

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-522429
(P2004-522429A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 31/7105
A61K 35/74
A61K 35/76
A61K 39/395

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 31/7105
A 61 K 35/74
A 61 K 35/76
A 61 K 39/395

Z N A A
A 61 K 35/76
A 61 K 35/76
D

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 3
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 182 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-550075 (P2002-550075)
(86) (22) 出願日 平成13年12月12日 (2001.12.12)
(85) 翻訳文提出日 平成15年6月16日 (2003.6.16)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2001/014571
(87) 國際公開番号 WO2002/048358
(87) 國際公開日 平成14年6月20日 (2002.6.20)
(31) 優先権主張番号 60/255,150
(32) 優先日 平成12年12月14日 (2000.12.14)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/280,110
(32) 優先日 平成13年4月2日 (2001.4.2)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/299,474
(32) 優先日 平成13年6月21日 (2001.6.21)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 591063187
バイエル アクチエンゼルシャフト
ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン(番地なし)
D-51368 Leverkusen, Germany
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100103230
弁理士 高山 裕貢
(74) 代理人 100087114
弁理士 斎藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒトケモカイン様レセプターの調節

(57) 【要約】

ヒトケモカイン様レセプターを調節する試薬およびヒトケモカイン様レセプター遺伝子産物に結合する試薬は、HIV感染、心臓血管障害、喘息およびCOPDを含みこれに限定されない機能不全または疾患の予防、改善または是正において役割を果たすことができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 26 % 同一なアミノ酸配列；

配列番号 2 に示すアミノ酸配列；

配列番号 7 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 26 % 同一なアミノ酸配列；

配列番号 7 に示すアミノ酸配列；

配列番号 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 26 % 同一なアミノ酸配列；

配列番号 8 に示すアミノ酸配列

10

より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

b) 配列番号 1 、 4 、 5 または 9 で示される配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a) および (b) に明記したポリヌクレオチドとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) から (c) に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱している配列のポリヌクレオチド；および、

e) (a) から (d) に明記したポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異を表すポリヌクレオチド、

より成る群から選ばれるポリヌクレオチド。

20

【請求項 2】

請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされている、実質上精製されたケモカイン様レセプターポリペプチド。

【請求項 5】

以下の工程：

a) 請求項 3 に記載の宿主細胞を、ケモカイン様レセプターポリペプチドの発現に好適な条件下で培養し；そして、

b) ケモカイン様レセプターポリペプチドを宿主細胞培養から回収する、
を含む、ケモカイン様レセプターポリペプチドを調製する方法。

【請求項 6】

以下の工程：

a) 請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを生体試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成し；そして、

b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する、
を含む、生体試料中の、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを検出するための方法。

【請求項 7】

ハイブリダイゼーションの前に、生体試料の核酸材料を増幅させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

生体試料を、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載のケモカイン様レセプターポリペプチドと特異的に相互作用する試薬と接触させる工程、

を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載のケモカイン様レセプターポリペプチドを検出するための方法。

【請求項 9】

請求項 6 から 8 までのいずれかに記載の方法を実施するための診断キット。

50

【請求項 10】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされる任意のケモカイン様レセプター・ポリペプチドと接触させ；

ケモカイン様レセプター・ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、ケモカイン様レセプターの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物を、ケモカイン様レセプターの活性を低下させる可能性ある治療物質として同定する方法。

【請求項 11】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされるケモカイン様レセプター・ポリペプチドと接触させ；そして、

該ポリペプチドのケモカイン様レセプター活性を検出する工程、を含む、ケモカイン様レセプターの活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、ケモカイン様レセプター活性を増大させる被験化合物を、ケモカイン様レセプターの活性を増大させる可能性ある治療物質として同定し、そして該ポリペプチドのケモカイン様レセプター活性を低下させる被験化合物を、ケモカイン様レセプターの活性を低下させる可能性ある治療物質として同定する方法。

【請求項 12】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ；そして、

該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、

を含む、ケモカイン様レセプターの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を、ケモカイン様レセプターの活性を低下させる可能性ある治療物質として同定する方法。

【請求項 13】

細胞を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の任意のケモカイン様レセプター・ポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させ、それによりケモカイン様レセプターの活性を減少させる工程、

を含む、ケモカイン様レセプターの活性を減少させる方法。

【請求項 14】

請求項 10 から 12 のいずれかに記載の方法によって同定される、ケモカイン様レセプター・ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調節する試薬。

【請求項 15】

請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 14 に記載の試薬および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 16】

疾患におけるケモカイン様レセプターの活性を調節するための医薬の製造における、請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 14 に記載の試薬の使用。

【請求項 17】

疾患が H I V 感染、心臓血管疾患、喘息または C O P D である、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている c D N A。

【請求項 19】

配列番号 1、4、5 または 9 を含む請求項 18 に記載の c D N A。

【請求項 20】

配列番号 1、4、5 または 9 より成る請求項 18 に記載の c D N A。

【請求項 21】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

該ポリヌクレオチドが配列番号 1、4、5 または 9 より成る、請求項 2 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 3】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 4】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1、4、5 または 9 より成る、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 5】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド。 10

【請求項 2 6】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列より成る請求項 2 5 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 2 7】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 2 8】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドを調製する方法であって、該ポリペプチドをコードしている発現ベクターを含む宿主細胞を、該ポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして該ポリペプチドを単離する工程を含む方法。 20

