP (100-500 cpm/pmol), 3 µl 10 mM Peptidsubstrat (1,2 mM Endkonzentration), Zellextrakt, der die zu testende Kinase enthält, (Zellextrakte, die für Kinaseassays verwendet werden, sollten einen Phosphataseinhibitor enthalten (z.B. 0,1-1 mM Natriumorthovanadat)) und H₂O auf 25 µl umfasst. Die Reaktionen werden bei 30°C ausgeführt und werden durch die Zugabe des Zellextrakts initiiert.

[0160] Kinasereaktionen werden 30 Sekunden bis etwa 30 Minuten lang ausgeführt, gefolgt von der Zugabe von 45 µl eiskalter 10 %-iger Trichloressigsäure (TCA). Die Proben werden 2 Minuten lang in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, und 35 µl des Überstands werden auf Whatman P81-Zellulosephosphat-Filterkreise aufgetropft. Die Filter werden 3 Mal mit 500 ml kalter 0,5 %-iger Phosphorsäure gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift mit 200 ml Azeton bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Die Filter werden getrocknet und eingebautes ³²P wird durch Szintillationszählung gemessen. Die spezifische Aktivität von ATP in der Kinasereaktion (z.B. in cpm/pmol) wird bestimmt, indem eine kleine Probe (2-5 µl) der Reaktion auf einen P81-Filterkreis aufgetropft und direkt, ohne Waschschriffe, gezählt wird. Die Zähler pro Minute, die in der Kinasereaktion erhalten wurden (minus Leerwert) werden anschließend durch die spezifische Aktivität geteilt, um die Mole von Phosphat, die in der Reaktion transferiert wurden, zu bestimmen.

[0161] Die Tyrosinkinase-Aktivität ist „verändert“, wenn das Niveau der Kinase-Aktivität in einer Probe von Zellen, die ein GPR86-Polypeptid exprimieren und die mit einem Kandidatenmodulator behandelt wurden, relativ zur Kinase-Aktivität in einer Probe von ähnlichen Zellen, die nicht mit dem Kandidatenmodulator behandelt wurden, um 10 % oder mehr ansteigt oder abfällt.

g. Transkriptionsreporter für Aktivierung des stromabwärts liegenden Reaktionswegs:

[0162] Das durch die Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor, z.B. GPR86, initiierte intrazelluläre Signal setzt eine Kaskade intrazellulärer Ereignisse in Gang, deren letztendliche Konsequenz eine schnelle und nachweisbare Veränderung in der Transkription oder Translation von einem oder mehreren Genen ist. Die Aktivität des Rezeptors kann daher durch Nachweis der Expression eines Reportergens überwacht werden, das durch Kontrollsequenzen angetrieben wird, die auf eine GPR86-Aktivierung reagieren.

[0163] Wie hierin verwendet bezeichnet „Promotor“ die transkriptionellen Kontrollelemente, die für eine Rezeptor-vermittelte Regulation von Genexpression benötigt werden, einschließlich nicht nur des basalen Promotors, sondern auch beliebigen Enhancern oder Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die für eine Rezeptor-regulierte Expression notwendig sind. Durch Auswahl von Promotoren, die auf die intrazellulären Signale, die aus einer Agonistenbindung resultieren, reagieren, und indem die ausgewählten Promotoren operativ mit Reportergenen verknüpft werden, deren Transkription, Translation oder letztendlich Aktivität leicht nachweisbar und messbar ist, stellt der transkriptionsberuhende Assay eine schnelle Anzeige bereit, ob ein gegebener Rezeptor aktiviert ist.

[0164] Reportergene wie Luciferase, CAT, GFP, β-Laktamase oder β-Galaktosidase sind im Stand der Technik wohlbekannt, genauso wie Assays zum Nachweis ihrer Produkte.

[0165] Gene, die besonders gut zur Überwachung von Rezeptoraktivität sind, sind die „immediate early“-Gene, die schnell induziert werden – im Allgemeinen innerhalb von Minuten nach dem Kontakt zwischen dem Rezeptor und dem Effektorprotein oder Liganden. Die Induktion der immediate early-Gentranskription benötigt keine Synthese von neuen regulatorischen Proteinen. Zusätzlich zu einer schnellen Reaktivität gegenüber einer Ligandenbindung, beinhalten Charakteristika von bevorzugten Genen, die für die Herstellung von Reporterkonstrukten nützlich sind: Geringe oder nicht nachweisbare Expression in ruhenden Zellen; Induktion, die transient und von neuer Proteinsynthese unabhängig ist; die nachfolgende Beendigung der Transkription benötigt eine neue Proteinsynthese; und mRNAs, die von diesen Genen ausgehend transkribiert werden, besitzen eine kurze Halbwertszeit. Es ist bevorzugt, aber nicht notwendig, dass ein transkriptionelles Kontrollelement alle diese Eigenschaften haben muss, um nützlich zu sein.

[0166] Ein Beispiel eines Gens, das auf eine Anzahl von unterschiedlichen Stimuli reagiert, ist das c-fos Protoonkogen. Das c-fos-Gen wird in einer von Proteinsynthese unabhängigen Art und Weise durch Wachstumsfaktoren, Hormone, differenzierungsspezifische Wirkstoffe, Stress und andere bekannte Induktoren von Zello-

berflächenproteinen aktiviert. Die Induktion der c-fos-Expression ist außerordentlich schnell und tritt oft innerhalb von Minuten nach der Rezeptorstimulation auf. Dieses Charakteristikum macht die regulatorischen Regionen von c-fos besonders attraktiv für eine Verwendung als ein Reporter der Rezeptoraktivierung.

[0167] Die regulatorischen Elemente von c-fos beinhalten (siehe Verma et al., 1987, Cell 51:513–514) eine TATA-Box, die für die Transkriptionsinitiierung benötigt wird; zwei stromaufwärts gelegene Elemente für die basale Transkription und einen Enhancer, der ein Element mit Dyadensymmetrie beinhaltet und der für eine Induktion durch TPA, Serum, EGF und PMA benötigt wird.

[0168] Das 20 bp lange transkriptionelle Enhancerelement von c-fos, das zwischen den Positionen –317 und –298 bp stromaufwärts der mRNA-Cap-Stelle von c-fos gelegen ist, ist für die Seruminduktion in Serum-ausgehungenen NIH 3T3-Zellen essenziell. Eines der beiden stromaufwärts gelegenen Elemente ist an der Position –63 bis –57 gelegen und ähnelt der Konsensussequenz für cAMP-Regulation.

[0169] Der Transkriptionsfaktor CREB (zyklisches AMP reaktives Element-Bindungsprotein) reagiert, wie der Name nahe legt, auf das Niveau von intrazellulärem cAMP. Daher kann die Aktivierung eines Rezeptors, der über die Modulation des cAMP-Niveaus sein Signal weiterleitet, überwacht werden, indem entweder die Bindung des Transkriptionsfaktors oder die Expression eines Reportergens, das mit einem CREB-bindenden Element verbunden ist, (das CRE- oder cAMP-reaktive Element genannt wird) nachgewiesen wird. Die DNA-Sequenz des CRE ist TGACGTCA. Reporterkonstrukte, die auf die CREB-Bindungsaktivität reagieren, sind in US-Patent Nr. 5,919,649 beschrieben.

[0170] Andere Promotoren und transkriptionelle Kontrollelemente, zusätzlich zu den c-fos-Elementen und CREB-reaktiven Konstrukten, beinhalten den Promotor des vasoaktiven Intestinalpeptid (VIP)-Gens (cAMP-reaktiv; Fink et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:6662–6666); den Promotor des Somatostatingens (cAMP-reaktiv; Montminy et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:6682–6686); den Proenkephalinpromotor (reagiert auf cAMP, nikotinische Agonisten und Phorbol ester; Comb et al., 1986, Nature 323:353–356); den Promotor des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)-Gens (cAMP-reaktiv; Short et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:9721–9726).

[0171] Zusätzliche Beispiele von transkriptionellen Kontrollelementen, die auf Änderungen in der GPCR-Aktivität reagieren, beinhalten diejenigen, die auf den Transkriptionsfaktor AP-1 reagieren, und diejenigen, die auf NF-κB-Aktivität reagieren, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Konsensus-AP-1-Bindungsstelle ist das Palindrom TGA(C/G)TCA (Lee et al., 1987, Nature 325:368–372; Lee et al., 1987, Cell 49:741–752). Die AP-1-Stelle ist auch für die Vermittlung der Induktion durch Tumorpromotoren, wie dem Phorbol ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-β-Azetat (TPA), verantwortlich und wird daher auch manchmal als TRE für TPA-reaktives Element bezeichnet. AP-1 aktiviert eine Anzahl von Genen, die an der frühen Reaktion von Zellen auf Wachstumsstimuli beteiligt sind. Beispiele für AP-1-reaktive Gene beinhalten die Gene für Fos und Jun (deren Proteine selbst AP-1-Aktivität hervorrufen), Fos-verwandte Antigene (Fra) 1 und 2, IκBα, Ornithindecaboxylase und die Annexine I und II, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0172] Das NF-κB-bindende Element weist die Konsensussequenz GGGACTTTCC auf. Eine große Anzahl von Genen wurde als NF-κB-reaktiv identifiziert, und ihre Kontrollelemente können mit einem Reportergen verbunden werden, um GPCR-Aktivität zu überwachen. Eine kleine Auswahl von Genen, die auf NF-κB reagieren, beinhaltet diejenigen, die für IL-1β (Hiscott et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:6231–6240), TNF-α (Shakhov et al., 1990, J. Exp. Med. 171:35–47), CCR5 (Liu et al., 1998, AIDS Res. Hum. Retroviruses 14:1509–1519), P-Selektion (Pan & McEver, 1995, J. Biol. Chem. 270:23077–23083), Fas-Ligand (Matsui et al., 1998, J. Immunol. 161:3469–3473), GM-CSF (Schreck & Baeuerle, 1990, Mol. Cell. Biol. 10:1281–1286) und IκBα (Haskill et al., 1991, Ce1165:1281–1289) kodieren. Vektoren, die NF-κB-reaktive Reporter kodieren sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt oder können leicht vom Fachmann unter Verwendung von synthetischen NF-κB-Elementen und einem Minimalpromotor, oder unter Verwendung der NF-κB-reaktiven Sequenzen eines Gens, von dem man weiß, dass es einer NF-κB-Regulation unterliegt, hergestellt werden. Ferner sind NF-κB-reaktive Reporterkonstrukte kommerziell von beispielsweise CLONTECH erhältlich.

[0173] Ein gegebenes Promotorkonstrukt sollte getestet werden, indem GPR86-exprimierende Zellen, die mit dem Konstrukt transfiziert wurden, ADP ausgesetzt werden. Ein wenigstens zweifacher Anstieg in der Expression des Reporters in Reaktion auf ADP zeigt an, dass der Reporter ein Indikator der GPR86-Aktivität ist.

[0174] Um GPR86-Aktivität mit einem ADP-reaktiven transkriptionellen Reporterkonstrukt zu untersuchen, werden Zellen, die ein GPR86-Polypeptid stabil exprimieren, stabil mit dem Reporterkonstrukt transfiziert. Um

nach Agonisten zu durchmustern, werden die Zellen unbehandelt belassen, Kandidatenmodulatoren ausgesetzt oder ADP ausgesetzt, und die Expression des Reporters wird gemessen. Die ADP-behandelten Kulturen dienen als Standard für das Niveau der Transkription, das von einem bekannten Agonisten induziert wird. Ein Anstieg von wenigstens 50 % in der Reporterexpression in Anwesenheit eines Kandidatenmodulators zeigt an, dass der Kandidat ein Modulator der GPR86-Aktivität ist. Ein Agonist wird wenigstens soviel, dieselbe Menge oder mehr, Reporterexpression induzieren wie ADP alleine. Dieser Ansatz kann auch verwendet werden, um nach inversen Agonisten zu durchmustern, wo die Zellen ein GPR86-Polypeptid auf einem Niveau exprimieren, so dass eine erhöhte Basalaktivität des Reporters in Anwesenheit von ADP oder eines anderen Agonisten vorhanden ist. Eine Abnahme der Reporteraktivität um 10 % oder mehr in Anwesenheit eines Kandidatenmodulators relativ zu seiner Abwesenheit zeigt an, dass die Verbindung ein inverser Agonist ist.

[0175] Um nach Antagonisten zu durchmustern, werden Zellen, die GPR86 exprimieren und das Reporter-konstrukt tragen, ADP (oder einem anderen Agonisten) in Anwesenheit und Abwesenheit eines Kandidatenmodulators ausgesetzt. Eine Abnahme von 10 % oder mehr der Reporterexpression in Anwesenheit des Kandidatenmodulators relativ zur Abwesenheit des Kandidatenmodulators zeigt an, dass der Kandidat ein Modulator der GPR86-Aktivität ist.

[0176] Kontrollen für Transkriptionsassays beinhalten Zellen, die kein GPR86 exprimieren, sondern das Reporter-konstrukt tragen, sowie Zellen mit einem promotorlosen Reporter-konstrukt. Verbindungen, die als Modulatoren der GPR86-regulierten Transkription identifiziert werden, sollten auch analysiert werden, um zu bestimmen, ob sie die Transkription beeinflussen, die von anderen regulatorischen Sequenzen und anderen Rezeptoren angetrieben werden, um die Spezifität und das Spektrum ihrer Aktivität zu bestimmen.

[0177] Der transkriptionelle Reporterassay, und die meisten zellbasierten Assays, sind für die Durchmusterung von Expressionsbanken für Proteine gut geeignet, nach solchen, die GPR86-Aktivität modulieren. Die Banken können beispielsweise cDNA-Banken von natürlichen Quellen z.B. von Pflanzen, Tieren, Bakterien, etc. sein, oder sie können Banken sein, die zufällig oder systematisch mutierte Varianten von einem oder mehreren Polypeptiden exprimieren. Genomische Banken in viralen Vektoren können auch verwendet werden, um den mRNA-Gehalt einer Zelle oder eines Gewebes in den verschiedenen Banken zu exprimieren, die für die Durchmusterung von GPR86 verwendet werden.

h. Inositolphosphat-(IP)-Messung:

[0178] Erfindungsgemäße Zellen, zum Beispiel 1321N1-Zellen, werden 24 Stunden lang mit 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Inositol in inositolfreiem DMEM markiert, das 5 % FCS, Antibiotika, Amphotericin, Natriumpyruvat und 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 enthält. Die Zellen werden 2 Stunden lang in Krebs-Ringer Hepes (KRH)-Puffer der folgenden Zusammensetzung inkubiert (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM MgSO_4 , 1,45 mM CaCl_2 , 1,25 mM KH_2PO_4 , 25 mM Hepes (pH 7,4) und 8 mM Glukose). Die Zellen werden dann verschiedenen Nukleotiden 30 s lang ausgesetzt. Die Inkubation wird durch die Zugabe von eiskalter 3 %-iger Perchlorsäurelösung gestoppt. IP werden extrahiert und auf Dowex-Säulen wie zuvor beschrieben (25) aufgetrennt. 2MeSATP und ATP-Lösungen (1 mM) werden bei Raumtemperatur mit 20 Einheiten/ml CPK und 90 min. mit 10 mM CP behandelt, um Probleme zu umgehen, die aus der Kontamination und Degradierung von Triphosphatnukleotidlösungen erwachsen.

II. GPR86-Assay

[0179] Die vorliegende Erfindung stellt einen Assay für den Nachweis der Aktivität eines erfindungsgemäßen Rezeptors in einer Probe bereit. Beispielsweise kann die GPR86-Aktivität in einer Probe gemessen werden, die eine Zelle oder eine Zellmembran umfasst, die GPR86 exprimiert. Der Assay wird ausgeführt, indem die Probe in Anwesenheit oder Abwesenheit von ADP inkubiert wird und ein Sekundärer-Botenstoff-Assay, wie oben beschrieben, ausgeführt wird. Die Ergebnisse des Sekundärer-Botenstoff-Assays, der in Anwesenheit oder Abwesenheit von ADP ausgeführt wurde, werden verglichen, um zu bestimmen, ob der GPR86-Rezeptor aktiv ist. Ein Anstieg von 10 % oder mehr im nachgewiesenen Niveau eines gegebenen sekundären Botenstoffs, wie er hierin definiert ist, in Anwesenheit von ADP relativ zu der Menge, die in einem Assay nachgewiesen wird, der in Abwesenheit von ADP ausgeführt wird, zeigt eine GPR86-Aktivität an.

[0180] Jeder dieser Assays der Rezeptoraktivität, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, GTP-Bindungs-, GTPase-, Adenylatzyklase-, cAMP-, Phospholipid-Abbau-, Diacylglycerin-, Inositoltriphosphat-, Arachidonsäurefreisetzungs- (siehe unten), PKC-, Kinase- und transkriptionelle Reporterassays kann verwendet werden, um die Anwesenheit eines Agens in einer Probe, z.B. in einer Gewebeprobe, zu bestimmen, das die Aktivität des GPR86-Rezeptormoleküls beeinflusst. Um dies zu tun, wird das GPR86-Polypeptid auf Aktivität in Anwesen-

heit und Abwesenheit der Probe oder eines Extrakts der Probe untersucht. Ein Anstieg der GPR86-Aktivität in Anwesenheit der Probe oder des Extrakts relativ zur Abwesenheit der Probe zeigt an, dass die Probe einen Agonisten der Rezeptoraktivität enthält. Ein Abfall der Rezeptoraktivität in Anwesenheit von ADP oder eines anderen Agonisten und der Probe relativ zur Rezeptoraktivität in Anwesenheit von ADP allein, zeigt an, dass die Probe einen Antagonisten der GPR86-Aktivität enthält. Wenn erwünscht, können die Proben anschließend fraktioniert und weiter getestet werden, um den Agonisten oder Antagonisten zu isolieren oder aufzureinigen. Die Menge des Anstiegs oder Abfalls der gemessenen Aktivität, die notwendig ist, um von einer Probe sagen zu können, dass sie einen Modulator enthält, hängt von der Art des verwendeten Assays ab. Im Allgemeinen zeigt eine 10 %-ige oder größere Änderung (Anstieg oder Abfall) relativ zu einem Assay, der in Abwesenheit einer Probe ausgeführt wurde, die Anwesenheit eines Modulators in der Probe an. Eine Ausnahme ist der transkriptionelle Reporterassay, in dem wenigstens ein zweifacher Anstieg oder ein 10 %-iger Abfall des Signals notwendig ist, damit man von einer Probe sagen kann, dass sie einen Modulator enthält. Ein Agonist kann wenigstens 50 % oder 75 % oder 100 % oder mehr, z.B. 2-fach, 5-fach, 10-fach oder mehr, die Rezeptoraktivierung stimulieren als mit ADP alleine.

[0181] Andere funktionale Assays enthalten zum Beispiel Mikrophysiometer- oder Biosensor-Assays (siehe Hafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15:149–158). Das intrazelluläre Arachinoidsäureniveau kann auch wie in Gijon et al., 2000, J. Biol. Chem., 275:20146–20156 bestimmt werden.