【請求項 2 9】

発現ベクターが配列番号 1、4、5 または 9 を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

配列番号 1、4、5 または 9 に記載の 11 個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを生体試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成し；そして、

該ハイブリダイゼーション複合体を検出する、

工程を含む、配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出する方法。

【請求項 3 1】

ハイブリダイズする工程の前に核酸材料を増幅する工程をさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

配列番号 1、4、5 または 9 に記載の 11 個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；および、請求項 3 0 に記載の方法のための使用説明書、

を含む、配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出するためのキット。

【請求項 3 3】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する方法であって、生体試料を該ポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させて試薬 - ポリペプチド複合体を形成し；そして、この試薬 - ポリペプチド複合体を検出する工程を含む方法。 40

【請求項 3 4】

該試薬が抗体である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出するためのキットであって、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体；および、

請求項 3 3 に記載の方法のための使用説明書、を含むキット。

【請求項 3 6】

被験化合物を、(1) 配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 26 % 一致するアミノ酸配列、および(2) 配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列、より

成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させ；そして、該ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、ケモカイン様レセプタータンパク質の活性を調節できる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物をケモカイン様レセプタータンパク質の活性を調節する可能性ある物質と同定する方法。

【請求項 37】

接触させる工程が細胞内においてである、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

細胞がインビトロである、請求項36に記載の方法。

【請求項 39】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項36に記載の方法。

【請求項 40】

該ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 41】

被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 42】

被験化合物が該ポリペプチドに結合している標識リガンドに取って代わる、請求項36に記載の方法。

【請求項 43】

該ポリペプチドが固体支持体に結合している、請求項36に記載の方法。

【請求項 44】

被験化合物が固体支持体に結合している、請求項36に記載の方法。

【請求項 45】

被験化合物を、(1)配列番号2、7または8に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%一致するアミノ酸配列、および(2)配列番号2、7または8に示すアミノ酸配列、より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させ；そして、該ポリペプチドの活性を検出する工程、

を含む、ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドの活性を増大させる被験化合物を、ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を増大させる可能性ある物質として同定し、そして該ポリペプチドの活性を低下させる被験化合物を、ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を低下させる可能性ある物質として同定する方法。

【請求項 46】

接触させる工程が細胞においてである、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

細胞がインビトロである、請求項45に記載の方法。

【請求項 48】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項45に記載の方法。

【請求項 49】

被験化合物を、配列番号1、4、5または9に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされている産物と接触させ；そして、

該産物に対する被験化合物の結合を検出する工程、

を含む、ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、該産物に結合する被験化合物をヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を調節する可能性ある物質として同定する方法。

【請求項 50】

該産物がポリペプチドである、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

該産物がRNAである、請求項49に記載の方法。

【請求項 52】

10

20

30

40

50

細胞を、配列番号 1、4、5 または 9 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされている産物に特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を減少させる工程、

を含む、ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の活性を減少させる方法。

【請求項 5 3】

該産物がポリペプチドである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

該試薬が抗体である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

該産物が R N A である、請求項 5 2 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

該試薬がリボザイムである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

細胞がインビトロである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 9】

細胞がインビオである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 0】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する試薬 20 ；および、製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 6 1】

該試薬が抗体である、請求項 6 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 2】

配列番号 1、4、5 または 9 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの産物に特異的に結合する試薬；および、製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 6 3】

該試薬がリボザイムである、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 4】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 6 5】

該試薬が抗体である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 6】

配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている発現ベクター；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 6 7】

発現ベクターが配列番号 1、4、5 または 9 を含む、請求項 6 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 8】

ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の機能を調節する試薬の治療的有効量をそれを必要とする患者に投与し、それによりケモカイン様レセプター機能不全に関連する疾患の症状を改善する工程を含む、ケモカイン様レセプター機能不全に関連する疾患を処置する方法。

40

【請求項 6 9】

該試薬が請求項 3 6 に記載の方法によって同定される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

該試薬が請求項 4 5 に記載の方法によって同定される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

該試薬が請求項 4 9 に記載の方法によって同定される、請求項 6 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、レセプター調節の分野に関する。より具体的には、本発明はヒトケモカイン様レセプターの調節に関する。

【背景技術】

【0002】

Gタンパク質共役レセプター

多くの医学的に重要な生体プロセスは、Gタンパク質を含むシグナル伝達経路により仲介されている (Lefkowitz, *Nature* 351, 353-354, 1991)。Gタンパク質共役レセプター (GPCR) のファミリーは、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、およびウイルスに対するレセプターを包含している。GPCRの具体的例には、ドーパミン、カルシトニン、アドレナリン作動性ホルモン、エンドセリン、cAMP、アデノシン、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンビン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オブシン、内皮分化遺伝子1、ロドプシン、臭気物質、サイトメガロウイルス、Gタンパク質自身、エフェクタータンパク質、例えばホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ、ならびにアクチュエータータンパク質、例えばプロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼCといったような多彩な物質のレセプターが包含される。

【0003】

GPCRタンパク質スーパーファミリーには、オルソログ (orthologue)、即ち異なる種に由来する同じレセプターとは反対に、現在250を超えるタイプのパラログ (paralog)、即ち遺伝子の重複 (またはその他のプロセス) によって作成された変異体に代表されるレセプターが含まれている。このスーパーファミリーは、5つのファミリーに分けられる：ファミリーI、ロドプシンおよび2-アドレナリン作動性レセプターに代表され現在200を超える独特な成員によって代表される (Dohlman et al., *Ann. Rev. Biochem.* 60, 653-88, 1991および文献中の引用文献に記載)；ファミリーII、最近特徴付けられた甲状腺ホルモン/カルシトニン/セクレチンレセプターファミリー (Juppner et al., *Science* 254, 1024-26, 1991; Lin et al., *Science* 254, 1022-24, 1991)；ファミリーIII、哺乳類における代謝調節型グルタミン酸レセプターファミリー (Nakanishi, *Science* 258, 597-603, 1992)；ファミリーIV、*D. discoideum*の走性および発生に重要なcAMPレセプターファミリー (Klein et al., *Science* 241, 1467-72, 1988)；およびファミリーV、STE2等のfungal交尾フェロモンレセプター (Kurjan, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 1097-1129, 1992に記載)。

【0004】

GPCRは、少なくとも8個の異なる親水性ループを連結する、膜を貫通する7個の保存されたドメインを持っている。GPCR (7TMレセプターとしても知られる) は、少なくとも8個の異なる親水性ループを連結する、約20ないし30のアミノ酸より成るこれら7個の保存された疎水性区間を含むものとして特徴付けられている。殆どのGPCRは、最初の二つの細胞外ループの各々に单一の保存されたシステイン残基を持っており、これがジスルフィド結合を形成し、機能的タンパク質構造を安定化させると考えられている。この7個の膜貫通領域はTM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、およびTM7と呼ばれる。TM3はシグナル伝達に関わっている。

【0005】

システイン残基の磷酸化および脂質化 (パルミチル化またはファルネシル化) は、幾つかのGPCRのシグナル伝達に影響を及ぼし得る。殆どのGPCRは、第三細胞質ループおよび/またはカルボキシ末端内部に磷酸化の可能性ある部位を含んでいる。幾つかのGPCR、例えば-アドレナリン作動性レセプターでは、プロテインキナーゼAおよび/または特異的レセプターキナーゼによる磷酸化によってレセプターの脱感作が仲介される。

【0006】

幾つかのレセプターについては、GPCRのリガンド結合部位が、数個のGPCR膜貫通ドメインにより形成された親水性ソケットを含むと考えられる。この親水性ソケットは、GPCRの疎水性残基に取り囲まれている。各GPCR膜貫通ヘリックスの親水性側は、

10

20

30

40

50

内側を向き、極性リガンド結合部位を形成していると仮定されている。TM3は、リガンド結合部位、例えばTM3アスパラギン酸残基を持っている幾つかのGPCRと関連している。TM5のセリン、TM6のアスパラギン、およびTM6またはTM7のフェニルアラニンまたはチロシンもまたリガンド結合に関連している。

【0007】

GPCRは細胞内部でヘテロ三量体Gタンパク質により、種々の細胞内酵素、イオンチャネルおよび輸送体と共に作用している（Johndon et al., Endoc. Rev. 10, 317-331, 1989を参考されたい）。種々のGタンパク質サブユニットは優先的に特定のエフェクターを刺激し、細胞の様々な生体機能を調整する。GPCRの細胞質残基の磷酸化は、幾つかのGPCRの調節にとって重要な機構である。例えば、或る形のシグナル伝達においては、ホルモン結合の効果は、細胞内部での酵素アデニルシクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素の活性化はヌクレオチドGTPの存在に依存する。GTPはホルモン結合にも影響を及ぼす。Gタンパク質はホルモンレセプターをアデニルシクラーゼに結合させる。Gタンパク質はホルモンレセプターによって活性化されると、GTPを、結合したGDPに交換する。すると、GTPを有する型が、活性化アデニルシクラーゼに結合する。Gタンパク質自身により触媒されるGTPからGDPへの加水分解が、Gタンパク質をその基本的な不活性型へと戻す。したがってGタンパク質は、レセプターからエフェクターへシグナルを中継する仲介物質としての、そしてシグナルの持続を制御する時計としての、二重の役割を果たしている。

【0008】

過去15年間にわたり、GPCRレセプターを標的とする350近くの治療薬が成功裏に上市されてきた。この事は、これらのレセプターが治療薬として確立された折り紙付きの歴史を持っていることを示すものである。明らかに、細菌、真菌、原虫といった感染症、およびウイルス感染症、とりわけHIVウイルスによる感染症、疼痛、癌、食欲不振、過食症、喘息、パーキンソン病、急性心不全、低血圧症、高血圧症、尿停留、骨粗鬆症、狭心症、心筋梗塞、潰瘍、喘息、アレルギー、良性前立腺肥大、および精神障害および神経学的障害（不安定、統合失調症、躁鬱病、幻覚症状、痴呆、いくつかの精神薄弱、およびジスキネジー、ハンチントン舞蹈病およびトウレット症候群など）を包含する（但しこれに限定される訳ではない）機能不全または疾病の予防、改善または是正において役割を果たし得る、さらなるGPCRの同定および特徴づけに対する継続した需要がある。