[0182] Demgemäß kann ein Verfahren für den Nachweis von GPR86-Aktivität in einer Probe die Schritte der Inkubation einer Probe, die GPR86 und ADP umfasst, unter Bedingungen, welche die Bindung von GPR86 und ADP erlauben, und des Nachweises eines sekundären Botenstoffs umfassen. Gegebenenfalls umfasst dieses Verfahren weiter die Schritte der Inkubation einer zweiten Probe, die GPR86 umfasst, in Abwesenheit von ADP unter Bedingungen, welche die Bindung von GPR86 und ADP erlauben, und des Nachweises eines sekundären Botenstoffs. Die Probe kann Zellen umfassen, die GPR86 exprimieren, oder Zellmembranen, die GPR86 tragen. Alternativ kann die Inkubation in oder auf virusinduzierten Knospungsmembranen, die das GPR86-Polypeptid enthalten, ausgeführt werden.

III. Diagnostische Assays, die auf der Interaktion von GPR86 und ADP beruhen

[0183] Die Signalgabe durch GPCRs ist in der Pathologie einer großen Anzahl von Krankheiten und Störungen beteiligt. GPR86, das in Zellen der Lymphozytenlinien, Blutplättchen, Milz- sowie leukämischen Zellen exprimiert wird, kann eine Rolle in Immunprozessen, Krebs, Thrombose und assoziierten Störungen oder Erkrankungen spielen. Das GPR86-Expressionsmuster beinhaltet auch das Gehirn und legt weiter eine potenzielle Rolle als ein ADP-Neurotransmitter nahe.

[0184] Das Expressionsmuster von GPR86 und das Wissen in Bezug auf Störungen, die im Allgemeinen von GPCRs vermittelt werden, legt nahe, dass GPR86 an Störungen der Zellmigration, bei Krebs, der Entwicklung von Tumoren und Tumormetastasierung, entzündlichen und neoplastischen Prozessen, Wund- und Knochenheilung und Fehlfunktion von regulatorischen Wachstumsfunktionen, Diabetes, Fettsucht, Anorexie, Bulimie, akutem Herzversagen, niedrigem Blutdruck, Bluthochdruck, Harnverhaltung, Osteoporose, Angina pectoris, Myokardinfarkt, Restenose, Atherosklerose, Thrombose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmun- und entzündlichen Erkrankungen, Erkrankungen, die durch eine exzessive Proliferation glatter Muskelzellen charakterisiert sind, Aneurysmen, Erkrankungen, die durch einen Verlust an glatten Muskelzellen oder reduzierter Proliferation glatter Muskelzellen charakterisiert sind, Schlaganfall, Ischämie, Geschwüren, Allergien, gutartiger Prostatahypertrophie, Migräne, Erbrechen, psychotischen und neurologischen Störungen, einschließlich Angstzuständen, Schizophrenie, manischer Depression, Depression, Delirium, Demenz und ernster mentaler Retardation, degenerativen Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen wie die Alzheimer Krankheit oder M. Parkinson und Dyskinesie wie Chorea Huntington oder das Gilles de la Tourette-Syndrom und anderen verwandten Erkrankungen einschließlich Thrombose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmun- und Entzündungserkrankungen beteiligt sein kann.

[0185] Die Interaktion von GPR86 mit ADP kann als eine Grundlage für Assays für die Diagnose oder die Überwachung von Erkrankungen, Störungen oder Prozessen, die eine GPR86-Signalgabe umfassen, verwendet werden. Diagnostische Assays für GPR86-verwandte Erkrankungen oder Störungen können mehrere verschiedene Formen haben. Erstens können diagnostische Assays die Menge von GPR86, Genen oder mRNA in einer Gewebeprobe messen. Assays, welche die Menge von mRNA messen, die das GPR86-Polypeptid kodiert, gehören ebenso in diese Kategorie. Zweitens können Assays die Qualitäten des Rezeptors oder der Liganden evaluieren.

[0186] Beispielsweise können Assays, die bestimmen, ob ein Individuum eine mutante oder variante Form von GPR86 oder eines Polypeptidliganden exprimiert, diagnostisch verwendet werden. Drittens können Assays, die eine oder mehrere Aktivitäten des GPR86-Polypeptids messen, diagnostisch verwendet werden.

A. Assays, welche die Menge von GPR86 messen

[0187] GPR86-Niveaus können gemessen und mit Standards verglichen werden, um zu bestimmen, ob in der Probe eine anormale Konzentration des Rezeptors oder seines Liganden vorliegt, was beides eine wahrscheinliche Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 anzeigt. Polypeptid-Niveaus werden beispielsweise durch Immunohistochemie unter Verwendung von Antikörpern gemessen, die für das Polypeptid spezifisch sind. Eine Probe, die von einem Individuum isoliert wurde, von dem angenommen wird, dass es an einer Erkrankung oder Störung leidet, die durch eine GPR86-Aktivität gekennzeichnet ist, wird mit einem Antikörper für GPR86 in Berührung gebracht, und die Bindung des Antikörpers wird, wie dies im Stand der Technik bekannt ist, gemessen (z.B. durch Messung der Aktivität eines Enzyms, das mit einem sekundären Antikörper konjugiert ist).

[0188] Ein anderer Ansatz für die Messung von GPR86-Konzentrationen verwendet eine durchflusszytometrische Analyse von Zellen eines betroffenen Gewebes. Verfahren der Durchflusszytometrie, einschließlich der fluoreszenten Markierung von Antikörpern, die für GPR86 spezifisch sind, sind im Stand der Technik wohlbekannt. Andere Ansätze beinhalten Radioimmunoassays oder ELISA. Verfahren für jeden dieser Ansätze sind im Stand der Technik ebenfalls wohlbekannt.

[0189] Die nachgewiesene Menge an Bindung wird mit der Bindung in einer Probe mit ähnlichem Gewebe von einem gesunden Individuum oder einer Probe von einem betroffenen Individuum, das nicht so betroffen ist, verglichen. Ein Anstieg von 10 % oder mehr relativ zum Standard ist für eine Erkrankung oder Störung, die von einer Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostisch.

[0190] Die GPR86-Expression kann auch durch die Bestimmung der Menge der mRNA gemessen werden, welche die Polypeptide in der Gewebeprobe kodieren. Niveaus von mRNA können durch quantitative oder semi-quantitative PCR gemessen werden. Verfahren der „quantitativen“ Amplifikation sind dem Fachmann wohlbekannt, und Primersequenzen für die Amplifikation von GPR86 sind hierin offenbart. Ein übliches Verfahren für quantitative PCR beinhaltet die gleichzeitige Koamplifikation einer bekannten Menge einer Kontrollsequenz unter Verwendung derselben Primer. Dies stellt einen internen Standard bereit, der verwendet werden kann, um die PCR-Reaktion zu kalibrieren. Detaillierte Protokolle für quantitative PCR werden in PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Academic Press, Inc. N.Y., (1990) bereitgestellt. Ein Anstieg von 10 % oder mehr in der Menge von mRNA, die GPR86 kodiert, in einer Probe relativ zu der Menge, die in einer Gewebeprobe exprimiert wird, die von einem ähnlichen Gewebe aus einem gesunden Individuum stammt oder in einer Gewebeprobe, die von einem unbetroffenen Bereich in einem betroffenen Individuum stammt, ist für eine Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostisch.

Qualitative Assays

[0191] Assays, die aufzeigen, ob das GPR86-Polypeptid oder die es kodierende mRNA wildtypisch ist oder nicht, können diagnostisch verwendet werden. Um eine Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation von GPR86 gekennzeichnet ist, auf diese Weise zu diagnostizieren, wird aus einer Probe isolierte RNA als eine Matrize für eine PCR-Amplifikation von GPR86 verwendet. Die amplifizierten Sequenzen werden anschließend unter Verwendung von Standardverfahren entweder direkt sequenziert oder zuerst in einen Vektor kloniert, gefolgt von einer Sequenzierung. Ein Unterschied in der Sequenz, der eine oder mehrere kodierte Aminosäuren relativ zu der Sequenz des wildtypischen GPR86 verändert, kann für eine Erkrankung oder eine Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostisch sein. Es kann nützlich sein, im Fall, dass eine Veränderung in der kodierenden Sequenz in einer Probe identifiziert wurde, den varianten Rezeptor oder Liganden zu exprimieren und seine Aktivität zu der von wildtypischem GPR86 zu vergleichen. Neben anderen Vorteilen kann dieser Ansatz neue Mutanten bereitstellen, einschließlich konstitutiv aktiven und Null-Mutanten.

[0192] Zusätzlich zu den Standardsequenzierungsverfahren können amplifizierte Sequenzen auf das Vorliegen spezifischer Mutationen getestet werden, indem zum Beispiel Hybridisierung von molekularen Sonden verwendet wird, die zwischen wildtypischen und varianten Sequenzen unterscheiden. Hybridisierungsassays, die auf der Basis von Änderungen unterscheiden, die so klein wie ein Nukleotidaustausch sind, sind im Stand

der Technik wohl bekannt. Alternativ kann eine beliebige Anzahl von „Minisequenzierungs“-Assays ausgeführt werden, einschließlich derer, die beispielsweise in den US-Patenten 5,888,819, 6,004,744 und 6,013,431 beschrieben sind. Diese Assays und andere, die im Stand der Technik bekannt sind, können in einer gegebenen Probe das Vorliegen einer Nukleinsäure mit einem bekannten Polymorphismus bestimmen.

[0193] Wenn erwünscht, können Array- oder Mikroarray-gestützte Verfahren verwendet werden, um die Expression oder das Vorliegen einer Mutation in GPR86-Sequenzen zu analysieren. Arraygestützte Verfahren zur Minisequenzierung und für die Quantifizierung einer Nukleinsäureexpression sind im Stand der Technik wohl bekannt.

C. Funktionalitätsassays

[0194] Die Diagnose einer Erkrankung oder Störung, die durch die Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, kann auch unter Verwendung von Funktionalitätsassays ausgeführt werden. Um dies zu tun, werden Zellmembranen oder Zellextrakte aus einer Gewebeprobe zubereitet und in einem Assay auf GPR86-Aktivität, wie er hierin beschrieben ist, verwendet (z.B. Ligandenbindungsassays, der GTP-Bindungsassay, GTPase-Assay, Adenylatzyklase-Assay, cAMP-Assay, Arachidonsäureniveau, Phospholipidabbau, Diacylglycerin- oder Inositoltriphosphat-Assays, PKC-Aktivierungs-Assay oder Kinase-Assay). Die nachgewiesene Aktivität wird mit der einer Standardprobe verglichen, die von einem gesunden Individuum entnommen wurde oder von einer nicht betroffenen Stelle des betroffenen Individuums. Als eine Alternative kann eine Probe oder ein Extrakt einer Probe mit Zellen in Berührung gebracht werden, die GPR86 exprimieren, gefolgt von einer Messung der GPR86-Signalgabeaktivität relativ zu einer Standardprobe. Ein Unterschied von 10 % oder mehr in der Aktivität, die in einem dieser Assays gemessen wird, relativ zu der Aktivität des Standards ist für eine Erkrankung oder Störung, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostisch.

Modulation der GPR86-Aktivität in einer erfindungsgemäßen Zelle

[0195] Die Entdeckung von ADP als ein Ligand von GPR86 stellt Verfahren bereit, die Aktivität eines GPR86-Polypeptids in einer Zelle zu modulieren. Die GPR86-Aktivität wird in einer Zelle moduliert, indem der Zelle ein Agens zugeführt wird, das die Funktion eines GPR86-Polypeptids moduliert. Diese Modulation kann in kultivierten Zellen als Teil eines Assays auf die Identifizierung zusätzlicher modulierender Agenzien ausgeführt werden, oder beispielsweise in einem Tier, einschließlich des Menschen. Agenzien beinhalten ADP und seine Analoga, wie sie hierin definiert sind, sowie zusätzliche Modulatoren, die unter Verwendung der Durchmusterungsverfahren, wie sie hierin beschrieben sind, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, der ADP-Analoga, die in US Pat. Nr. 5,700,786 präsentiert sind, identifiziert werden.

[0196] Einer Zelle kann ein Agens zugeführt werden, indem es dem Kulturmedium zugefügt wird. Die Menge, die zugeführt werden muss, wird mit der Identität des Agens variieren und mit dem Zweck, zu dem es zugeführt wird. Beispielsweise wird man in einem Kulturassay, um Antagonisten der GPR86-Aktivität zu identifizieren, im Allgemeinen eine Menge von ADP hinzufügen, welche die Rezeptoren halb-maximal aktiviert (z.B. etwa EC_{50}), beispielsweise ohne die Dosis zu überschreiten, die für eine Rezeptorsättigung benötigt wird. Diese Dosis kann bestimmt werden, indem die Menge an ADP titriert wird, um den Punkt zu bestimmen, an dem eine weitere Zugabe von ADP keinen zusätzlichen Effekt auf die GPR86-Aktivität besitzt.

[0197] Wenn ein Modulator der GPR86-Aktivität einem Tier für die Behandlung einer Erkrankung oder Störung verabreicht wird, kann die verabreichte Menge vom Fachmann auf Basis des erwünschten Resultats angepasst werden. Eine erfolgreiche Behandlung wird erreicht, wenn ein oder mehrere messbare Aspekte) der Pathologie (z.B. Tumorzellwachstum, Akkumulierung inflammatorischer Zellen) um wenigstens 10 % relativ zu dem Wert verändert wird/werden, wie er/sie hinsichtlich dieses Aspekts vor der Behandlung war/waren.

Erfindungsgemäße nützliche Modulatoren

[0198] Die vorliegende Erfindung stellt eine Verbindung bereit, die ein Modulator eines erfindungsgemäßen Rezeptors ist.

[0199] Ein Kandidatenmodulator kann ein Nukleotid sein oder ein Nukleotid, das an einen Zucker bindet, einschließlich ADP-Glukose oder ADP-Galaktose, ist aber nicht darauf beschränkt. Ein Kandidatenmodulator kann auch jedes ADP-Analogon sein, das im Stand der Technik bekannt ist, sowie jeder Ligand, der an den UDP-Glukose-Rezeptor bindet.

[0200] Die Kandidatenverbindung kann eine synthetische Verbindung, oder ein Gemisch von Verbindungen oder ein natürliches Produkt (z.B. ein Pflanzenextrakt oder ein Kulturüberstand) sein. Eine erfindungsgemäße Kandidatenverbindung beinhaltet ein kleines Molekül, das synthetisiert werden kann, einen natürlichen Extrakt, Peptide, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, etc.

[0201] Der Kandidatenmodulator kann beispielsweise ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP β S, Ap $_3$ A, RB-2, Suramin oder PPADS sein.

[0202] Kandidatenmodulatorverbindungen können aus großen Banken synthetischer oder natürlicher Verbindungen durchmustert werden. Zahlreiche Mittel werden zurzeit für die zufällige oder zielgerichtete Synthese von Saccharid-, Peptid- und Nukleinsäure-basierten Verbindungen verwendet. Banken synthetischer Verbindungen sind von einer Anzahl von Unternehmen kommerziell erhältlich, einschließlich beispielsweise Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) und Microsource (New Milford, CT). Eine seltene chemische Bank ist von Aldrich (Milwaukee, WI) erhältlich. Kombinatorische Banken sind erhältlich und können zubereitet werden. Alternativ sind Banken natürlicher Verbindungen in Form bakterieller, pilzlicher, pflanzlicher und tierischer Extrakte von z.B. Pan Laboratories (Bothell, WA) oder MycoSearch (NC) erhältlich, oder sind leicht mit im Stand der Technik bekannten Verfahren herzustellen. Darüber hinaus werden natürliche und synthetisch hergestellte Banken und Verbindungen leicht durch konventionelle chemische, physikalische und biochemische Maßnahmen modifiziert.

[0203] Nützliche Verbindungen können innerhalb zahlreicher chemischer Klassen gefunden werden. Nützliche Verbindungen können organische Verbindungen oder kleine organische Verbindungen sein. Kleine organische Verbindungen haben ein Molekulargewicht von mehr als 50, doch weniger als etwa 2500 Dalton, oder weniger als etwa 750, oder weniger als etwa 350 Dalton. Beispielhafte Klassen beinhalten Heterozyklen, Peptide, Saccharide, Steroide und dergleichen. Die Verbindungen können modifiziert werden, um die Effizienz, Stabilität, pharmazeutische Kompatibilität und dergleichen zu verstärken. Strukturelle Identifizierung eines Agens kann verwendet werden, um zusätzliche Agenzien zu identifizieren, zu erzeugen oder zu durchmustern. Beispielsweise können, wo Peptid-Agenzien identifiziert werden, diese auf vielfältige Weise modifiziert werden, um ihre Stabilität zu verbessern, beispielsweise indem eine unnatürliche Aminosäure wie eine D-Aminosäure, insbesondere D-Alanin verwendet wird, indem der Amino- oder Carboxy-Terminus funktionalisiert wird, z.B. für die Aminogruppe Acylierung oder Alkylierung, und für die Carboxylgruppe Veresterung oder Amidifizierung oder dergleichen.

[0204] Für eine Primärdurchmusterung beträgt eine nützliche Konzentration einer erfindungsgemäßen Kandidatenverbindung etwa 1 μ M bis etwa 60 μ M oder mehr (d.h. 100 μ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M etc.). Die Konzentration der primären Durchmusterung wird als eine obere Begrenzung verwendet, zusammen mit neun zusätzlichen Konzentrationen, wobei die zusätzlichen Konzentrationen bestimmt werden, indem die Konzentration der Primärdurchmusterung um halblogarithmische Intervalle (z.B. für neun weitere Konzentrationen) für sekundäre Durchmusterung oder zur Erzeugung von Konzentrationskurven reduziert werden.

G α_{16} -Protein

[0205] Die vorliegende Erfindung stellt Assays und Verfahren bereit, in denen die Inkubation von GPR86 und eines Liganden, beispielsweise ADP, in Anwesenheit des G α_{16} -Proteins ausgeführt wird, das den GPR86-Rezeptor mit Phospholipase C koppeln kann.

Antikörper, die gemäß der Erfindung nützlich sind

[0206] Die Erfindung stellt Antikörper gegen GPR86 bereit. Antikörper können unter Verwendung von Standardprotokollen, die im Stand der Technik bekannt sind, hergestellt werden (siehe beispielsweise Antibodies: A Laboratory Manual Hrsg. Harlow und Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988). Ein Säugetier, wie eine Maus, ein Hamster oder ein Kaninchen kann mit einer immunogenen Form des Peptids (z.B. ein GPR86-Polypeptid oder ein antigenes Fragment, das in der Lage ist, eine Antikörperreaktion hervorzurufen, oder ein Fusionsprotein, wie es hierin oben beschrieben ist) immunisiert werden. Immunogene, um Antikörper hervorzurufen, werden hergestellt, indem die Polypeptide (z.B. isolierte, rekombinante Polypeptide oder synthetische Polypeptide) mit Adjuvantien gemischt werden. Alternativ werden GPR86-Polypeptide oder Peptide als Fusionsproteine mit größeren immunogenen Proteinen hergestellt. Polypeptide können auch mit anderen größeren immunogenen Proteinen, wie dem Napfschnecken-Hämocyanin, kovalent verbunden werden. Alternativ können Plasmid- oder virale Vektoren, die das GPR86-Polypeptid oder ein Fragment dieses Proteins kodieren, verwendet werden, um die Polypeptide zu exprimieren und eine Immunreaktion in einem Tier, wie in Costagliola et al., 2000,

J. Clin. Invest. 105:803–811 beschrieben, zu erzeugen. Um Antikörper herzustellen, werden Immunogene üblicherweise intradermal, subkutan oder intramuskulär an Versuchstiere wie Kaninchen, Schafe und Mäuse verabreicht. Zusätzlich zu den oben diskutierten Antikörpern können gentechnisch hergestellte Antikörperderivate hergestellt werden, beispielsweise Einzelkettenantikörper.