【0009】

ケモカインレセプター

ケモカインは、様々な種類の細胞によって産生される、低分子量で、誘導性の、分泌される、炎症性サイトカインの大ファミリーである。米国特許第5,955,303号。それらは、それらの保存されたシステインの位置に基づいて、いくつかのサブファミリーに分ける。CXCファミリーには、インターロイキン8（IL-8）、成長調節遺伝子、好中球活性化ペプチド-2、および血小板第4因子（PF-4）が含まれる。IL-8およびPF-4はいずれも多形核の化学誘引物質であり、血管形成はIL-8により刺激され、PF-4により阻害される。CCファミリーには、単球走化性タンパク質1（MCP-1）、RANTES（活性化により調節される、正常T細胞で発現し分泌される）、マクロファージ炎症性タンパク質（MIP-1_α、MIP-1_β）、およびエオタキシンが含まれる。MCP-1は、内皮細胞、上皮細胞、および造血細胞を含む、多くの種類の細胞によって分泌され、単球およびCD45RO⁺リンパ球に対する化学誘引物質である（Proost, P. (1996) Int J. Clin. Lab. Res. 26: 211-223; Raport, C. J. (1996) J. Biol. Chem. 271: 17161-17166）。

【0010】

細胞は、Gタンパク質共役レセプターを介してケモカインに応答する。これらのレセプターは7回膜貫通型分子であり、この分子がヘテロ3量体のGTP結合タンパク質を介してこれらのシグナルを伝達する。活性化レセプターによるGTP結合タンパク質複合体の刺激は、グアノシン二リン酸とグアノシン三リン酸の交換につながり、エフェクター分子の

10

20

30

40

50

活性を調節する。活性および特異性において異なるサブユニットそれぞれの別個のクラスが存在し、阻害または刺激応答を惹起し得る。既知のサイトカインレセプターの刺激がアデニリルサイクラーゼおよび細胞内のカルシウムの移動のアゴニスト依存的な阻害を示す場合、そのレセプターはG_iサブユニットに結合している (Myers, S. J. et al (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 5786-5792)。

【0011】

サイトカインレセプターは、免疫系の細胞の移動および活性化において主要な役割を担っている。レセプター刺激の硬化は、細胞の種類に依存し、サイトカインの走化性、増殖、分化および産生を含む。ケモカイン刺激産物は血管内皮における変化、炎症の部位への走化性をもたらし、細胞のエフェクター機能を活性化する (Taub, D. D. (1996) *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 355-376)。

【0012】

ケモカインレセプターは、ある範囲の配列の多様性およびリガンド交差反応性 (ligand promiscuity) を示す。既知のケモカインレセプタータンパク質配列の同一性は、22~40%の範囲であり、ある特定のレセプターは、複数のリガンドに対して応答し得る。免疫細胞においておもに発現するが、ウイルスホモローグは、ヒトサイトメガロウイルスおよびリスザルヘルペスウイルスによって発現する。ダッフィ血液型抗原として知られるケモカインレセプターは、C_CおよびC_XCファミリーケモカインの両方に結合し、三日熱マラリア原虫に対する赤血球上のレセプターとして供する。ケモカインレセプターは、宿主細胞において、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) が侵入する間重要な役割を担う。最初の事象は、ウイルスエンベロープ糖タンパク質と2つの細胞内レセプター、即ちCD4およびケモカインコレセプターとの間の特異的な相互作用を必要とする。後者は、主要なコレセプターCCR5, CXCR4および他の重要度の低いCCR3, CCR2b, CCR8, CX3CR1が含まれる、7回膜貫通型Gタンパク質共役レセプターのファミリーに属する。Moore et al., *Curr. Opin. Immunol.* 9, 551-562, 1997。

【0013】

ケモカインは様々な炎症性および自己免疫疾患に関与していると考えられ、そのことにより、ケモカインおよびそのレセプターは非常に魅力的な治療標的である。実際、7つのケモカインレセプターファミリーの小分子アンタゴニストが既に報告されており、いくつかは低いナノモル濃度の範囲で効力を有する。Schwarz & Wells, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 407-17, 1999。単球およびCD8⁺の移動および活性化に影響を及ぼす新規のケモカインはまだ発見されていないと思われる。

【0014】

ケモカインレセプターは重要であるため、そのレセプターを調節して治療効果をもたらすようなこのレセプターのファミリーのさらなる成員を同定することが当分野で必要とされている。

【発明の開示】

【0015】

発明の要旨

本発明の目的は、ヒトケモカイン様レセプターを調節する試薬および方法を提供することである。本発明のこのおよびその他の目的は、下に記載する1またはそれ以上の態様によって提供する。

【0016】

本発明の一つの態様は、

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列

10

20

30

40

50

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むケモカイン様レセプターポリペプチドである。

【0017】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックスの分解を減少させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むケモカイン様レセプターポリペプチドと接触させる。

【0018】

被験化合物とケモカイン様レセプターポリペプチドとの結合を検出する。それにより、ケモカイン様レセプターポリペプチドに結合する被験化合物を、細胞外マトリックス分解を減少させる可能性のある物質として同定する。この物質はケモカイン様レセプターの活性を減少させることによって作用し得る。

【0019】

本発明の別の態様は、細胞外マトリックス分解を調節する物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号1に示すヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列；

配列番号9に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号9に示すヌクレオチド配列；

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと接触させる。

【0020】

このポリヌクレオチドに対する化合物の結合を検出する。このポリペプチドに結合する試験化合物を、細胞外マトリックス分解を増大させる可能性のある物質として同定する。この物質は、ケモカイン様レセプター-mRNAとの相互作用を介してケモカイン様レセプターの量を減少させることによって作用し得る。

【0021】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を調節する物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むケモカイン様レセプターポリペプチドと接触させる。

【0022】

ポリペプチドのケモカイン様レセプター活性を検出する。ポリペプチドのケモカイン様レセプター活性を、試験化合物不在下でのケモカイン様レセプター活性と比較して増加させ

10

20

30

40

50

る試験化合物は、それにより、細胞外マトリックス分解を増大させる可能性のある物質として同定する。ポリペプチドのケモカイン様レセプター活性を、その試験化合物の不在下でのケモカイン様レセプター活性と比較して減少させる試験化合物は、それにより、細胞外マトリックス分解を減少させる可能性のある物質として同定する。

【0023】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号1に示すヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列； 10

配列番号4に示すヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列；

配列番号9に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号9に示すヌクレオチド配列；

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドのケモカイン様レセプター産物と接触させる。

【0024】

このケモカイン様レセプター産物に対する試験化合物の結合を検出する。このケモカイン様レセプター産物と結合する試験化合物を、それにより、細胞外マトリックス分解を減少させる、可能性のある物質として同定する。 20

【0025】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる方法である。細胞を、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号1に示すヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列；

配列番号9に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；

配列番号9に示すヌクレオチド配列；

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合する物質または、そのポリヌクレオチドによってコードされる産物と接触させる。 30

【0026】

細胞中のケモカイン様レセプター活性は、それにより減少する。

【0027】

このように、本発明は、例えば、そのヒトケモカイン様レセプターの活性部位でアクチベーターまたはインヒビターとして作用し得る試験化合物を同定するために用いることができるヒトケモカイン様レセプターを提供する。ヒトケモカイン様レセプターおよびその断片はまた、そのレセプターをブロックおよび効果的にそのレセプターの活性を減少することができる特異的な抗体を惹起するのに有用である。 40

【0028】

(発明の詳細な記載)

本発明は、以下からなる群から選択される、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドに関する：

a) 配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列と少なくとも約26%同一なアミノ酸配列；

配列番号7に示すアミノ酸配列；

配列番号 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 26 % 同一なアミノ酸配列； および配列番号 8 に示すアミノ酸配列；

b) 配列番号 1 、 4 、 5 または 9 に示す配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a) および (b) に示すポリヌクレオチドとストリングントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) その配列が、遺伝コードの縮重のために (a) ~ (c) に示したポリヌクレオチド配列とは異なるポリヌクレオチド； および

e) (a) ~ (d) に示すポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異を示すポリヌクレオチド。

【 0029 】

10

さらに、本発明者によって、新規なケモカイン様レセプター、特にヒトケモカイン様レセプターは、HIV 感染、心血管疾患、喘息または COPD を処置するための治療方法に用いることができる事が発見された。

【 0030 】

新規のヒトケモカイン様レセプター転写物は、356 アミノ酸、計算された分子量 41,4 kD のポリペプチドをコードする。ヒトケモカイン様レセプターの翻訳の解析により、このタンパク質は、GPCR の構造と一致して、推定される 7 個の膜貫通ドメインを含んでいる事が分かっている。この遺伝子は 2 つのエクソンから成っている。

20

【 0031 】

ヒトケモカイン様レセプターのアミノ酸配列は、その全長にわたり、最も近いヒト同族体、C-Cケモカインレセプター 3 (CCR3) と 17.6 % 同一であることを示している。この数値は、関係する物理化学的特性を有するアミノ酸を含めた場合、配列全体の類似性が 34.1 % に増加する。ヒトケモカイン様レセプターと他のケモカインレセプターとの相同性は同様に 13 ~ 17 % の範囲の全体の同一性、29 ~ 32 % の類似性を示す。新規のヒトケモカイン様レセプターは、さらに甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンレセプター (TRHR) に対して、同一性が 17.9 % 、類似性が 32.8 % であり、同等の配列相同性を示すが、構造的には、TRHR は、ヒトケモカイン様レセプターには見られない第 5 と第 6 の膜貫通ドメインの間の伸長した第 3 の細胞質ループを有している (図 12) 。

【 0032 】

ヒトケモカイン様レセプター mRNA 発現を、いくつかの異なるヒト組織、細胞型、および一般的に用いられる細胞系において試験した (図 13) 。試験した組織のなかで、胎児脳は最も顕著な発現を示し、脾臓と肺は中程度の発現レベルを示した。新規のケモカイン様レセプターは、大部分の組織では低いレベルで発現すると考えられ、このことは、血液または血管細胞などの様々な異なる組織において見られる細胞型における発現を示している。

30

【 0033 】

試験した特定の細胞型または細胞系では、ヒトケモカイン様レセプターは、フィトヘマグルチニン刺激した CD8⁺ 細胞において高いレベルで発現することがわかったが、試験した他の免疫細胞はいずれも顕著ではなかった。ヒト胎児肺線維芽細胞系 IMR-90 においても高い発現が観察され、正常気管支 / 気管上皮細胞において中程度の発現が見られた。