[0207] Das Fortschreiten der Immunisierung kann mittels Nachweises der Antikörpertiter im Plasma oder Serum überwacht werden. Es können auch Standard-ELISA-, Durchflusszytometrie- oder andere Immunoassays mit dem Immunogen als Antigen verwendet werden, um die Konzentrationen der Antikörper zu bestimmen. Antikörperzubereitungen können einfach Serum eines immunisierten Tieres sein, oder es können, wenn dies erwünscht ist, polyklonale Antikörper aus dem Serum durch beispielsweise Affinitätschromatographie unter Verwendung des immobilisierten Immunogens isoliert werden.

[0208] Um monoklonale Antikörper herzustellen, können Antikörper-produzierenden Milzzellen aus einem immunisierten Tier geerntet werden und mittels standardisierter somatischer Zellfusionsverfahren mit immortalisierenden Zellen, beispielsweise Myelomazellen, fusioniert werden, um Hybridomzellen zu gewinnen. Solche Techniken sind im Stand der Technik wohlbekannt und beinhalten beispielsweise die Hybridomtechnologie (ursprünglich von Köhler und Milstein, (1975) *Nature*, 256:495–497 entwickelt), die humane B-Zell-Hybridomtechnologie (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4:72) und die EBV-Hybridomtechnologie, um humane monoklonale Antikörper herzustellen (Cole et al., (1985): *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. S. 77–96). Hybridomzellen können immunochemisch auf die Produktion von Antikörpern durchmustert werden, die spezifisch mit einem GPR86-Polypeptid reagieren, und monoklonale Antikörper können aus den Medien einer Kultur isoliert werden, die solche Hybridomzellen umfasst.

Hochdurchsatz-Durchmusterungs-Kit

[0209] Ein erfindungsgemäßes Hochdurchsatz-Durchmusterungs-Kit umfasst alle notwendigen Mittel und Medien, um den Nachweis einer Modulatorverbindung, einschließlich beispielsweise eines Agonisten, Antagonisten, inversen Agonisten oder Inhibitors des erfindungsgemäßen Rezeptors in Anwesenheit von ADP, beispielsweise bei einer Konzentration im Bereich von 1 nM bis 10 μ M, durchzuführen. Das Kit umfasst die folgenden aufeinander folgenden Schritte. Rekombinante erfindungsgemäße Zellen, die die Nukleotidsequenz, die den GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor kodiert, umfassen und exprimieren, werden auf einem festen Träger kultiviert, beispielsweise einer Mikrotiterplatte, z.B. einer 96-Loch-Mikrotiterplatte, gemäß Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind und beispielsweise in WO 00/02045 beschrieben sind.

[0210] Erfindungsgemäße Modulatorverbindungen werden in Konzentrationen von etwa 1 nM bis 10 μ M oder mehr dem Kulturmedium in definierten Löchern in Anwesenheit einer geeigneten Konzentration von ADP (zum Beispiel im Bereich von 1 nM bis 1 μ M) hinzugegeben.

[0211] Sekundärer-Botenstoff-Assays, die einer Hochdurchsatz-Durchmusterungsanalyse zugänglich sind, werden ausgeführt, einschließlich der Messung der intrazellulären Niveaus von cAMP, intrazellulärem Inositolphosphat, interzellulären Diacylglycerin-Konzentrationen, Arachidonsäure-Konzentration oder MAP-Kinase- oder Tyrosin-Kinaseaktivität (wie oben beschrieben), ist aber nicht darauf beschränkt. Zum Beispiel wird die GPR86-Aktivität, so wie sie in einem zyklischen AMP-Assay gemessen wird, mittels eines Radioimmunoassays, wie zuvor beschrieben (26), quantifiziert. Die Ergebnisse werden mit dem Basalniveau der GPR86-Aktivität verglichen, das von rekombinanten erfindungsgemäßen Zellen in Anwesenheit von ADP, aber in Abwesenheit einer hinzugefügten Modulatorverbindung erhalten wurde. Löcher, die wenigstens einen zweifachen oder fünffachen oder auch zehnfachen oder sogar einhundertfachen oder noch größeren Anstieg oder Abfall in der GPR86-Aktivität zeigen, im Vergleich zu dem Niveau an Aktivität in Abwesenheit eines Modulators, werden für eine weitere Analyse ausgewählt.

Andere Kits, die gemäß der Erfindung nützlich sind

[0212] Die Erfindung stellt Kits bereit, die für die Durchmusterung oder den Nachweis von Modulatoren der, einschließlich Agenzien, die modulieren, GPR86-Aktivität nützlich sind, Kits zum Nachweis der Bindung an GPR86 sowie Kits, die für die Diagnose von Erkrankungen und Störungen nützlich sind, die durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet sind. Kits, die gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können ein isoliertes GPR86-Polypeptid (einschließlich ein Membran- oder Zell-assoziiertes GPR86-Polypeptid, z.B. auf isolierten Membranen, Zellen, die GPR86 exprimieren, oder auf einem SPR-Chip) beinhalten. Die erfindungsgemäßen Kits können einen Liganden umfassen, beispielsweise ADP. Darüber hinaus kann ein Kit weiter G α_{16} -Polypeptid umfassen. Ein Kit kann auch einen Antikörper umfassen, der für

GPR86 spezifisch ist. Alternativ, oder darüber hinaus, kann ein Kit Zellen enthalten, die transformiert wurden, so dass sie ein GPR86-Polypeptid exprimieren. In einer weiteren Ausführungsform kann ein erfindungsgemäßes Kit ein Polynukleotid enthalten, das ein GPR86-Polypeptid kodiert. In einer noch weiteren Ausführungsform, kann ein erfindungsgemäßes Kit die spezifischen Primer umfassen, die für die Amplifikation von GPR86, wie unten beschrieben, nützlich sind. Gegebenenfalls umfasst das erfindungsgemäße Kit Mittel zum Nachweis der Signalgabe von GPR86. Der Nachweis von Agenzien, Modulatoren, der Diagnose oder Störung kann mit einem Antikörper ausgeführt werden, der für GPR86 spezifisch ist, oder mit einer GPR86-spezifischen Nukleinsäuresonde. In einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Kits weiter einen Standard der GPR86-Aktivität umfassen, zum Beispiel einen Standard, wie er in einer Zelllinie gemessen wird, die GPR86 in Anwesenheit eines Liganden, wie ADP, exprimiert. Alle erfindungsgemäßen Kits können die angegebenen Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen und Verpackungsmaterialien dafür umfassen. Kits können auch Gebrauchsanweisungen beinhalten.

Transgene Tiere

[0213] Transgene Mäuse stellen ein nützliches Werkzeug für genetische und entwicklungsbiologische Untersuchungen und für die Bestimmung der Funktion einer neuartigen Sequenz bereit. Gemäß dem Verfahren üblicher Transgenese, werden zusätzliche Kopien von normalen oder modifizierten Genen in den männlichen Pronukleus der Zygote injiziert und wird in die genomische DNA der Empfängermaus integriert. Das Transgen wird nach einer Mendel'schen Verteilung in etablierte transgene Stämme übertragen. Konstrukte, die für die Erzeugung transgener Tiere nützlich sind, umfassen Gene unter der Kontrolle von entweder ihren normalen Promotoren oder einem induzierbaren Promotor, Reportergene unter der Kontrolle von Promotoren, die im Hinblick auf ihre Gewebeexpressionsmuster und Regulation untersucht werden sollen, und Konstrukte, die dominante Mutationen, mutante Promotoren und künstliche Fusionsgene, die im Hinblick auf ihr spezifisches Entwicklungsergebnis untersucht werden sollen. Üblicherweise werden DNA-Fragmente in der Größenordnung von 10 Kilobasen oder weniger verwendet, um ein transgenes Tier herzustellen (Reeves, 1998, New. Anat., 253:19). Transgene Tiere können mit einem Konstrukt erzeugt werden, das ein Kandidatengen umfasst, das einen Polymorphismus oder mehrere Polymorphismen gemäß der vorliegenden Erfindung enthält. Alternativ kann ein transgenes Tier, das ein Kandidatengen exprimiert, das einen einzelnen Polymorphismus enthält, mit einem zweiten transgenen Tier gekreuzt werden, das ein Kandidatengen exprimiert, das einen anderen Polymorphismus enthält, und die kombinierten Effekte der zwei Polymorphismen können in den Tieren der Nachkommenschaft untersucht werden.

Andere transgene Tiere

[0214] Die Erfindung stellt transgene Tiere bereit, die transgene Mäuse, Kaninchen, Ratten, Schweine, Schafe, Pferde, Kühe, Ziegen, etc. beinhalten, aber nicht darauf beschränkt sind. Ein Protokoll für die Herstellung eines transgenen Schweins kann in White und Yannoutsos, Current Topics in Complement Research: 64th Forum in Immunology, S. 88–94; US Patent Nr. 5,523,226; US Patent Nr. 5,573,933; PCT-Anmeldung WO 93/25071 und PCT-Anmeldung WO 95/04744 gefunden werden. Ein Protokoll für die Herstellung einer transgenen Maus kann in US Patent Nr. 5,530,177 gefunden werden. Ein Protokoll für die Herstellung einer transgenen Ratte kann in Bader und Ganten, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Supp. 3: S81–S87, 1996 gefunden werden. Ein Protokoll für die Herstellung einer transgenen Kuh kann in Transgenic Animal Technology, A Handbook, 1994, Hrsg. Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc. gefunden werden. Ein Protokoll für die Herstellung eines transgenen Kaninchens kann in Hammer et al., Nature 315:680–683, 1985 und in Taylor und Fan, Frontiers in Bioscience 2:d298–308, 1997 gefunden werden.

Knock-Out-Tiere

i. Standard

[0215] Knock-Out-Tiere werden nach dem Verfahren der Erzeugung von Gendeletionen mittels homologer Rekombination hergestellt. Diese Technik basiert auf der Entwicklung von embryonalen Stamm-(ES)-Zellen, die von Embryonen stammen, in Kultur gehalten werden und die Fähigkeit haben, an der Entwicklung jedes Gewebes in der Maus teilzunehmen, wenn sie in eine Wirtsblastozyste eingefügt werden. Ein Knock-Out-Tier wird hergestellt, indem in den ES-Zellen homologe Rekombination auf ein spezifisches Zielgen gerichtet wird, wodurch ein Null-Allel des Gens erzeugt wird. Die möglichen phänotypischen Konsequenzen dieses Null-Allels (entweder in heterozygoter oder homozygoter Nachkommenschaft) kann analysiert werden (Reeves, supra).

ii. Gewebespezifischer Knock-Out in Mäusen unter Verwendung von Cre-lox in vivo

[0216] Das Verfahren der zielgerichteten homologen Rekombination wurde durch die Entwicklung eines Systems zur punktspezifischen Rekombination verbessert, das auf der Rekombinase Cre beruht, die für die P1-Stelle von Bakteriophagen spezifisch ist. Die Cre-loxP-Stellen-spezifische DNA-Rekombinase des Bakteriophagen P1 wird in transgenen Mausassays verwendet, um Gen-Knock-Outs zu erzeugen, die auf definierte Gewebe- oder Entwicklungsstufen beschränkt sind. Örtlich beschränkte Gendeletion, im Gegensatz zu einem globalen Gen-Knock-Out, besitzt den Vorteil, dass ein Phänotyp einer bestimmten Zelle, Gewebe zugeordnet werden kann (Marth, 1996, Clin. Invest. 97:1999). Im Cre-loxP-System wird eine transgene Maus solchermaßen gentechnisch hergestellt, dass die loxP-Stellen ein oder mehrere Exon(s) des Gens von Interesse flankieren. Homozygote für dieses so genannte „gefloxte Gen“ werden mit einer zweiten transgenen Maus gekreuzt, die das Cre-Gen unter Kontrolle eines Zell-/Gewebetyp-spezifischen transkriptionellen Promotors exprimiert. Das Cre-Protein schneidet anschließend die DNA zwischen den loxP-Erkennungssequenzen heraus und entfernt somit effektiv die Zielgenfunktion (Sauer, 1998, Methods, 14:381). Es gibt jetzt viele in vivo-Beispiele dieses Verfahrens, einschließlich der induzierbaren Inaktivierung von Brustdrüsengewebe-spezifischen Genen (Wagner et al., Nucleic Acids Res., 25:4323).

iii. Bac-Rettung des Knock-Out-Phänotyps

[0217] Um zu verifizieren, dass ein besonderer genetischer Polymorphismus/eine besondere Mutation für eine veränderte Proteinfunktion in vivo verantwortlich ist, kann man die veränderte Proteinfunktion „retten“, indem eine wildtypische Kopie des fraglichen Gens eingeführt wird. Dazu kann eine in vivo-Komplementation mit bakteriellen artifiziellen Chromosomen (BAC)-Klonen, die in transgenen Mäusen exprimiert werden, verwendet werden. Diese Verfahren wurden für die Identifizierung des circadianen Clock-Gens verwendet (Antoch et al., 1997, Cell 89:655).

Materialien

[0218] Trypsin stammte von Flow Laboratories (Bioggio, Schweiz). Kulturmedien, G418, fötales Kälberserum (FBS), Restriktionsenzyme, Platinum Pfx- und Taq-DNA-Polymerasen wurden von Life Technologies, Inc. (Merelbeke, Belgien) käuflich erworben. Das radioaktive Produkt myo-D-[2-³H] Inositol (17,7 Ci/mmol) wurde von Amersham (Ghent, Belgien) bezogen. Dowex AG1X8 (Formatform) wurde von Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.) bezogen. ATP, ADP, Adenosin, ADP β S (Adenosin 5'-O-(2-Thiodiphosphat)), A2P5P (Adenosin 2',5'-Diphosphat), A3P5P (Adenosin 3',5'-Diphosphat), A3P5PS (Adenosin 3'-Phosphat 5'-Phosphosulfat), UTP-, UDP-, ITP-, IDP-, UDP-Glukose und 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) wurden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) erhalten. 2-Methylthio-ADP (2MeSADP) und 2-Methylthio-ATP (2MeSATP) wurden von Research Biochemicals International (Natick, MA) erhalten. Forskolin wurde von Calbiochem (Bierges, Belgien) käuflich erworben. Rolipram war ein Geschenk von Laboratories Jacques Logeais (Trappes, Frankreich). Monoklonaler Antikörper, der für die zweifach phosphorylierten Formen von Erk1 und Erk2 (bei Thr²⁰² und Tyr²⁰⁴) spezifisch sind, wurde von New England Biolabs (Beverly, MA) erhalten.

Dosierung und Verabreichungsart

[0219] Beispielsweise kann ein Patient wie folgt behandelt werden, indem ein Modulator von GPR86 (zum Beispiel ein erfindungsgemäßer Agonist, Antagonist oder Inhibitor von GPR86) verabreicht wird. Ein erfindungsgemäßer Modulator von GPR86 kann einem Patienten zum Beispiel in einer biologisch verträglichen Lösung oder einem pharmazeutisch verträglichen Zufuhrvehikel, durch Schlucken, Injektion, Inhalation oder eine beliebige Anzahl anderer Verfahren verabreicht werden. Die verabreichten Dosierungen werden von Patient zu Patient unterschiedlich sein; eine „therapeutisch wirksame Dosis“ kann zum Beispiel durch das Niveau der Funktionsverbesserung (z.B. wie es in einem Sekundärer-Botenstoff-Assay, wie er hierin beschrieben ist, bestimmt wurde) bestimmt werden, ist aber nicht darauf beschränkt. Die Überwachung der ADP-Bindung wird den Fachmann ebenfalls in die Lage versetzen, die verabreichten Dosierungen auszuwählen und anzupassen. Die Dosierung eines erfindungsgemäßen Modulators von GPR86 kann täglich, wöchentlich, monatlich, jährlich oder wie es vom behandelnden Arzt als geeignet angesehen wird, wiederholt werden.

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0220] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen bereit, die einen erfindungsgemäßen GPR86-Modulator vermischt mit einem physiologisch verträglichen Träger, umfassen. Wie hierin verwendet, betrifft ein „physiologisch verträglicher Träger“ ein physiologisch verträgliches Verdünnungsmittel, wie Wasser,

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung oder Kochsalzlösung und kann weiter ein Adjuvans beinhalten. Adjuvantien wie unvollständiges Freund'sches Adjuvans, Aluminiumphosphat, Aluminiumhydroxid oder Alaun sind Materialien, die im Stand der Technik wohlbekannt sind.

[0221] Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammensetzungen bereit. Zusätzlich zu den aktiven Ingredienzien können diese pharmazeutischen Zusammensetzungen geeignete pharmazeutisch verträgliche Trägerzubereitungen enthalten, die pharmazeutisch verwendet werden können.

[0222] Pharmazeutische Zusammensetzungen für die orale Verabreichung können formuliert werden, indem pharmazeutisch verträgliche Träger, die im Stand der Technik wohlbekannt sind, in Dosierungen verwendet werden, die für eine orale Verabreichung geeignet sind. Solche Träger ermöglichen es, dass die pharmazeutischen Zusammensetzungen als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirups, Aufschlammungen, Suspensionen und dergleichen zur Aufnahme durch den Patienten formuliert werden können.

[0223] Pharmazeutische Zusammensetzungen für die orale Verwendung können durch Kombination von aktiven Verbindungen mit festen Exzipienten erhalten werden, gegebenenfalls durch Mahlen eines resultierenden Gemisches und die Prozessierung des Granulatgemisches, nach Zusatz geeigneter Hilfsstoffe, wenn erwünscht, um Tabletten oder Drageekerne zu erhalten. Geeignete Exzipienten sind Kohlenhydrat- oder Proteinfüllmittel wie Zucker, einschließlich Laktose, Saccharose, Mannit oder Sorbit; Stärke von Mais, Weizen, Reis, Kartoffel oder anderen Pflanzen; Zellulose wie Methylzellulose, Hydroxypropylmethyl-Zellulose oder Natriumcarboxymethyl-Zellulose; und Gummis einschließlich Gummi arabicum und Tragantgummi; und Proteine wie Gelatine und Collagen. Wenn erwünscht, können disintegrierende oder löslich machende Agenzien hinzugefügt werden, beispielsweise kreuzvernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar, Alginsäure oder ein Salz davon, beispielsweise Natriumalginat.

[0224] Drageekerne werden mit geeigneten Umhüllungen versehen, beispielsweise konzentrierte Zuckerlösungen, die auch Gummi arabicum, Talkum, Polyvinylpyrrolidon, Carbopolgel, Polyethylenglykol und/oder Tindioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische enthalten können. Farbstoffe oder Pigmente können zu den Tabletten oder Drageehüllen zur Produktidentifizierung oder zur Kennzeichnung der Menge von aktiver Verbindung, d.h. der Dosierung, hinzugefügt werden.

[0225] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die oral verwendet werden können, beinhalten aus Gelatine gemachte Push-Fit-Kapseln sowie aus Gelatine gemachte weiche, versiegelte Kapseln und eine Umhüllung wie Glycerin oder Sorbit. Push-Fit-Kapseln können aktive Ingredienzien enthalten, die mit einem Füll- oder Bindemittel wie Laktose oder Stärke, Gleitmittel wie Talk oder Magnesiumstearat und, gegebenenfalls, Stabilisatoren gemischt sind. In weichen Kapseln kann die aktive Verbindung in geeigneten Flüssigkeiten wie fetten Ölen, flüssigem Paraffin oder flüssigem Polyethylenglykol, mit oder ohne Stabilisatoren, aufgelöst oder suspendiert sein.

[0226] Pharmazeutische Formulierungen für die parenterale Verabreichung beinhalten wässrige Lösungen der aktiven Verbindung. Für die Injektion können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen in wässrigen Lösungen, vorzugsweise in physiologisch verträglichen Puffern wie Hank's Lösung, Ringelösung oder physiologisch gepufferter Kochsalzlösung formuliert werden. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen enthalten, welche die Viskosität der Suspension steigern, beispielsweise Natriumcarboxymethyl-Zellulose, Sorbit oder Dextran. Darüber hinaus beinhalten Suspensionen der aktiven Lösungsmittel oder Vehikel fette Öle wie Sesamöl, oder synthetische Fettsäureester wie Ethyloleat oder Triglyzeride, oder Liposomen. Gegebenenfalls kann die Suspension auch geeignete Stabilisatoren oder Agenzien enthalten, welche die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen, was die Zubereitung hoch konzentrierter Lösungen erlaubt.

[0227] Für eine nasale Verabreichung werden Durchdringungsmittel in der Formulierung verwendet, die für die entsprechende Barriere, die durchdrungen werden soll, geeignet sind. Solche Durchdringungsmittel sind allgemein im Stand der Technik gekannt.

[0228] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können auf eine Weise hergestellt werden, die im Stand der Technik bekannt ist, z.B. durch übliche Vermischung-, Lösungs-, Granulierungs-, Drageeherstellungs-, Levitations-, Emulgierungs-, Verkapslungs-, Einbau- oder Lyophilisierungsverfahren.

[0229] Die pharmazeutische Zusammensetzung kann als ein Salz bereit gestellt werden und kann mit vielen Säuren, einschließlich Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, etc. hergestellt werden, ist aber nicht darauf beschränkt. Salze neigen dazu, in wässrigen oder anderen

protonischen Lösungsmitteln löslicher zu sein als die korrespondierenden Formen der freien Base. In anderen Fällen kann die Zubereitung ein lyophilisiertes Pulver in 1 mM–50 mM Histidin, 0,1 %–2 % Saccharose, 2 %–7 % Mannit bei einem pH-Bereich von 4,5–5,5 sein, das vor der Verwendung mit Puffer kombiniert wird.

[0230] Nachdem pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine erfindungsgemäße Verbindung umfassen, die in einem verträglichen Träger formuliert wurde, zubereitet wurden, können sie in einen geeigneten Behälter platziert werden und für die Behandlung eines indizierten Krankheitszustandes mit Informationen markiert werden, welche die Menge, Häufigkeit und das Verfahren der Verabreichung beinhalten.

Beispiele

[0231] Die Erfindung wird durch die folgenden nicht beschränkenden Beispiele illustriert, wobei die folgenden Materialien und Verfahren verwendet wurden. Die gesamte Offenbarung jeglicher der im Folgenden genannten Literaturzitate wird durch Bezugnahme Bestandteil dieser Schrift.

Beispiel 1: Klonierung und Sequenzierung

[0232] Eine intronlose kodierende Sequenz, die einen neuartigen Rezeptor kodiert, der sehr stark mit dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor verwandt ist, wurde auf dem genomischen Klon RP11-25K24 identifiziert (GenBank Zugangsnummer AC024886), der sich in der 3q24-Region befindet und in dem folgenden Patent: WO 00/31258; ARENA; Sequenz-Nr. 18 offenbart ist.

[0233] Spezifische Oligonukleotidprimer wurden auf Basis der Sequenz des humanen GPR86-Rezeptors synthetisiert: Ein Sense-Primer 5'-CCGGAATTCACCATGAACACCACAGTGATGC-3' und ein Antisense-Primer 5'-CTTGTCTAGATCAGCGTAAGGTTATGTTGTC-3'. Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit drei unterschiedlichen Milz-cDNAs ausgeführt, wobei die Platinum Pfx-DNA-Polymerase verwendet wurde. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 94°C, 15 s; 50°C, 30 s; 68°C, 2 min. für 35 Zyklen. Die Amplifikationen resultierten in einem 1 Kilobasen langen Fragment, das die gesamte kodierende Sequenz des GPR86-Gens enthält. Die kodierende Sequenz wurde anschließend subkloniert, und beide Stränge der 3 cDNAs wurden jeweils sequenziert, wobei das BigDye Terminator Cycle Sequenzierungskit (Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien) verwendet wurde.

[0234] Dieser 1002 Basenpaare (bp) lange offene Leseraster wurde auch kürzlich von Wittenberger et al. (GenBank Zugangs-Nr. AF295368) identifiziert, und von ihm wurde berichtet, dass er einen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodiert, den sie GPR86 nennen (24). Dem Startkodon geht 18 bp stromaufwärts ein Stoppkodon voran. Oligonukleotid-Primer wurden auf Basis dieser kodierenden Sequenz synthetisiert. Sie wurden in einer PCR mit cDNA aus der Milz verwendet. Ein PCR-Produkt mit einer Größe, die mit der kodierenden Sequenz von GPR86 übereinstimmte, wurde in einen Expressionsvektor inseriert und auf beiden Strängen sequenziert ([Fig. 1](#)). Die putativen membranspannenden Domänen sind unterstrichen und mit I bis VII nummeriert. Die putativen Phosphorylierungsstellen durch Proteinkinase A oder Proteinkinase C sind entsprechend durch schwarze Kreise (●) oder ein schwarzes Dreieck (▲) angezeigt. Die möglichen N-Glykosylierungsstellen sind mit einem schwarzen Quadrat (■) angezeigt.

[0235] Die erhaltene Sequenz stimmte perfekt mit der Sequenz von Wittenberger et al. überein, die aus humanen cDNA-Banken aus fötalem Gehirn und Plazenta amplifiziert wurde. Der 1002 bp lange offene Leseraster beginnt mit einem ATG-Kodon in einer Kozak-Konsensussequenz und kodiert ein Protein von 333 Aminosäuren. Die Peptidsequenz enthält 3 mögliche Stellen für N-gebundene Glykosylierung (zwei im extrazellulären N-terminalen Teil (N² und N¹⁰) und eine in der dritten extrazellulären Schleife (N²⁶⁴), zwei mögliche Phosphorylierungsstellen durch Proteinkinase C (eine in der dritten intrazellulären Schleife (5²¹⁰) und eine im carboxyterminalen Teil (T³⁰⁴)) und eine Phosphorylierungsstelle durch Proteinkinase A (im carboxyterminalen Teil (T³¹⁶)) ([Fig. 1](#)). Der neue Rezeptor weist eine signifikante Homologie mit den humanen P2Y₁₂- und UDP-Glukose-Rezeptoren auf ([Fig. 2](#)), 48 % beziehungsweise 45 % Aminosäureidentität. Die Ähnlichkeit mit den anderen P2Y-Rezeptoren ist viel geringer ([Fig. 2](#)), zum Beispiel 25 % beziehungsweise 26 % Aminosäureidentität mit den humanen P2Y₁- und P2Y₂-Rezeptoren. Ein Alignment der Aminosäuresequenz von GPR86 (P2Y₁₃) mit den purinergen Rezeptoren (P2Y₁, -2, -4, -6, -11, -12), dem UDP-Glukose-Rezeptor und anderen mit purinergen Rezeptoren verwandten Sequenzen (GPR17, GPR87, H963) wurde unter Verwendung des ClustalX Algorithmus ausgeführt. Anschließend wurde ein Dendrogramm unter Verwendung des TreeView-Algorithmus erstellt ([Fig. 2](#)).

Beispiel 2: Gewebeverteilung des humanen GPR86-Rezeptors

[0236] GPR86-mRNA wurde in mehreren humanen Geweben mittels RT-PCR amplifiziert ([Fig. 3A](#)).

[0237] Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion-(RT-PCR)-Experimente wurden unter Verwendung eines Panels von PolyA⁺-RNA (Clontech) ausgeführt. Die GPR86-Primer waren wie folgt: GPR86-Sense-Primer (5'-TGTGTCTGTTTTCTTCGGTG-3') und GPR86 Antisense-Primer (5'-CTGCCAAAAGAGAGTTG-3'). Die erwartete Größe der amplifizierten DNA-Bande betrug 575 bp. Zwei Primer, die auf Basis der kodierenden Sequenz für Aldolase synthetisiert wurden, wurden als Kontrollen verwendet, um ein Produkt mit einer erwarteten Größe von 443 bp herzustellen: Aldolase-Sense-Primer 5'-GGCAAGGGCATCCTGGCTGC-3' und Aldolase-Antisense revers 5'-TAACGGGCCAGAACATTGGCATT-3'. Etwa 75 ng von PolyA⁺-RNA wurde mit Superskript II (Life Technologies, Inc., Merelbeke, Belgien) revers transkribiert und für eine PCR verwendet. PCR wurde unter Verwendung der Taq-Polymerase unter folgenden Bedingungen ausgeführt: Denaturierung bei 94°C für 3 min., 38 Zyklen bei 94°C für 1 min., 58°C für 2 min. und 72°C für 2 min. Aliquots (10 µl) der PCR-Reaktion wurden mittels einer 1 %-Agarosegelelektrophorese analysiert.

[0238] RT-PCR-Experimente wurden unter Verwendung eines Panels von PolyA⁺-RNA (Clontech) und spezifischer Primer für die GPR86-Sequenz ausgeführt. Die erwartete Größe der amplifizierten GPR86- und Aldolase-Banden waren 575 bzw. 443 bp. cDNA (-) zeigt die Negativkontrolle der PCR-Reaktion ohne cDNA-Matrize an. Aliquots (10 µl) der PCR-Reaktion wurden durch eine 1 %-Agarosegelelektrophorese analysiert. Eine starke Bande der erwarteten Größe (575 bp) wurde in Milz und Gehirn (adult) und in geringerer Intensität in der Plazenta, Lunge, Leber, im Rückenmark, Thymus, Dünndarm, Uterus, Magen, den Hoden, fötalem Gehirn und der Nebenniere nachgewiesen, aber nicht in der Bauchspeicheldrüse, im Herzen, in der Niere, im Skelettmuskel, im Eierstock, in fötaler Aorta oder in der Negativkontrolle ohne cDNA ([Fig. 3A](#)). Eine 575 bp-Bande wurde auch deutlich in Lymphknoten und Knochenmark und schwach in mononukleären Zellen peripheren Bluts (PBMC) nachgewiesen ([Fig. 3A](#)). In Lymphozyten peripheren Bluts (PBL) und polymorphonukleären Zellen (PMN) wurde kein Signal nachgewiesen ([Fig. 3A](#)). GPR86-Boten-RNA wurde in unterschiedlichen Gehirnregionen (Thalamus, Kaudalkern, Substantia nigra, Hippocampus, Kleinhirn, Corpus callosum und Amygdala) nachgewiesen ([Fig. 3B](#)). Die Amplifikation eines Fragments der Aldolasekodierenden Sequenz wurde als Kontrolle verwendet.

[0239] Die Northern-Blot-Analyse mit hGPR86 zeigte ein starkes 2,9 kb-Transkript in der Milz und ein schwächeres in der Leber, Plazenta, Leukozyten und dem Gehirn an. Die Evaluierung der Expression von hGPR86 in verschiedenen Gehirnregionen deckte das 2,9 kb lange Transkript als starkes Signal in der Substantia nigra, dem Thalamus und der Medulla auf, und weniger stark im Frontal- und Temporallappen, Putamen, der Amygdala, dem Kaudalkern, dem Hippocampus, dem Rückenmark, dem Corpus callosum und schwach im Kleinhirn und im Occipitallappen. Das Transkript war im cerebralen Kortex nicht nachweisbar. Die weit verbreitete Expression von hGPR86, die in der Northern-Blot-Analyse gezeigt wurde, wird in der Herkunft von 16 EST-Sequenzen widerspiegelt, die für diesen GPCR in öffentlichen Datenbanken gefunden wurden und von verschiedenen Geweben wie Keimzelltumoren, fötaler Leber, fötaler Milz, Dickdarm, Uterus einer Schwangeren und multiple Sklerose-Läsionen abstammten. Die PCR-Amplifikation von hGPR86 aus Gehirn- und Plazenta-cDNAs stimmt mit diesen Ergebnissen ebenfalls überein (24).

Beispiel 3: Stabile Expression des neuen Rezeptors in 1321N1-Astrocytomzellen

[0240] Die komplette Sequenz des neuen Rezeptors wurde in einen Expressionsvektor eingeführt, um die 1321N1-Astrocytom-Zelllinie zu transfizieren, die früher bereits verwendet wurde, um mehrere P2Y-Subtypen zu charakterisieren (5, 13, 14). 1321N1-Astrocytomzellen, die das Gα₁₆-Protein exprimieren, wurden mit dem rekombinanten GPR86-Plasmid oder mit dem Plasmid alleine transfiziert.

[0241] CHO-K1- und 1321N1-Zellen wurden mit dem rekombinanten GPR86-Plasmid oder mit dem Plasmid allein unter Verwendung des FuGENE™6-Transfektionsreagenzes (Roche Molecular Biochemicals) transfiziert. Ein AG32 genannter Klon, der 1321N1-Zellen entspricht, die zuvor mit pERAEQ2-Plasmid transfiziert wurden, das Gα₁₆ kodiert (von Euroscreen bereitgestellt), wurde transfiziert. Die transfizierten CHO-K1- und 1321N1-Zellen wurden mit 400 µg/ml G418 in vollständigem Medium (10 % FBS; 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B in Hams F12 beziehungsweise DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium) zwei Tage nach der Transfektion selektioniert und in demselben Medium gehalten. Die AG32-Zellen wurden in demselben kompletten DMEM Medium gehalten, das mit 500 µg/ml Zeocin supplementiert wurde.

[0242] Der Pool von G418-resistenten Klonen wurde auf seine funktionelle IP_3 -Reaktion auf mehrere Nukleotide gemäß dem oben bestimmten Verfahren getestet. Die Zellen wurden verschiedenen Nukleotiden bei einer Konzentration von 100 μM für 30 s ausgesetzt: ATP, ADP, UTP, UDP, ITP, IDP, TDP. Keine Reaktion wurde in 1321N1-Zellen erhalten, die den GPR86-Rezeptor alleine exprimieren, während eine starke IP_3 -Reaktion auf Histamin in diesen Zellen beobachtet wurde. ADP, UDP und IDP jedoch induzierten eine IP_3 -Reaktion in 1321N1-Zellen, die sowohl den GPR86-Rezeptor als auch das $G\alpha_{16}$ -Protein exprimieren. Keine IP_3 -Reaktion wurde im Bezug auf die anderen Nukleotide beobachtet, außer bei ATP und 2MeSATP; aber diese Reaktionen wurden in diesem Fall nach einer HPLC-Aufreinigung verloren (Daten nicht gezeigt; allerdings siehe Beispiel 7). Keine IP_3 -Reaktion wurde in Reaktion auf die Nukleotide in 1321N1- oder 1321N1- $G\alpha_{16}$ -Zellen beobachtet, die mit dem wildtypischen Expressionsvektor transfiziert und als Negativkontrolle verwendet wurden.

[0243] In 1321N1-Zellen, die sowohl den GPR86-Rezeptor als auch $G\alpha_{16}$ exprimieren, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ADP, IDP und UDP erzeugt, die eine starke Affinität von GPR86 für ADP aufzeigten. Der folgende Potenzbereich wurde erhalten: ADP >>> IDP > UDP. Die Affinität von GPR86 für ADP war in etwa 1000-fach größer als die für IDP und UDP. Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ADP, 2MeSADP und ADP β S. Die folgenden EC_{50} -Werte wurden für ADP, 2MeSADP bzw. ADP β S erhalten: $11,4 \pm 2,2$ nM, $14,2 \pm 3,0$ nM und $48,4 \pm 0,4$ nM (Mittelwert \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten) ([Fig. 4A](#)). Transfizierte 1321N1-Zellen wurden in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von ADP, 2MeSADP und ADP β S 30 s lang inkubiert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm S.D. von 3-fachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien gewonnen wurden. Keine IP_3 -Reaktion wurde für A2P5P (ADP 2', 5'-Diphosphat), A3P5P (Adenosin 3', 5'-Disphosphat) und A3P5PS (Adenosin 3'-Phosphat 5'-Phosphosulfat) erhalten.

[0244] Effekte von 2MeSATP und ATP wurden bei Konzentrationen erhalten, die höher waren als für die entsprechenden Diphosphatnukleotide ([Fig. 4B](#)). Transfizierte 1321N1-Zellen wurden mit oder ohne 100 ng/ml Pertussistoxin 18 h vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit von ADP (300 nM) oder Wasser (KONT.) 30 s lang inkubiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm S.D. von drei Experimentalwerten, die in einem repräsentativen Experiment von zweien erhalten wurden.

[0245] Wie bereits diskutiert wurde, sind kommerzielle Nukleotidpulver häufig mit Degradierungsprodukten kontaminiert (4, 13, 28). Die Kontaminierung beträgt üblicherweise 1 % für ATP und etwa 10 % für 2MeSATP (28). 2MeSATP- und ATP-Lösungen (1 mM) wurden bei Raumtemperatur mit 20 Einheiten/ml CPK und 10 mM CP während 90 min. behandelt. Dieses ATP-regenerierende System umgeht Probleme, die aus der Kontaminierung und Degradierung von Triphosphatnukleotidlösungen herrühren (28). Unter diesen Bedingungen verschwanden die Reaktionen auf ATP und 2MeSATP ([Fig. 4B](#)).

[0246] Eine Inhibierung von 86 ± 8 % (Mittelwert \pm Bereich von zwei unabhängigen Experimenten) der ADP-Reaktion (300 nM) nach einer 18-stündigen Vorbehandlung der transfizierten Zellen mit 100 ng/ml Pertussistoxin (PTx) wurde beobachtet ([Fig. 4C](#)). Transfizierte 1321N1-Zellen wurden mit oder ohne 100 ng/ml Pertussistoxin (PTx) 18 h lang vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit von ADP (300 nM) oder Kontrollmedium (KONT.) 30 s lang inkubiert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm S.D. von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von zweien erhalten wurden.

Beispiel 4: Stabile Expression des neuen Rezeptors in CHO-K1-Zellen

[0247] Der mögliche Effekt von Nukleotiden wurde mit dem cAMP-Reaktionsweg in CHO-K1-Zellen untersucht, welche den humanen GPR86-Rezeptor exprimieren. Signifikante Inhibierungen des cAMP-Niveaus wurden bei niedrigen Konzentrationen von ADP ([Fig. 5B](#)) und 2MeSADP in Anwesenheit von Forskolin (4 μM) beobachtet. Transfizierte CHO-K1-Zellen wurden in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von ADP und 4 μM Forskolin 10 min. lang inkubiert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm S.D. von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien und 2MeSADP in Anwesenheit von Forskolin 4 μM erhalten wurden. Der IC_{50} von ADP betrug $1,5 \pm 0,6$ nM (Mittelwert \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten) mit einer maximalen prozentualen Inhibierung von 52 ± 7 % bei 30 nM (Mittelwert \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten). Es wurde eine zweite Phase bei Konzentrationen beobachtet, die höher als 30 nM waren: Die Inhibierung der Adenylzyklase nahm ab und ein geringer Anstieg wurde bei 10 μM beobachtet ([Fig. 5A](#)). Nach einer 18-stündigen Vorbehandlung der transfizierten CHO-K1-Zellen mit 100 ng/ml Pertussistoxin, ADP (100 nM und 100 μM) induzierte ein signifikantes Ansteigen des cAMP-Niveaus ([Fig. 5B](#)). Transfizierte CHO-K1-Zellen wurden in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von ADP und 4 μM Forskolin 10 Minuten lang inkubiert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm S.D. von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien erhalten wurden. Transfizierte CHO-K1-Zellen wurden mit oder ohne 100 ng/ml Pertussistoxin 18 h lang vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit von ADP (100

nM und 100 μ M) oder Wasser (KONT.) und 4 μ M Forskolin 10 min. lang inkubiert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm S.D. von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von zweien erhalten wurden. Der zweiphasische Effekt von ADP auf Adenylzyklase wurde in 1321N1-Zellen reproduziert, die mit dem humanen GPR86-Rezeptor transfiziert wurden.