40

【 0034 】

活性化 CD8⁺ 細胞におけるその高い発現およびケモカインレセプターに対する相同性はともに、新規なヒトケモカイン様レセプターが活性化されたリンパ細胞上の化学誘引分子の受容体としてはたらくことができ、それにより、他のケモカインレセプターと同じようにして、細胞の移動 (cell trafficking) 、および感染、炎症または組織損傷の部位への誘導に関与する。したがって、新規のヒトケモカイン様レセプターの活性の調節は、喘息および COPD が含まれるがこれに限定されない、心臓血管の、免疫学的および炎症性の疾患を処置するために用いることができる。脳および CD8⁺ リンパ細胞における発現を合わせると、このレセプターは神経系に存在するウイルスの有益な標的であることを示唆

50

している。したがって、リガンド、例えば化学誘引分子またはウイルス粒子、のこのレセプターとの結合を調節すること、このレセプターが免疫応答を調節するための、または、HIV感染を含むがこれに限定されない、ウイルス感染を阻害するためのメカニズムとして用いることができる。

【0035】

ヒトケモカイン様レセプターは、配列番号2、7または8に示されるアミノ酸配列を含む。ヒトケモカイン様レセプターのコード配列は、配列番号1、4および5に示される。コード配列を含むより長い配列は、配列番号5に示される。この配列は第16染色体に位置する。別の開始コドンおよび終止コドンは図12において太字で示される。

【0036】

ヒトケモカイン様レセプターは、SwissProt受託番号No.56492(配列番号3)として同定され、「C-Cケモカインレセプター3型」(図10)と称するタンパク質と331アミノ酸にわたって24.7%同一である。ヒトケモカイン様レセプターは、図10において太字で示されるように、第2の細胞質ループに存在する、保存された酸性-Arg-芳香族トリプレットを有する。

【0037】

本発明のヒトケモカイン様レセプターは、以前に同定されたケモカインレセプターと同じ目的に関して有用であると期待される。ヒトケモカイン様レセプターは、HIV感染、心臓血管疾患、喘息およびCOPDなどの疾患を処置するための治療方法において有用であると考えられる。ヒトケモカイン様レセプターはまた、ヒトケモカイン様レセプター-アチベーターおよびインヒビターをスクリーニングするために使用することもできる。

【0038】

本発明に係るヒトケモカイン様レセプターポリペプチドには、配列番号2に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸配列から選択される、少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350または353個の連続アミノ酸、配列番号7に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸配列から選択される、少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350または357個の連続アミノ酸、配列番号8に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸配列から選択される、少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325または344個の連続アミノ酸、または以下に定義されるその生物学的に活性体変異体が含まれる。したがって、本発明のヒトケモカイン様レセプターポリペプチドは、ヒトケモカイン様レセプタータンパク質の一部、完全長のヒトケモカイン様レセプタータンパク質、又はヒトケモカイン様レセプタータンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。本発明に係るヒトケモカイン様レセプターポリペプチドには、配列番号11に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550または562個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明のヒトケモカイン様レセプターポリペプチドは、ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドの一部、完全長のヒトケモカイン様レセプターポリペプチド、又はヒトスフィンゴシンepitope-binding fragments thereof), and small organic or inorganic molecules. キナーゼ様タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

【0039】

生物学的に活性な変異体

生物学的に活性な、即ちケモカイン活性を保持する、ヒトケモカイン様レセプターポリペプチド変異体もまた、ケモカイン様レセプターポリペプチドである。好ましくは、天然または非天然に存在するケモカイン様レセプターポリペプチド変異体は、配列番号2、7または8に示すアミノ酸配列またはその断片と少なくとも約26、30、35、40、45

10

20

30

40

50

、50、55、65または70、好ましくは約75、80、85、90、96、96または98%一致するアミノ酸配列を有する。推定されるケモカイン様レセプターポリペプチド変異体と配列番号2、7または8のアミノ酸配列との一致パーセントは、管用の方法によって決定する。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986)、およびHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)を参照。簡潔には、2つのアミノ酸配列を、ギャップオープニングペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ1、およびHenikoff and Henikoff (ibid.)の「BLOSUM62」スコアリングマトリクスを用いてアライメントスコアが最適になるよう整列させる。当業者は、2つのアミノ酸配列を整列させるために用いることができる確立されたアルゴリズムが多く存在することを理解している。Pearson and Lipmanの「FASTA」類似性検索アルゴリズムは、本明細書に開示されたアミノ酸配列と推定の変異体のアミノ酸配列が共有する同一性のレベルを調べるための適当なタンパク質アライメント法である。FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988)、およびPearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990)に記載されている。簡潔には、FASTAは、最初に、保存的なアミノ酸置換、挿入または欠失を考慮することなく、照会する配列(即ち、配列番号2、7または8)および最も高い同一性の密度(ktup変数が1である場合)または同一の対(ktup = 2の場合)のいずれかを有する試験配列が共有する領域を同定することによって配列の類似性を特徴付ける。次いで、最も高い同一性の密度を有する10の領域を、アミノ酸置換マトリクスを用いてすべての対のアミノ酸の類似性を比較することによって再スコア化し、その領域の末端を、最も高いスコア貢献する残基のみを含むように切り取る。「切り捨て(cutoff)」値(配列の長さとktup値に基づいて所定の式によって計算された)よりも大きいスコアを有する領域がいくつか存在する場合は、切取った最初の領域を調べ、その領域が連結してgapを有する近似アライメントを形成することができるかどうかを決定する。最後に、2つのアミノ酸配列の最も高いスコアの領域を、アミノ酸挿入および欠失を許容する、Needleman-Wunsch-Sellers algorithm (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787 (1974))を用いて整列させる。FASTA分析に好ましいパラメーターは、以下のとおりである: ktup=1, ギャップオープニングペナルティ=10, ギャップ伸長ペナルティ=1、および置換マトリクス=BLOSUM62。これらのパラメータは、Appendix 2 of Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990)において説明されているように、スコアリングマトリクスファイル(「SMATRIX」)に修飾を施してFASTAプログラムに導入することができる。FASTAは、上記の比率を用いて核酸分子の配列同一性を決定するために用いることができる。又クレオチド配列の比較に関して、ktup値は、1~6の範囲内であり得、好ましくは3~6の範囲、最も好ましくは3であり、他のパラメータは既定値である。

【0040】

同一性の百分率における変化は、例えばアミノ酸置換、挿入または欠失に起因し得る。アミノ酸置換は1対1のアミノ酸の置き換えとして定義される。置換されたアミノ酸が類似の構造的および/または化学的性質を有する場合、置換は保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタミン酸塩によるアスパラギン酸塩の置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

【0041】

アミノ酸挿入または欠失は、アミノ酸配列への、またはその内部での変化である。これらは典型的には約1ないし5アミノ酸の範囲で起こる。ケモカイン様レセプターポリペプチドの生物学的または免疫学的活性を廃絶することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失できるかを決定する際の指針は、当分野で周知のコンピュータープログラム、例えばDNASTARソフトウェアを用いて見出すことができる。或るアミノ酸変化が生物学的に活性なケモカイン様レセプターポリペプチドを生成するか否かは、例えば米国特許第5,955,303号に記載のように、ケモカイン様レセプターを分析することによって容易に決定できる。

【0042】

10

20

30

40

50

融合タンパク質

融合タンパク質は、ケモカイン様レセプターポリペプチドアミノ酸配列に対する抗体の作製に、そして様々な検定系での使用に有用である。例えば、融合タンパク質は、ケモカイン様レセプターポリペプチドの一部と相互作用するタンパク質の同定に使用できる。タンパク質親和クロマトグラフィーまたはタンパク質-タンパク質相互作用のためのライブライナーに基づく検定、例えば酵母 2 - ハイブリッドまたはファージディスプレイ系をこの目的のために使用できる。このような方法は当分野で周知であり、薬物スクリーニングとしても使用できる。

【0043】

ケモカイン様レセプターポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合により融合した 2 のポリペプチドセグメントを含んでいる。第一のポリペプチドセグメントは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列から選択される少なくとも 6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、225、250、275、300、325、350 または 353 の連続アミノ酸、配列番号 7 に示すアミノ酸配列から選択される少なくとも 6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、225、250、275、300、325、350 または 357 の連続アミノ酸、配列番号 8 に示すアミノ酸配列から選択される、少なくとも 6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、225、250、275、300、325、350 または 344 の連続アミノ酸、または、上記に記載したようなその生物学的に活性な変異体を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長ケモカイン様レセプタタンパク質を含むことができる。

【0044】

第二のポリペプチドセグメントは、完全長タンパク質またはタンパク質断片であってよい。融合タンパク質の組み立てに一般的に使用するタンパク質は、- ガラクトシダーゼ、- グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、自己蛍光タンパク質 (青色蛍光タンパク質 (BFP) を包含する)、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST)、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を包含する。さらに、融合タンパク質の組み立てには、ヒスチジン (His) 標識、FLAG 標識、インフルエンザヘマグルチニン (HA) 標識、Myo 標識、VSV - G 標識、およびチオレドキシン (Trx) 標識を包含するエピトープ標識を使用する。その他の融合組み立て物は、マルトース結合タンパク質 (MBP)、S - 標識、Lex a DNA 結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4 DNA 結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス (HSV) BP16 タンパク質融合物を包含する。融合タンパク質はさらに、ケモカイン様レセプターポリペプチドコード配列とヘテロローガスタンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むよう組み立てることができ、その結果、このケモカイン様レセプターポリペプチドが開裂して、ヘテロローガス部分から精製することができる。

【0045】

融合タンパク質は当分野で周知のように化学合成できる。好ましくは、融合タンパク質は二つのポリペプチドセグメントを共有結合で連結することにより、または分子生物学分野で標準的な方法により調製する。例えば、当分野で知られているように、第二のポリペプチドセグメントをコードしているヌクレオチドを有する適切なリーディングフレームに配列番号 1 の相補物から選ばれるコード配列を含む、DNA 組み立て物を作製し、この DNA 組み立て物を宿主細胞で発現させる事による組換え DNA 法を用いて、融合タンパク質を調製できる。融合タンパク質を組み立てるための多くのキットが、Promega Corporation (Madison, WI)、Stratagene (La Jolla, CA)、CLONTECH (Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA)、および Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS) といった企業から入手できる。