[0248] Um Änderungen in dem Aktivierungsstatus der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 nach Stimulierung des humanen GPR86-Rezeptors zu untersuchen, wurden Gesamtzellextrakte von transfizierten CHO-K1-Zellen mittels Western-Blot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers für die zweifach phosphorylierten Kinasen (bei Thr²⁰² und Tyr²⁰⁴) analysiert, welche die aktiven Formen von Erk sind. Western-Blot-Analysen von phosphorylierten Erk1- und Erk2-Proteinen.

[0249] GPR86-transfizierte CHO-K1-Zellen wurden bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen 2 h lang in KRH-Puffer Serum-angehungert. Nach Stimulierung mit dem Agonisten, wurden die Zellen in 1 ml PBS pH 7,3 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O und 1,4 mM KH₂PO₄) abgeschabt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation wiedergewonnen und in 150 μ l Laemmli-Puffer (10 % (w/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 2,3 % (w/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8) lysiert. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Verfahrens nach Minamide und Bamburg (27) bestimmt. Dieselbe Menge an Protein für jede Bedingung wurde in einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoriert. Die Proteine wurden anschließend über Nacht bei 60 V und 4°C auf eine Nitrozellulosemembran unter Verwendung von 20 mM Tris, 154 mM Glycin, 20 (v/v) Methanol als Transferpuffer transferiert. Der Immunnachweis wurde unter Verwendung des verstärkten Chemilumineszenz-Western-Blot-Nachweissystems (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) unter Verwendung eines biotinylierten sekundären Mausantikörpers (1/25.000) ausgeführt. Der monoklonale Antikörper, der für die zweifach phosphorylierten Formen von Erk1 und Erk2 (an den Positionen Thr²⁰² und Tyr²⁰⁴) spezifisch ist, wurde in einer 1/1000-Verdünnung verwendet.

[0250] In CHO-K1-Zellen wies phosphoryliertes Erk1 und Erk2 die vorausgesagte molekulare Masse von 44 bzw. 42 kDa auf. Die Stimulierung des humanen GPR86-Rezeptors, der in CHO-K1-Zellen stabil exprimiert wird, mit 1 μ M ADP oder 2MeSADP führte zu einer starken Phosphorylierung von Erk2 ([Fig. 6A](#)). GPR86-transfizierte CHO-K1-Zellen wurden unterschiedlich lang oder mit verschiedenen Konzentrationen von ADP und 2MeSADP oder Wasser (KONT.) stimuliert. Der Effekt von 100 ng/ml Pertussistoxin (PTx) wurde an den Zeitpunkten 5 und 30 min. in Anwesenheit von 1 μ M ADP oder 2MeSADP getestet. Blot und Immunnachweis wurden wie beschrieben unter Verwendung des verstärkten Chemilumineszenz-Western-Blot-Nachweissystems (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) ausgeführt.

[0251] Erk1 war ebenfalls schwach phosphoryliert. Die Erk-Phosphorylierung wurde nach 1 min. Stimulierung nachgewiesen und stieg über die Zeit hinweg an ([Fig. 6A](#)). Die maximale Reaktion wurde nach 5 min. Stimulierung mit ADP oder mit 2MeSADP erreicht, wonach die Erk-Aktivierung langsam nach 1 h bis zum Basisniveau abnahm. Um zu bestimmen, ob endogene Rezeptoren für die ADP- oder 2MeSADP-abhängige Erk-Aktivierung in CHO-K1-Zellen verantwortlich sein können, wurden diese Nukleotide mit Zellen getestet, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden: Erk1- oder Erk2-Phosphorylierung wurde nicht beobachtet, wenn CHO-K1-Kontrollzellen 5 min., 20 min. oder 1 h mit 1 μ M 2MeSADP oder ADP inkubiert wurden. Die Konzentrationsabhängigkeit der Erk-Phosphorylierung, die von ADP induziert wird, wurde an der Spitze der transienten Reaktion (5 min.) bestimmt. Die Stimulierung des humanen GPR86-Rezeptors mit ADP oder 2MeSADP (1 nM bis 10 μ M) führte zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 ([Fig. 6B](#)). Eine maximale Wirkung wurde bei 1 μ M erreicht, aber eine signifikante Wirkung wurde bereits bei 10 nM für beide Agonisten beobachtet. Um die Beteiligung von G_i-Protein an diesen Wirkungen zu bewerten, vorinkubierten wir transfizierte GPR86-CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (100 ng/ml für 18 h) vor der ADP- (1 μ M) oder der 2MeSADP- (1 μ M)-Stimulierung. Die Erk-Phosphorylierung, die normalerweise nach 5 oder 30 Minuten der ADP- oder 2MeSADP-Behandlung induziert wird, war stark inhibiert ([Fig. 6B](#)).

[0252] Die Klonierung und pharmakologische Charakterisierung eines neuen humanen G-Proteingekoppelten Rezeptors der P2Y-Familie, vorläufig P2Y₁₃ genannt, entspricht dem zuvor beschriebenen GPR86-Rezeptor (24). In Bezug auf seine Sequenz ist die Homologie mit den P2Y₁- bis P2Y₁₁-Subtypen auf etwa 25 % beschränkt. Im Gegensatz dazu weist der GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor eine signifikante Homologie mit den humanen P2Y₁₂- und UDP-Glukose-Rezeptoren auf. Der am nächsten verwandte G-gekoppelte Rezeptor ist der humane P2Y₁₂-Rezeptor (48 % Aminosäureidentität), der ebenfalls ein Rezeptor ist, der auf ADP reagiert. Mutageneseexperimente mit dem P2Y₂-Rezeptor haben drei positiv geladene Aminosäuren in der 6. und 7. Transmembrandomäne (His²⁶², Arg²⁶⁵ und Arg²⁹²) identifiziert, welche eine wichtige Rolle in der Nukleotidbindung spielen (wahrscheinlich durch Neutralisierung der negativen Ladung der Phosphatgruppen) (28). Die ersten zwei Reste sind in dem GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor an Positionen 251 bzw. 254 konserviert. Diese zwei Reste

sind in den P2Y₁₂- und UDP-Glukose-Rezeptoren ebenfalls konserviert. Der Arg²⁹²-Rest des P2Y₂-Rezeptors ist durch einen negativ geladenen Glutamatrest in den P2Y₁₂-, GPR86 (P2Y₁₃)- und UDP-Glukose-Rezeptoren ersetzt und könnte für die Pharmakologie des Rezeptors von großer Wichtigkeit sein.

[0253] P2Y₁₂- und GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptoren bilden daher eine Subgruppe von P2Y-Rezeptoren, die von den anderen P2Y-Rezeptoren strukturell verschieden sind und die eine hohe Affinität für ihren Liganden ADP teilen. Der EC₅₀-Wert für ADP für den GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor ist 20- bis 1000-fach geringer als der für die entsprechenden Liganden anderer P2Y-Rezeptoren in vergleichbar transfizierten Zelllinien. Von einem pharmakologischen Blickwinkel aus erlauben die relativen Affinitäten von ADP und 2MeSADP, zwischen den P2Y₁₂- und GPR86 (P2Y₁₃)-Subtypen zu unterscheiden. Ähnliche Affinitäten wurden für den GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor beobachtet, wobei 2MeSADP eine 10- bis 100-fache höhere Potenz aufweist, als ADP für den P2Y₁₂-Rezeptor, in Abhängigkeit vom Expressionssystem (21, 22).

[0254] Die Anwesenheit des Gα₁₆-Proteins war notwendig, um den GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor in 1321N1-Zellen an Phospholipase C zu koppeln. Der starke inhibitorische Effekt von Pertussistoxin auf die IP₃-Akkumulierung, die durch ADP in transfizierten 1321N1-Gα₁₆-Zellen induziert wird, legt einen Synergismus zwischen den Gα₁₆- und G_i-Proteinen nahe. Ein solches Phänomen wurde zuvor in HEL-Zellen beschrieben, wo die Ca²⁺-Mobilisierung durch P2Y₂-Agonisten vollständig durch ein Gα₁₆-Antisense und teilweise durch Pertussistoxin inhibiert wird (29).

[0255] Die Inhibierung von Adenylzyklase und die Stimulierung von MAP-Kinasen (ERK-1 und -2) sind Transduktionsmechanismen, die mit dem GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor assoziiert sind und beide G_i-Proteine involviert. Der zweiphasische Effekt von ADP auf Adenylzyklase erinnert an das, was für andere Rezeptoren wie den α₂-adrenergen Rezeptor (30, 31), beobachtet worden ist. Bei niedrigen Konzentrationen von Agonist gab es eine Inhibierung der Adenylzyklase, während bei höheren Konzentrationen ein Anstieg beobachtet wurde, was die simultane Kopplung von zwei G-Proteinen mit entgegengesetzten Wirkungen nahe legt. Diese simultane Kopplung könnte ein Artefakt der Überexpression sein.

[0256] Bezüglich der Gewebeverteilung des humanen GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptors wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den gegenwärtigen RT-PCR-Daten und Northern-Blot-Daten erhalten, die von Wittenberger et al. (24) erhalten wurden. Der humane GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptor ist besonders in humaner Milz und humanem Gehirn exprimiert, wo er eine hohe Expression in unterschiedlichen Gehirnregionen aufweist. Auch der P2Y₁₂-Rezeptor wird im humanen Gehirn nachgewiesen und weist ein gliales Expressionsmuster auf. Die Inhibierung der cAMP-Bildung durch ADP wurde in C6-Gliomzellen der Ratte (32) und in Kapillarendothelzellen aus dem Gehirn der Ratte (33) beschrieben. In beiden Modellen war 2MeSADP weit stärker als ADP, und 2MeSATP besaß eine ähnliche Wirksamkeit wie 2MeSADP: Diese Merkmale legen eher die Beteiligung von P2Y₁₂- als die von GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptoren nahe. Die Expression des GPR86 (P2Y₁₃)-Rezeptors in der Milz, den Lymphknoten und dem Knochenmark legt nahe, dass er eine Rolle in der Hämatopoese und im Immunsystem spielt.

Beispiel 5: Herstellung eines transgenen Tieres

[0257] Verfahren zur Erzeugung nicht humaner transgener Tiere sind hierin beschrieben. DNA-Konstrukte können in die Keimbahn eines Säugetiers eingeführt werden, um ein transgenes Säugetier herzustellen. Beispielsweise können eine oder mehrere Kopie(n) des Konstrukts in das Genom eines Säugetierembryos mittels transgener Standardtechniken eingebaut werden.

[0258] In einer beispielhaften Ausführungsform wird ein transgenes nicht humanes Tier durch die Einführung eines Transgens in die Keimbahn des nicht humanen Tieres hergestellt. Transgene können in embryonale Zielzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien eingeführt werden. Es werden unterschiedliche Verfahren verwendet, abhängig vom Entwicklungsstadium der embryonalen Zielzellen. Die spezifische(n) Linie(n) jedes beliebigen verwendeten Tieres sollte(n), wenn möglich, gemäß eines allgemein guten Gesundheitszustandes, guter Embryoausbeuten, guter pronukleärer Sichtbarkeit im Embryo und guter Reproduktionsfähigkeit ausgewählt werden.

[0259] Die Einführung des P2Y₁₃-Rezeptorproteintransgens in den Embryo wird durch eine Vielzahl von Mitteln, die im Stand der Technik bekannt sind, erreicht, beispielsweise durch Mikroinjektion, Elektroporation oder Lipofektion. Zum Beispiel wird ein P2Y₁₃-Rezeptorproteintransgen in ein Säugetier durch Mikroinjektion des Konstrukts in die Pronuklei fertilisierter Säugetiereizellen eingeführt, so dass eine oder mehrere Kopie(n) des Konstrukts in den Zellen des sich entwickelnden Säugetiers/Säugetiere zurückbehalten wird/werden. Nach

Einführung des Transgenkonstrukts in die fertilisierte Eizelle, wird die Eizelle in vitro unterschiedlich lang inkubiert oder in den entsprechenden Wirt reimplantiert oder beides. Ein verbreitetes Verfahren besteht darin, die Embryonen in vitro etwa 1–7 Tage lang, in Abhängigkeit von der Art, zu inkubieren und anschließend in den entsprechenden Wirt zu reimplantieren.

[0260] Die Nachkommenschaft des gentechnisch manipulierten Embryos wird auf Anwesenheit des Konstrukts mittels Southern-Blot-Analyse eines Gewebesegments untersucht. Ein Embryo, der eine oder mehrere Kopie(n) des exogen klonierten Konstrukts stabil in dem Genom integriert enthält, wird verwendet, um eine permanente transgene Säugetierlinie zu etablieren, die das transgen eingeführte Konstrukt trägt.

[0261] Würfe der transgen veränderten Säugetiere werden nach ihrer Geburt auf den Einbau des Konstrukts in das Genom der Nachkommenschaft untersucht. Dies wird ausgeführt, indem eine Sonde, die der DNA-Sequenz entspricht, die das Fusionsprotein oder ein Segment davon kodiert, mit chromosomalem Material der Nachkommenschaft hybridisiert wird. Diejenige Nachkommenschaft des Säugetiers, von der herausgefunden wird, dass sie wenigstens eine Kopie des Konstrukts in ihrem Genom aufweist, wird bis zur Geschlechtsreife herangezogen. Die transgenen Säugetiere werden gekreuzt, um andere transgene Nachkommen zu erzeugen.

[0262] Transgene Weibchen werden auf Proteinexpression unter Verwendung einer im Stand der Technik bekannten Untersuchungstechnik getestet, z.B. einem Western-Blot oder enzymatischen Assay.

Beispiel 6: GPR86-Aktivität

[0263] Die Aktivität von GPR86 kann wie folgt nachgewiesen oder gemessen werden: Rekombinante Säugerzellen, zum Beispiel 1321N1-Astrozytom- oder CHO-K1-Zellen, die mit einem geeigneten GPR86 (P2Y₁₃)-Expressionsvektor stabil transfiziert wurden, werden wie, in den Beispielen 3 und 4 auf Gewebekulturplatten ausplattiert. Bei der geeigneten Zelldichte, üblicherweise zwischen 50 bis 75 % Konfluenz, wird das Kulturmedium gegen eine KRH-Pufferlösung (Krebs-Ringer Hepes: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM MgSO₄, 1,45 mM CaCl₂, 1,25 mM KH₂PO₄, 25 mM Hepes pH 7,4 und 8 mM Glukose) ausgetauscht, welche den ADP-Liganden (zum Beispiel im Bereich von 1 nM bis 1 µM) enthält, und die Zellen werden für zusätzliche 30 s bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation werden die Zellen gewaschen und lysiert. Die Aktivität von GPR86 in diesem Zellextrakt in Abwesenheit oder Anwesenheit des ADP-Liganden wird bestimmt, indem die entsprechende Aktivität von stromabwärts liegenden sekundären Botenstoffen wie cAMP, MAP-Kinase/ERK-Phosphorylierung und IP₃, wie in den Beispielen 3 und 4 beschrieben, nachgewiesen wird. GPR86-Aktivität wird als ein zweifacher oder größerer Anstieg der ERK-Phosphorylierung oder ein zweifacher oder größerer Abfall der cAMP-Niveaus in Abwesenheit im Vergleich zur Anwesenheit von ADP definiert. Aktivität wird auch als eine zweifache oder größere Veränderung in den Niveaus eines sekundären Botenstoffs in Anwesenheit im Vergleich zur Abwesenheit einer optimalen Konzentration des Liganden ADP definiert.

Beispiel 7: Teilweise agonistischer Effekt von ATP und 2MeSATP

[0264] Die vorliegende Erfindung betrifft teilweise die Aktivierung von GPR86 durch ADP oder ein Analogon oder äquivalentes Molekül wie 2MeSADP, ADPβS oder jedes der ADP-Analoga, die in US Pat. Nr. 5,700,786 gelehrt werden. Dementsprechend wurden zwei ADP-Analoga, ATP und 2MeSATP, mit AG32-Zellen getestet, die mit dem humanen P2Y₁₃-Rezeptor wie oben beschrieben, transfiziert wurden. AG32-Zellen sind 1321N1-Zellen, die mit dem Gα₁₆-Protein transfiziert wurden.

[0265] AG32-Zellen wurden auf 35 mm (Durchmesser) Petrischalen (2 × 10⁵ Zellen pro Schale) ausgesät und 24 h lang mit 5 µCi/ml [³H]-Myoinositol in inositolfreiem DMEM mit 5 % fötalem Kälberserum, Antibiotika, Amphotericin, Natriumpyruvat und 400 µg/ml G418 markiert. Die Zellen wurden 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH)-Puffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM MgSO₄, 1,45 mM CaCl₂, 1,25 mM KH₂PO₄, 25 mM Hepes (pH 7,4) und 8 mM D-Glukose) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Anwesenheit von ADP, ATP oder 2MeSATP 30 s lang inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml einer eiskalten 3 %-igen Perchlorsäurelösung gestoppt. Vor der Stimulierung wurden ATP und 2MeSATP (1 mM-Lösungen) 90 min. lang bei Raumtemperatur mit 20 Einheiten/ml Kreatinphosphokinase (CPK) und 10 mM Kreatinphosphat (CP) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Jodacetamid gestoppt.

[0266] Nach der Behandlung mit Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase zeigte sich, dass ATP und 2MeSATP teilweise Agonisten des humanen P2Y₁₃-Rezeptors sind. [Fig. 8](#) zeigt die Konzentrations-Reaktions-Kurve der GPR86-Aktivierung, die durch die ADP-Analoga ATP und 2MeSATP stimuliert wurde. Die Daten

sind gezeigt als Auftrag der Agonistenkonzentration gegen [^3H] IP_3 -Zählungen pro Minute. ATP und 2MeSATP stimulierten die GPR86-Rezeptoraktivität mit einem EC_{50} von $4,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$ bzw. $1,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien erhalten wurden.

Beispiel 8: Diadenosinpolyphosphat-Aktivität

[0267] Die ADP-Analoga Ap3A, Ap4A, Ap5A und Ap6A wurden mit AG32-Zellen getestet, die mit dem humanen P2Y_{13} -Rezeptor wie oben beschrieben transfiziert wurden.

[0268] AG32-Zellen wurden auf 35 mm (Durchmesser) Petrischalen (2×10^5 Zellen pro Schale) ausgesät und 24 h lang mit $5 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Myoinositol in inositolfreiem DMEM mit 5 % fötalem Kälberserum, Antibiotika, Amphotericin, Natriumpyruvat und $400 \mu\text{g/ml}$ G418 markiert. Die Zellen wurden 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH)-Puffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM MgSO_4 , 1,45 mM CaCl_2 , 1,25 mM KH_2PO_4 , 25 mM Hepes (pH 7,4) und 8 mM D-Glukose) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Anwesenheit von zwei verschiedenen Konzentrationen (100 nM und 10 μM ADP bzw. ApnA ($n = 3 - 6$)) 30 s lang inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml einer eiskalten 3 %-igen Perchlorsäurelösung gestoppt.

[0269] Nach 30 s Inkubation war die Wirkung von Ap3A auf die IP_3 -Akkumulierung beinahe gleich derjenigen von ADP ([Fig. 9](#)), wie dies durch die Messung der Produktion von [^3H] IP_3 ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu waren Ap4A, Ap5A und Ap6A inaktiv. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien erhalten wurden.

Beispiel 9: Poly[A]-Aktivität

[0270] Poly[A] und Poly[A].[G] wurden mit AG32-Zellen getestet, die mit dem humanen P2Y_{13} -Rezeptor wie oben beschrieben transfiziert wurden. Die Erfinder zogen in Betracht, dass diese Verbindungen in einer Vakzinierungstherapie von dendritischen Zellen als Ziele des humanen P2Y_{13} -Rezeptors verwendet werden könnten.

[0271] AG32-Zellen wurden auf 35 mm (Durchmesser) Petrischalen (2×10^5 Zellen pro Schale) ausgesät und 24 h lang mit $5 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Myoinositol in inositolfreiem DMEM mit 5 % fötalem Kälberserum, Antibiotika, Amphotericin, Natriumpyruvat und $400 \mu\text{g/ml}$ G418 markiert. Die Zellen wurden 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH)-Puffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM MgSO_4 , 1,45 mM CaCl_2 , 1,25 mM KH_2PO_4 , 25 mM Hepes (pH 7,4) und 8 mM D-Glukose) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Anwesenheit von ADP (als einem Indikator der optimalen Stimulierung), Poly[A] bzw. Poly[A].[G] 30 s lang inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml einer eiskalten 3 %-igen Perchlorsäurelösung gestoppt. Zu Vergleichszwecken wurde vor der Inkubation der Zellen Poly[A] und Poly[A].[G] (1 mM-Lösungen) 90 min. bei Raumtemperatur mit 20 Einheiten/ml Kreatinphosphokinase (CPK) und 10 mM Kreatinphosphat (CP) inkubiert, wonach die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Jodacetamid gestoppt wurde. [Fig. 10](#) zeigt die Konzentrations-Reaktions-Kurve der Aktivierung von humanem GPR86 mit Poly[A] und Poly[A].[G].

[0272] Nach der Behandlung mit Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase war Poly[A] immer noch in der Lage, GPR86 zu aktivieren, obwohl mit einem niedrigeren EC_{50} ($205 \pm 60 \mu\text{M}$). Allerdings war Poly[A].[G] auf humanem GPR86 nicht mehr aktiv (Daten in [Fig. 10](#) gezeigt). Die Konzentration von Poly[A] und Poly[A].[G] wurden in AMP-Äquivalenten ausgedrückt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien erhalten wurden.

Beispiel 10: Antagonistische Aktivität von Reactive Blue 2, Suramin, PPADS und MRS-2179

[0273] Antagonisten wurden mit AG32-Zellen getestet, die mit humanem GPR86 transfiziert wurden. AG32-Zellen wurden auf 35 mm (Durchmesser) Petrischalen (2×10^5 Zellen pro Schale) ausgesät und 24 h lang mit $5 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Myoinositol in inositolfreiem DMEM mit 5 % fötalem Kälberserum, Antibiotika, Amphotericin, Natriumpyruvat und $400 \mu\text{g/ml}$ G418 markiert. Die Zellen wurden 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH)-Puffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM MgSO_4 , 1,45 mM CaCl_2 , 1,25 mM KH_2PO_4 , 25 mM Hepes (pH 7,4) und 8 mM D-Glukose) inkubiert. Vor der Stimulierung wurden die Zellen 10 min. lang in Anwesenheit von Reactive Blue 2 (RB-2), Suramin, PPADS oder MRS-2179 vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Anwesenheit von ADP (100 nM) 30 s lang inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml einer eiskalten 3 %-igen Perchlorsäurelösung gestoppt. [Fig. 11](#) zeigt die Konzentrations-Reaktions-Kurve der GPR86-Aktivierung durch ADP in Anwesenheit der antagonistischen Verbindungen. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standard-

abweichung von dreifachen Experimentalwerten dar, die in einem repräsentativen Experiment von dreien erhalten wurden.

[0274] Die folgende Tabelle enthält den IC_{50} für die entsprechenden Verbindungen.

[0275] Antagoniststärken in humanen $P2Y_{13}$ -AG32-Zellen.

[0276] Der Wert stellt den Mittelwert \pm S.D, von drei unabhängigen Experimenten dar.

Antagonist	IC_{50}
Reactive Blue 2	$1,9 \pm 0,1 \mu M$
Suramin	$2,3 \pm 0,4 \mu M$
PPADS	$11,7 \pm 0,9 \mu M$
MRS-2179	$> 100 \mu M$

Beispiel 11

Durchmusterung nach Modulatoren der GPR86-Aktivität

[0277] Kandidatenmodulatoren von GPR86 können wie folgt identifiziert werden: Der in Beispiel 6 beschriebene Assay stellt eine Voraussetzung für die Durchmusterung verschiedener Kandidatenverbindungen auf „Modulation“ der Aktivität von GPR86 bereit. Gemäß diesem Szenario werden stabil mit GPR86 transfizierte Zellen mit einer geeigneten Konzentration eines ADP-Liganden (zum Beispiel im Bereich von 1 nM bis 1 μM) und verschiedenen Konzentrationen eines Agonisten, inversen Agonisten, Antagonisten oder einer anderen Kandidatenmodulatorverbindung (zum Beispiel im Bereich von 0,1 nM bis 1 μM oder mehr) kokubiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellen gewaschen und lysiert. Aliquots des Zellextrakts werden dann in Sekundärer-Botenstoff-Assays getestet (wie zuvor in den Beispielen 3, 4 und 6 beschrieben). Auf diese Weise kann die Wirkung der Modulatorverbindungen auf die GPR86-Aktivität gemessen werden, indem die Aktivität der stromabwärts gelegenen sekundären Botenstoffe in Anwesenheit oder Abwesenheit einer Kandidatenmodulatorverbindung unter optimalen Testbedingungen der ADP-Liganden-Konzentration, Pufferzusammensetzung, Inkubationszeit und Temperatur bestimmt wird. Der Assay kann auch in einem Hochdurchsatzformat (wie im Kit-Teil beschrieben) durchgeführt werden, um viele Kandidatenmodulatoren in einer Vielzahl von Konzentrationen gleichzeitig zu testen. Die GPR86-Aktivität in Anwesenheit einer optimalen Konzentration von ADP wird bestimmt, indem jede Veränderung der Konzentrationen der sekundären Botenstoffe in Anwesenheit im Vergleich zur Abwesenheit der Kandidatenmodulatorverbindung bei einer definierten Konzentration bestimmt wird.

Andere Ausführungsformen

[0278] Andere Ausführungsformen sind dem Fachmann offensichtlich. Man sollte verstehen, dass die vorstehende detaillierte Beschreibung nur der Klarheit dient und lediglich beispielhaft ist. Der Geist und Umfang der vorliegenden Erfindung sind nicht auf die oben angegebenen Beispiele beschränkt, sondern sind von den folgenden Ansprüchen umfasst.

Literatur

1. Abbraccio, M.P. and Burnstock, G. (1994) *Pharmacol. Ther.* 64, 445–475.
2. Fredholm, B.B. et al. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 79–82.
3. Webb, T.E. et al. (1993) *FEBS Lett.* 324, 219–225.
4. Léon, C. et al. (1997) *FEBS Lett.* 403, 26–30.
5. Communi, D. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31969–31973.
6. Lustig, K.D. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5113–5117.
7. Parr, C.E. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3275–3279.
8. Bogdanov, Y. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12583–12590.
9. Boyer, J.L. et al. (2000) *Mol. Pharmacol.* 57, 805–810.
10. Webb, T.E. et al. (1996) *Mol. Pharmacol.* 50, 258–265.

11. Chang, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 26152–26158.
12. Communi, D. et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 303–308.
13. Nicholas, R.A. et al. (1996) Mol. Pharmacol. 50, 224–229.
14. Communi, D. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 30849–30852.
15. Nguyen, T. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 30845–30848.
16. Webb, T.E. et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 105–110.
17. Akbar, G.K.M. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18363–18367.
18. Yokomizo, T. et al. (1997) Nature 387, 620–624.
19. Li, Q. et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 455–460.
20. Janssens, R. et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 106–112.
21. Zhang, F.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (11), 8608–8615.
22. Hollopeter, G. et al. (2001) Nature 409, 202–207.
23. Chambers, J.K. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275 (15), 10767–10771.
24. Wittenberger, T. et al. (2001) J. Mol. Biol. 307, 799–813.
25. Communi, D. et al. (1995b). Circ. Res., 76, 191–198.
26. Brooker, G. et al. (1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 1–33.
27. Minamide, L.S. and Bamberg, J.R. (1990) Anal. Biochem. 190, 66–70.
28. Erb, L. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 4185–4188.
29. Baltensperger, K. and Porzig, H. (1997) J. Biol. Chem. 272, 10151–10159.
30. Eason, M.G. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (22), 15795–15801.
31. Chabre, O. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269 (8), 5730–5734.
32. Boyer, J.L. et al. (1993) J. Pharmacol. Exp. Ther. 267, 1140–1146.
33. Simon, J. et al. (2001) Br. J. Pharmacol. 132, 173–182.
34. Gudermann et al. (1995) J. Mol. Med. 73, 51–63.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von GPR86-Aktivität in einer Probe, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
 - a) eine GPR86 umfassende Probe mit ADP unter Bedingungen zu inkubieren, die die Bindung von GPR86 und ADP erlauben, und
 - b) einen sekundären Boten (second messenger) zu detektieren.
2. Das Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend die Schritte:
 - a) eine zweite GPR86 umfassende Probe in Abwesenheit von ADP unter Bedingungen zu inkubieren, die die Bindung von GPR86 und ADP erlauben, und
 - b) einen sekundären Boten (second messenger) zu detektieren.
3. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Probe GPR86 exprimierende Zellen umfasst.
4. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Probe GPR86 tragende Zellmembranen umfasst.
5. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei der Schritt des Inkubierens in oder auf Virus induziert knospenden (budding) Membranen erfolgt, die ein GPR86-Polypeptid enthalten.
6. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Schritt a) in der weiteren Gegenwart des Gα16-Polypeptids erfolgt.
7. Verfahren zur Identifizierung eines Agens das an GPR86 bindet, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
 - a) ein GPR86-Polypeptid in Gegenwart oder Abwesenheit eines zu testenden Bindemittels mit ADP in Berührung zu bringen unter Bedingungen, die die Bindung des ADP an das GPR86 Polypeptid erlauben, und
 - b) die Bindung des GPR86 Polypeptids an das ADP zu messen, wobei eine Abnahme der Bindung in Gegenwart des zu testenden Bindemittels, relativ zur Bindung in Abwesenheit des zu testenden Bindemittels, das zu testende Bindemittel als ein Agens identifiziert, das an GPR86 bindet.
8. Das Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Agens in einer Probe vorliegt.
9. Verfahren zur Identifizierung eines Agens, das die Signalaktivität von GPR86 erhöht, wobei das Verfah-

ren die Schritte umfasst:

- a) ein GPR86 Polypeptid mit einem Agens in Berührung zu bringen;
- b) die Signalaktivität des GPR86 Polypeptids in Gegenwart des Agens zu messen; und
- c) die in Gegenwart des Agens gemessene Aktivität mit der Aktivität zu vergleichen, die in einer Reaktion gemessen wurde, in der das GPR86 Polypeptid mit ADP in Berührung gebracht wurde, wobei das Agens als Agonist, der die Signalgabe von GPR86 erhöht, identifiziert wird, wenn die Menge der in Gegenwart des Agens gemessenen Aktivität wenigstens 10% beträgt von der Menge, die durch das ADP induziert wurde.

10. Das Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Agens in einer Probe vorliegt.

11. Verfahren zur Identifizierung eines Agens, das die Signalaktivität von GPR86 verringert, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- a) ein GPR86 Polypeptid mit ADP in Gegenwart oder Abwesenheit des Agens in Berührung zu bringen;
- b) die Signalaktivität des GPR86 Polypeptids zu messen; und
- c) die Menge der Aktivität, gemessen in einer Reaktion, die GPR86 und das ADP ohne das Agens enthält, zu vergleichen mit der Menge an Aktivität, gemessen in einer Reaktion, die GPR86, das ADP und das Agens enthält, wobei eine Abnahme der Aktivität von wenigstens 10% der Aktivität, die durch das ADP in Gegenwart des Agens induziert wurde, relativ zur Aktivität in Abwesenheit des Agens das Agens als einen Antagonisten für GPR86 identifiziert.

12. Das Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Agens in einer Probe vorliegt.

13. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei das GPR86 von Zellen auf ihrer Oberfläche exprimiert wird.

14. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei das GPR86 in Zellmembranen vorliegt.

15. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei das GPR86 in oder auf Virus induziert knospenden (budding) Membranen vorliegt.

16. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 3, 4, 13 oder 14, wobei die Zellen ausgewählt sind aus: COS7-Zellen, CHO-Zellen, LM (TK-) Zellen, NHI-3T3-Zellen, HEK-293-Zellen, K-562-Zellen und 1321N1-Astrocytomzellen und anderen Zelllinien.

17. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 16, wobei es in der weiteren Gegenwart von Gα16 Polypeptid durchgeführt wird.

18. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei der Schritt des Messens oder der Schritt des Detektierens durchgeführt wird unter Verwendung eines Verfahrens, das ausgewählt ist aus Markierungsverdrängung (label displacement) Oberflächenplasmon-Resonanz (surface plasmon resonance), Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (fluorescence resonance energy transfer), Fluoreszenz-Quenchen und Fluoreszenz-Polarisierung.

19. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 18, wobei das Agens ausgewählt ist aus natürlichen oder syntetischen Peptiden, Polypeptiden, Antikörpern oder deren Antigenbindenden Fragmenten, Lipiden, Kohlehydraten, Nukleinsäuren und kleinen organischen Molekülen.

20. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 19, wobei der Schritt, die Signalaktivität des GPR86 Polypeptids zu messen, den Schritt umfasst, eine Veränderung in der Konzentration eines sekundären Boten zu detektieren.

21. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 20, wobei der Schritt, die Signalaktivität zu messen, die Messung der Bindung oder des Austausches von Guanin-Nukleotiden, der Aktivität von Adenylat-Cyclase, von cAMP, der Aktivität von Protein-Kinase C, des Abbaus von Phosphatidylinositol, von Diacylglycerin, von Inositoltriphosphat, von intrazellulärem Kalzium, der Konzentration von Arachidonsäure, der Aktivität von MAP-Kinase, der Aktivität von Tyrosin-Kinase oder der Expression eines Reportergens umfasst.

22. Das Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Schritt, die Signalaktivität zu messen, die Verwendung ei-

nes Assays auf Aequorin-Basis umfasst.

23. Verfahren zur in vitro-Diagnose einer Krankheit oder Störung, die gekennzeichnet sind durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- a) eine Gewebeprobe, die ein GPR86 Polypeptid umfasst, mit ADP in Berührung zu bringen;
- b) die Bindung des ADP an die Gewebeprobe zu detektieren; und
- c) die in Schritt b) detektierte Bindung mit einem Standard zu vergleichen, wobei eine Differenz in der Bindung relativ zum Standard eine Krankheit oder Störung, die durch die Fehlregulation der Bindung von ADP an GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostiziert.

24. Verfahren zur in vitro-Diagnose einer Krankheit oder Störung, die gekennzeichnet sind durch eine Fehlregulation der Signalgabe von GPR86, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- a) eine Gewebeprobe, die ein GPR86 Polypeptid umfasst, mit ADP in Berührung zu bringen;
- b) die Signalaktivität des GPR86 Polypeptids in der Gewebeprobe zu detektieren; und
- c) die in Schritt b) detektierte Signalaktivität mit einem Standard zu vergleichen, wobei eine Differenz in der Signalaktivität relativ zum Standard eine Krankheit oder Störung, die durch die Fehlregulation der Signalgabe von ADP an GPR86 gekennzeichnet ist, diagnostiziert.

25. Kit für die Detektion von Bindung an GPR86, für die Detektion eines Agens, das an GPR86 bindet oder für die Detektion eines Agens, das die Signalaktivität von GPR86 verringert oder erhöht, wobei das Kit ein GPR86 Polypeptid und ADP sowie Verpackungsmaterialien dafür umfasst und wobei das GPR86 Polypeptid und ADP getrennt verpackt sind.

26. Das Kit nach Anspruch 25, wobei das GPR86 Polypeptid in einer GPR86 exprimierenden Zelle vorliegt, und wobei das Kit weiterhin einen separat verpackten Antikörper umfasst, der spezifisch ist für GPR86 oder eine GPR86-spezifische Nukleinsäure-Sonde.

27. Das Kit nach Anspruch 26, wobei die Zelle ausgewählt ist aus: COS7-Zellen, CHO-Zellen, LM (TK-) Zellen, NHI-3T3-Zellen, HEK-293-Zellen, K-562-Zellen und 1321N1-Astrocytomzellen und anderen Zelllinien.

28. Das Kit nach Anspruch 27, wobei GPR86 in einer GPR86 tragenden isolierten Zellmembran vorliegt.

29. Das Kit nach einem der Ansprüche 25 bis 28, wobei das Kit außerdem die Komponenten eines sekundären Boten-Assays umfasst.

30. Das Kit nach einem der Ansprüche 25 bis 29, wobei das Kit außerdem Gα16-Polypeptid umfasst.

31. Kit für die Durchmusterung auf Agentien, die die Signalaktivität von GPR86 erhöhen oder verringern, wobei das Kit die folgenden Bestandteile umfasst:

- a) ein isoliertes Polynukleotid, das für ein GPR86 Polypeptid kodiert, ADP und Mittel zur Detektion von GPR86-Signalgaben und Verpackungsmaterialien dafür, oder
- b) eine mit einem für ein GPR86 Polypeptid kodierenden Polynukleotid transformierte Zelle, ADP und Mittel zur Detektion der GPR86 Signalgabe, wobei die Zelle und das ADP getrennt verpackt sind.

32. Das Kit nach Anspruch 31, wobei die Agentien unter Verwendung eines Antikörpers detektiert werden, der spezifisch ist für GPR86 oder eine GPR86 spezifische Nukleinsäure-Sonde.

33. Das Kit nach Anspruch 31 für die Diagnose einer Krankheit oder Störung, die durch die Fehlregulation der Signalgabe von GPR86 gekennzeichnet ist.

34. Das Kit nach Anspruch 33, wobei die Krankheit oder Störung detektiert wird mittels eines Antikörpers, der spezifisch ist für GPR86 oder eine GPR86 spezifische Nukleinsäure-Sonde.

35. Das Kit nach einem der Ansprüche 25 bis 34, wobei das Kit weiterhin einen GPR86 Aktivitätsstandard, wie er gemessen wurde in einer Zelllinie, die GPR86 in Gegenwart von ADP exprimiert, umfasst.

36. Das Verfahren oder das Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 35, wobei das ADP durch 2MeSADP, ADPβS, Ap3A, oder ein ADP-Analoges ersetzt wird/ist.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1A			45
FIG. 1B			15
FIG. 1C			90
FIG. 1			30
1	ATG AAC ACC ACA GTG ATG CAA GGC TTC AAC AGA TCT GAG CGG TGC		135
1	M N T V M Q G F N R S E R C		45
46	CCC AGA GAC ACT CGG ATA GTA CAG CTG GTA TTC CCA GCC CTC TAC		180
16	P R D T R I V Q L V F P A L Y		60
91	ACA GTG GTT TTC TTG ACC GGC ATC CTG CTG NAT ACT TTG GCT CTG		225
31	T V V F L T G I L L N T L A L		75
136	TGG GTG TTT GTT CAC ATC CCC AGC TCC TCC ACC TTC ATC ATC TAC		270
46	W V F V H I P S S S T F I I Y		90
181	CTC AAA AAC ACT TTG GTG GCC GAC TTG ATA ATG ACA CTC ATG CTT		315
61	L K N T L V A D L I M T L M L		105
226	CCT TTC AAA ATC CTC TCT GAC TCA CAC CTG GCA CCC TGG CAG CTC		
76	P F K I L S D S H L A P W Q L		
271	ACA GCT TTT GTG TGT CGT TTT TCT TCG CTG ATA TTT TAT GAG ACC		
91	R A F V C R F S S V I F Y E T		

FIG. 1A

316	ATG	TAT	GTG	GGC	ATC	GTG	CTG	TTA	GGG	CTC	ATA	GCC	TTT	GAC	AGA	360
106	M	Y	V	G	I	V	L	L	G	L	I	A	F	D	R	120
III																
361	TTC	CTC	AAG	ATC	ATC	AGA	CCT	TTG	AGA	AAT	ATT	TTT	CTA	AAA	AAA	405
121	F	L	K	I	I	R	P	L	R	N	I	F	L	K	K	135
406	CCT	GTT	TTT	GCA	AAA	ACG	GTC	TCA	ATC	TTC	ATC	TGG	TTC	TTT	TTG	450
136	P	V	F	A	K	T	V	S	I	F	I	W	F	F	L	150
IV																
451	TTC	TTC	ATC	TCC	CTG	CCA	AAT	ATG	ATC	TTG	AGC	AAC	AAG	GAA	GCA	495
151	F	F	I	S	L	P	N	M	I	L	S	N	K	E	A	165
496	ACA	CCA	TCG	TCT	GTG	AAA	AAG	TGT	GCT	TCC	TTA	AAG	GGG	CCT	CTG	540
166	T	P	S	S	V	K	K	C	A	S	L	K	C	P	L	180
541	GGG	CTG	AAA	TGG	CAT	CAA	ATG	GTA	AAT	AAC	ATA	TGC	CAG	TTT	ATT	585
181	G	L	K	W	H	Q	M	V	N	N	I	C	Q	F	I	195
586	TTC	TGG	ACT	GTT	TTT	ATC	CTA	ATG	CTT	CTG	TTT	TAT	GTG	GTT	ATT	630
196	F	W	T	V	F	I	L	M	L	V	F	Y	V	V	I	210
V																
631	GCA	AAA	AAA	GTA	TAT	GAT	TCT	TAT	AGA	AAG	TCC	AAA	AGT	AAG	GAC	675
211	A	K	K	V	Y	D	S	Y	R	K	S	K	S	K	D	225

FIG. 1B

676	AGA	AAA	AAC	AAC	AAA	AAG	CTG	GAA	GGC	AAA	GTA	TTT	GTT	GTC	GTG	720
226	R	K	N	N	K	K	L	E	G	K	V	F	V	V	V	240
721	GCT	GTC	TTC	TTT	GTC	TGT	TTT	GCT	CCA	TTT	CAT	TTT	GCC	AGA	GTT	765
241	A	V	F	F	V	C	F	A	P	F	H	F	A	R	V	255
VI																
766	CCA	TAT	ACT	CAC	AGT	CAA	ACC	AAC	AAT	AAG	ACT	GAC	TGT	AGA	CTG	810
256	P	Y	T	H	S	Q	T	N	N	K	T	D	C	R	L	270
811	CMA	NAT	CMA	CTC	TTT	ATT	GCT	AAA	GAA	ACA	ACT	CTC	TTT	TTG	GCA	855
271	Q	N	Q	L	F	I	A	K	E	T	T	L	F	L	A	285
856	GCA	ACT	AAC	ATT	TGT	ATG	GAT	CCC	TTA	ATA	TAC	ATA	TTC	TTA	TGT	900
286	A	T	N	I	C	M	D	P	L	I	Y	I	F	L	C	300
VII																
901	AAA	AAA	TTC	ACA	GAA	AAG	CTA	CCA	TGT	ATG	CAA	GGG	AGA	AAG	ACC	945
301	K	K	F	T	E	K	L	P	C	M	Q	G	R	K	T	315
946	ACA	GCA	TCA	AGC	CAA	GAA	AAT	CAT	AGC	AGT	CAG	ACA	GAC	AAC	ATA	990
316	T	A	S	S	Q	E	N	H	S	S	Q	T	D	N	I	330
991	ACC	TTA	GGC	TGA												1002
331	T	L	G	*												334

FIG. 1C

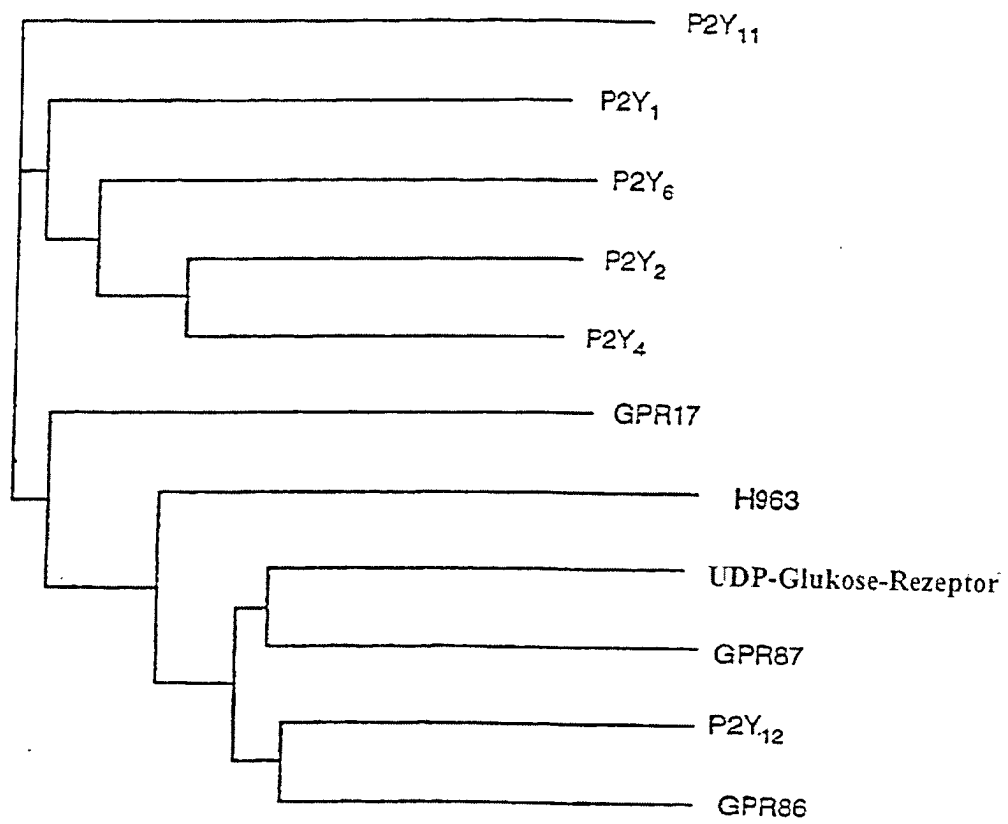


FIG. 2

FIG. 3A

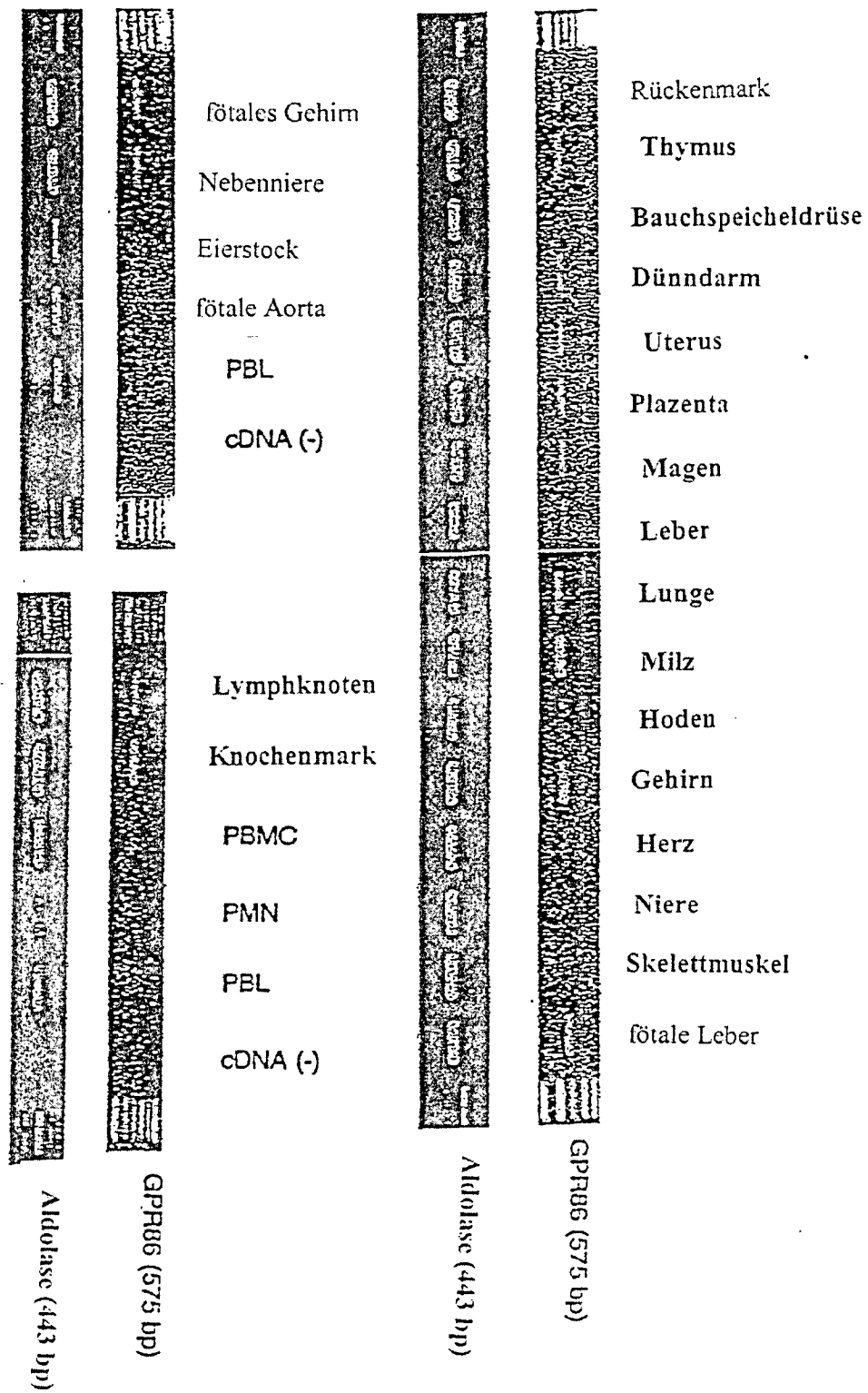
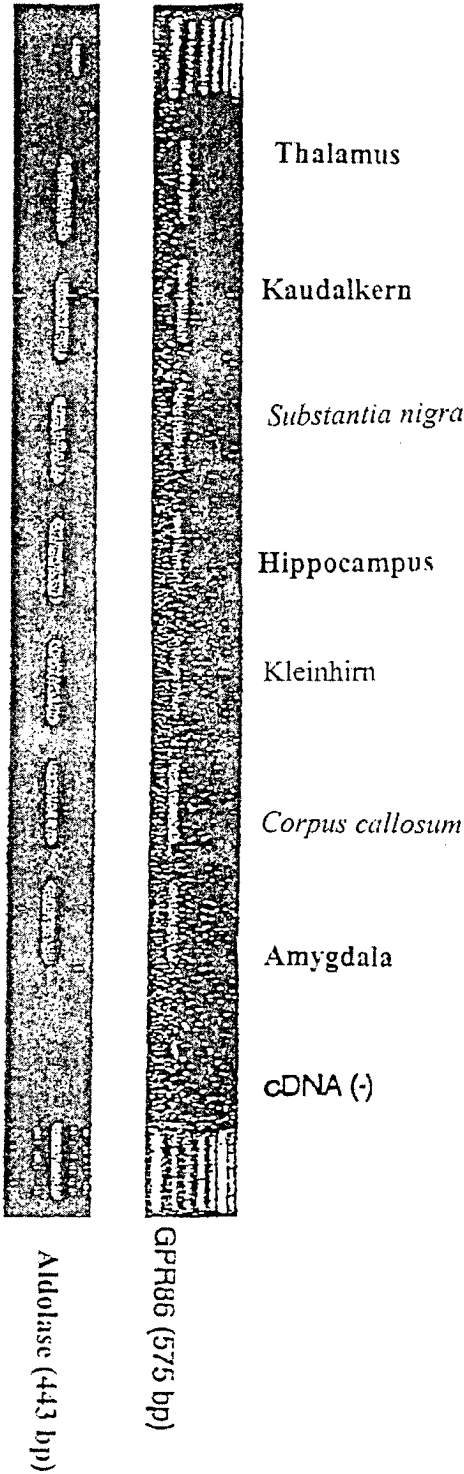


FIG. 3B



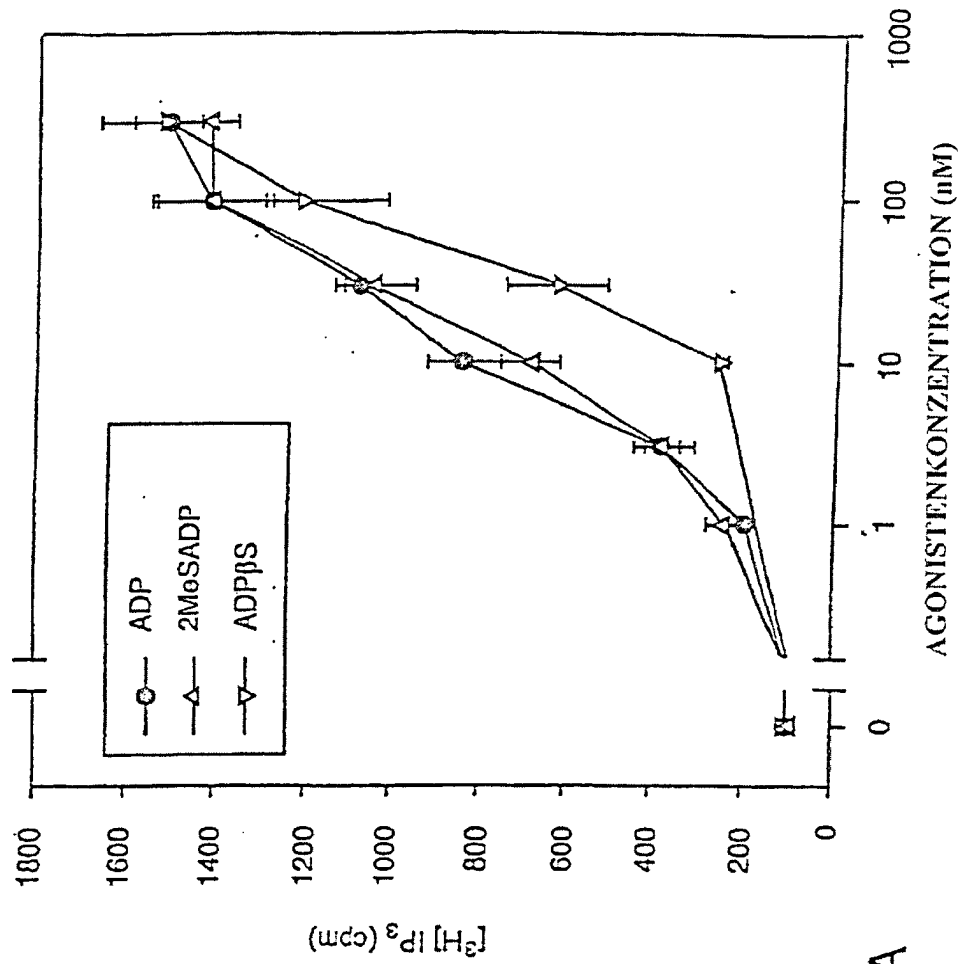


FIG. 4A

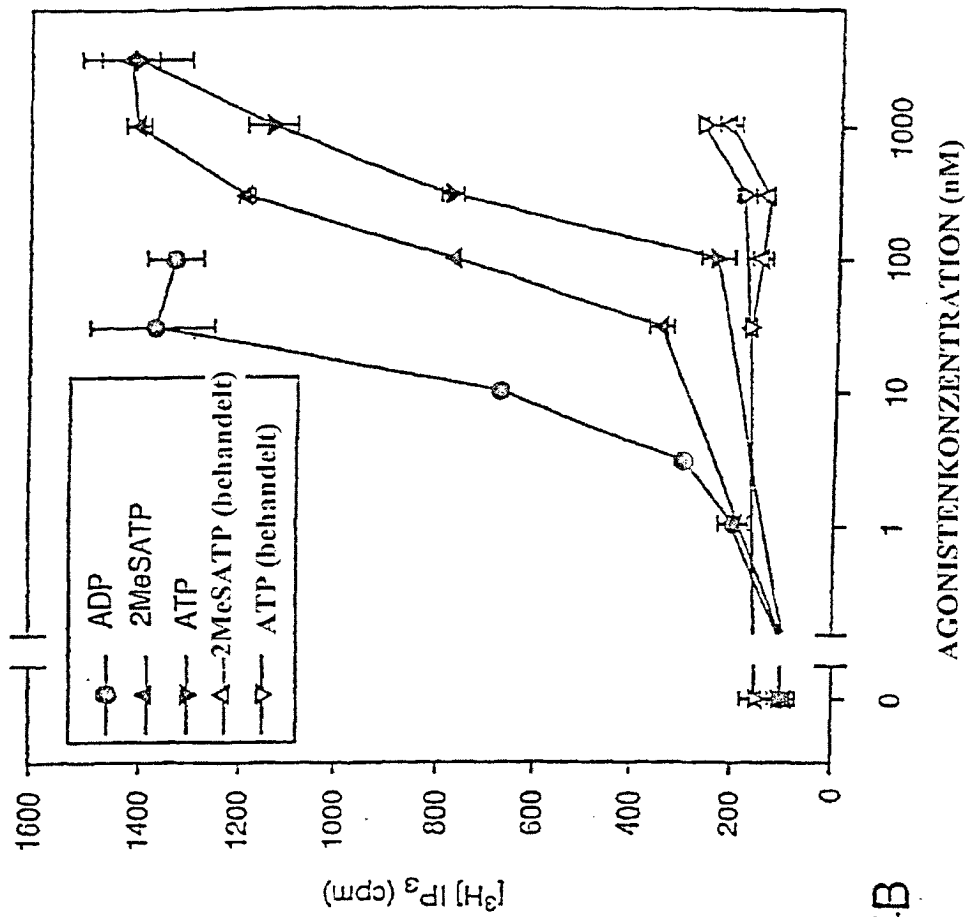


FIG. 4B

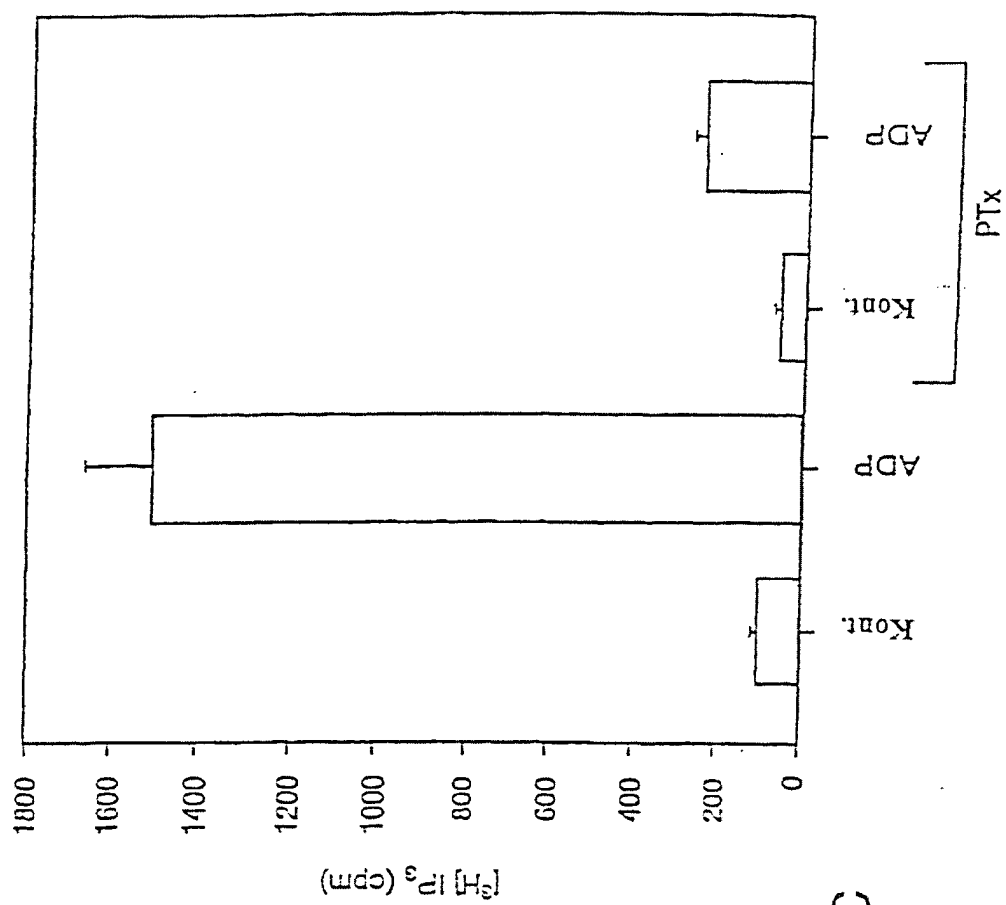


FIG. 4C

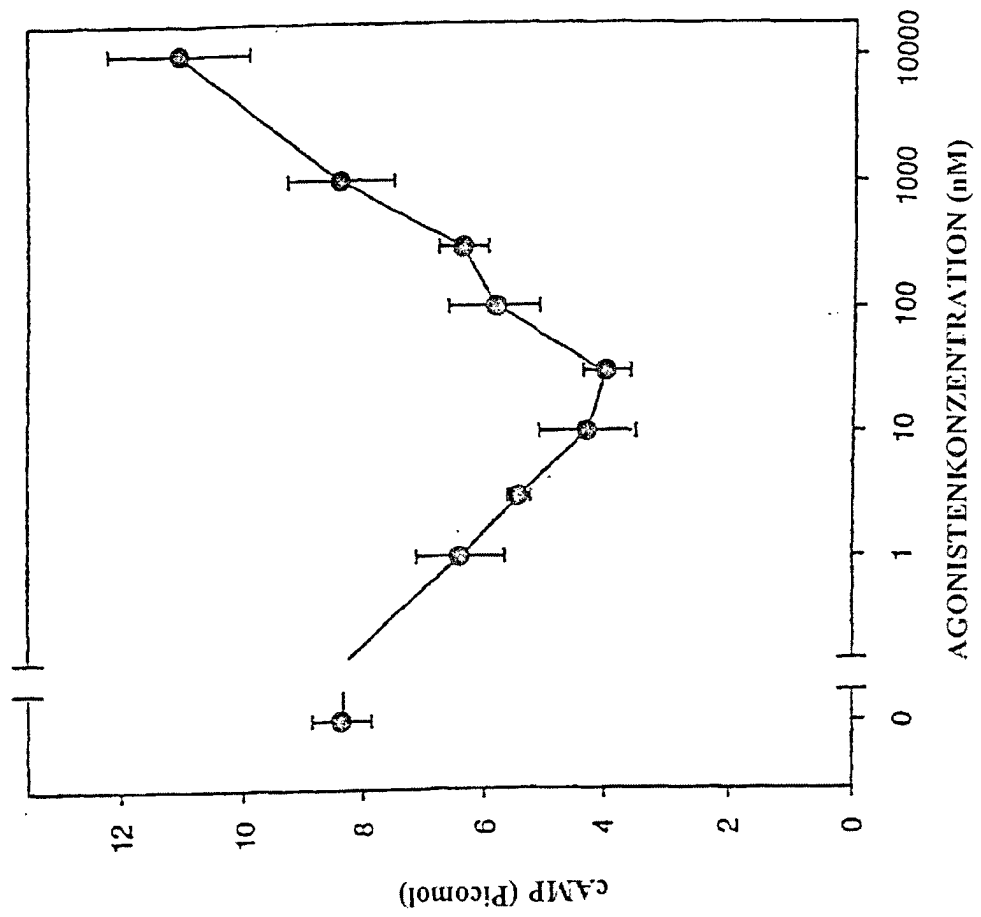


FIG. 5A

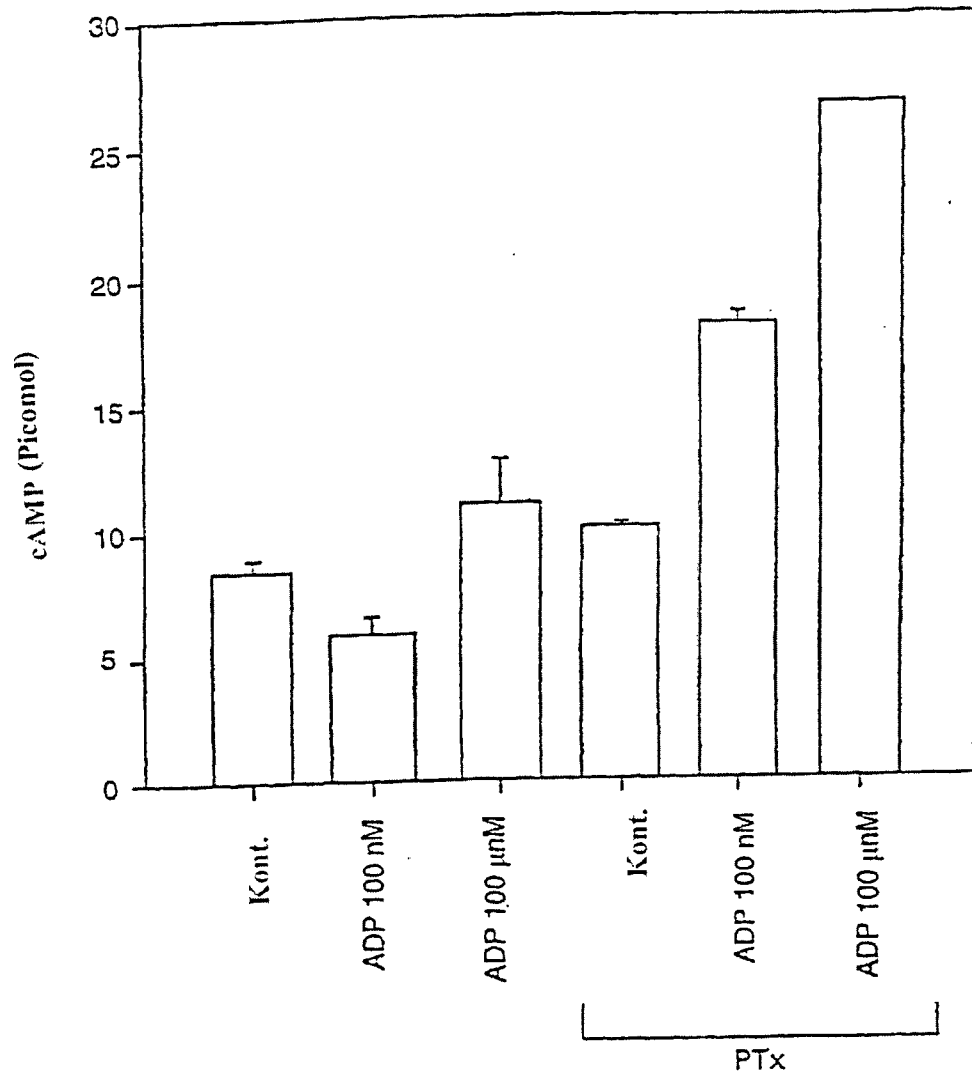


FIG. 5B

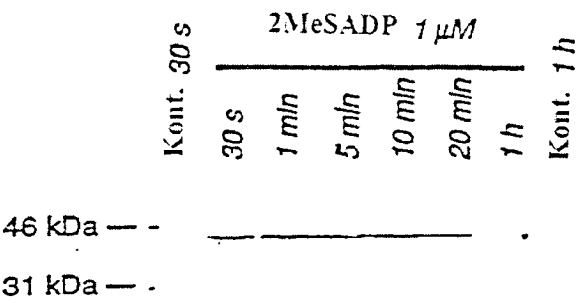
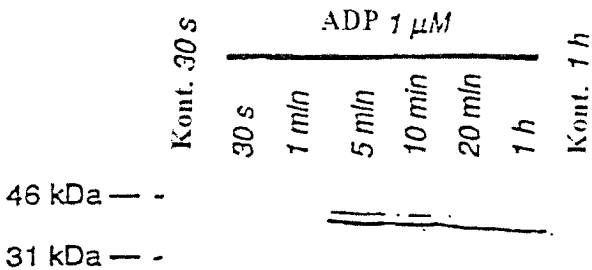


FIG. 6A

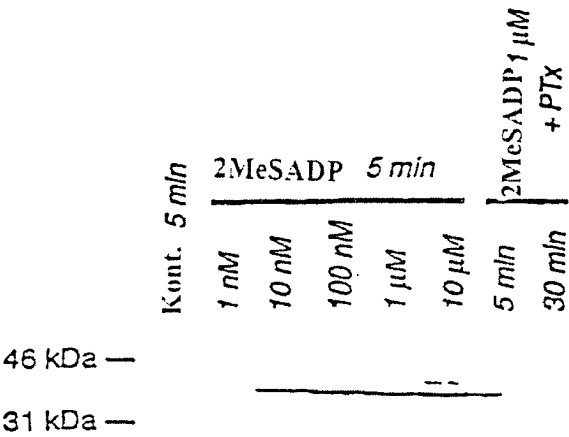
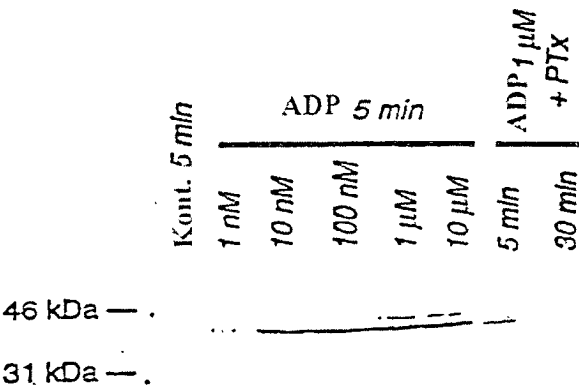


FIG. 6B

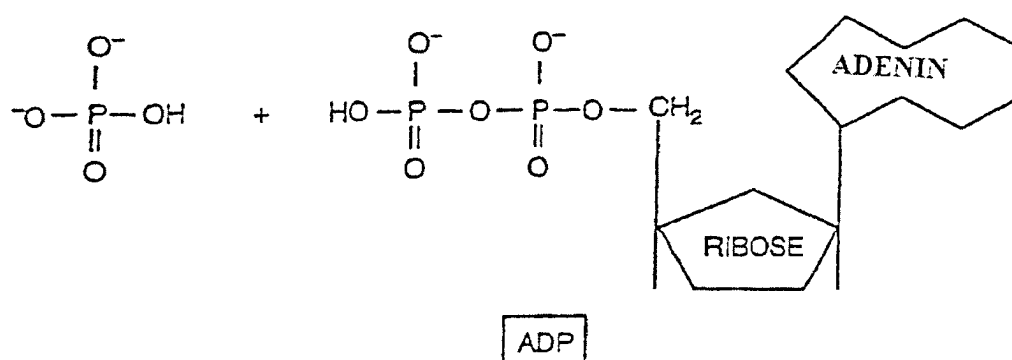


FIG. 7

FIG. 8

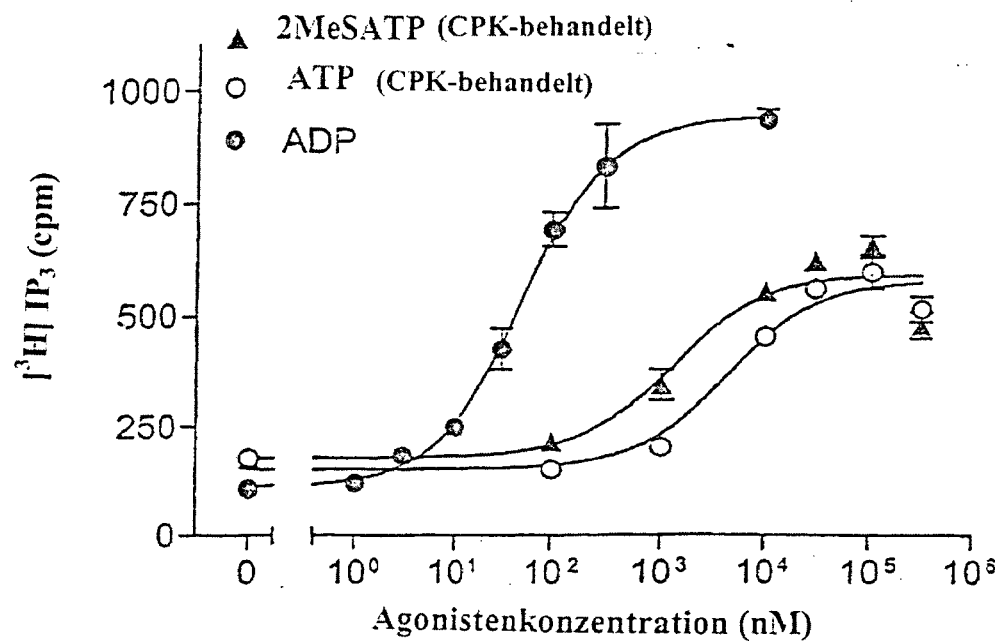


FIG. 9

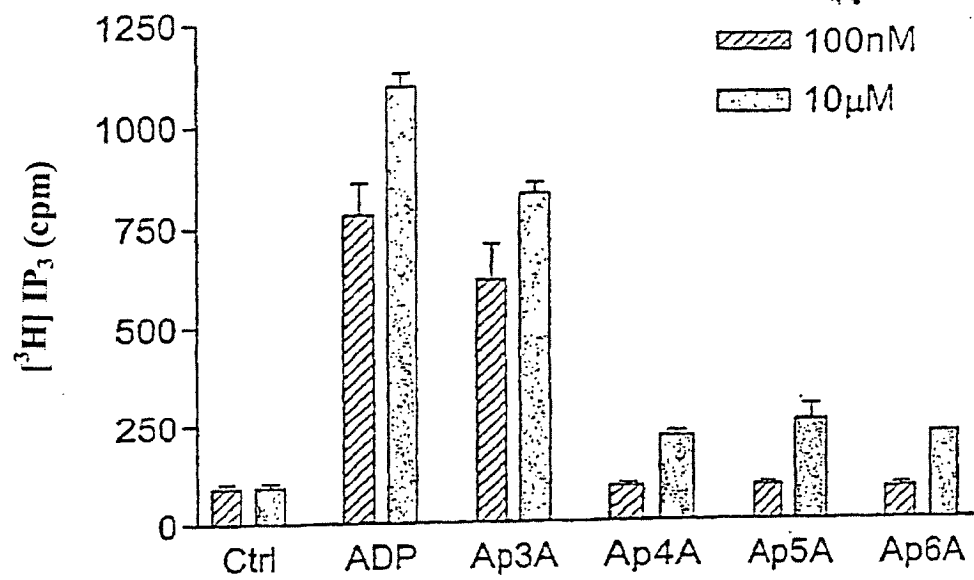


FIG. 10

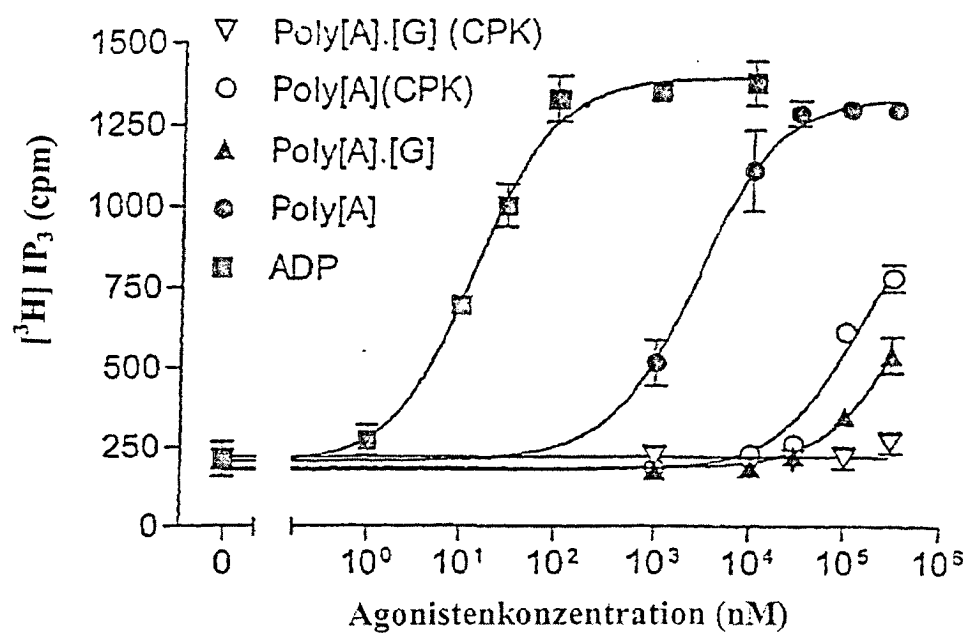


FIG. 11