【0046】

10

20

30

40

50

種相同体の同定

ケモカイン様レセプターポリペプチドのポリヌクレオチド(下記)を使用して他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングするために好適なプローブまたはプライマーを作製し、ケモカイン様レセプターポリペプチドの相同体をコードしているcDNAを同定し、そして当分野で周知のようにこのcDNAを発現させて、ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドの種相同体を得ることができる。

【0047】

ポリヌクレオチド

ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であってよく、ケモカイン様レセプターポリペプチドのコード配列またはこのコード配列の相補体を含んでいる。ケモカイン様レセプターのコード配列は配列番号1、4および5に示す。

【0048】

ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている縮重ヌクレオチド配列、および、配列番号1、4または5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50、55、60、65、70%、好ましくは約75、90、96、もしくは98%一致するホモローガスなヌクレオチド配列またはこれらの相補物もまた、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチド配列間の配列一致パーセントは、ALIGNのようなコンピュータープログラムを用いて決定するが、これは、ギャップオーブンペナルティー-12およびギャップエクステンションペナルティー-2によるアフィンギャップ検索を用いるFASTAアルゴリズムを使用するものである。相補的DNA(cDNA)分子、種相同体および生物学的に活性なケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの変異体もやはりケモカイン様レセプターポリヌクレオチドである。

【0049】

ポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記のケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの変異体および相同体もまたケモカイン様レセプターポリヌクレオチドである。典型的には、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチド配列は、当分野で周知のように、ストリンジエントな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知のケモカイン様レセプターポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより同定できる。例えば、以下の洗浄条件--2XSSC(0.3MNaCl、0.03Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.1%SDS、室温2回、各々30分間；次いで2XSSC、0.1%SDS、501回、30分間；次いで2XSSC、室温2回、各々10分間--を使用して、最大約25-30%の塩基対ミスマッチを含むホモローガス配列を同定できる。より好ましくは、ホモローガス核酸鎖は15-25%の塩基対ミスマッチを、さらに好ましくは5-15%の塩基対ミスマッチを含む。

【0050】

本明細書に開示するケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの種相同体はさらに、適当なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。二本鎖DNAのT_mは相同性が1%低下する毎に1-1.5低下することがよく知られている(Bonner et al., J.Mol.Biol. 81, 123(1973))。故にヒトケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの変異体または他の種のケモカイン様レセプターポリヌクレオチドは、推定のホモローガスケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを、配列番号1のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズさせて被験ハイブリッドを作製することによって同定できる。被験ハイブリッドの融解温度を、完全に相補的なヌクレオチド配列を有するトランスホルミラーゼポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較し、被験ハイブリッドの中の塩基対ミスマッチのパーセント数を算出する。

【0051】

10

20

30

40

50

ストリンジエントなハイブリダイゼーションおよび／または洗浄条件に従いケモカイン様レセプターポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列もまたケモカイン様レセプターポリヌクレオチドである。ストリンジエントな洗浄条件は当分野で周知且つ理解されており、例えばSambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, 9.50-9.51頁に開示されている。

【0052】

典型的には、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件のためには、温度と塩濃度の組み合わせを、検討中のハイブリッドの理論的 T_m よりおよそ 12 - 20 低くなるよう選択すべきである。配列番号 1、4 または 5 に示すヌクレオチド配列を有するケモカイン様レセプターポリヌクレオチドまたはその相同体と、それらのヌクレオチド配列のいずれか 1 つと少なくとも約 50、好ましくは約 75、90、96、または 98 % 一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの T_m は、例えばBolton and McCarthy, Proc.Natl Acad.Sci. U.S.A. 48,1390(1962)の式：

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% G + C) - 0.63 (\% ホルムアミド) - 600 / l,$$

[式中、l = 塩基対で表したハイブリッドの長さ]

を用いて算出できる。

【0053】

ストリンジエントな洗浄条件としては例えば、4 X SSC (65)、または 50 % ホルムアミド、4 X SSC (42)、または 0.5 X SSC、0.1 % SDS (65) が挙げられる。高度ストリンジエントな洗浄条件は、例えば 0.2 X SSC (65) などである。

【0054】

ポリヌクレオチドの調製

ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドは、膜構成成分、タンパク質および脂質といった他の細胞成分を含まないよう単離できる。ポリヌクレオチドは細胞から調製でき、標準的核酸精製技術を用いて単離、またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような増幅技術を用いて合成、もしくは自動合成機を用いることによって調製できる。ポリヌクレオチドを単離する方法は常套的であり、当分野で知られている。ポリヌクレオチドを取得するためこのような任意の技術を用いて、単離されたケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、制限レセプターおよびプローブを用いてケモカイン様レセプターヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離できる。単離したポリヌクレオチドは、他の分子を少なくとも 70、80、または 90 % 含まない調製物である。

【0055】

ヒトケモカイン様レセプター cDNA 分子は、ケモカイン様レセプター mRNA を鑄型に用いて標準的分子生物学技術にて調製できる。その後ケモカイン様レセプター cDNA 分子は、当分野で周知であり Sambrook et al. (1989) のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いて複製できる。ヒトゲノム DNA または cDNA を鑄型に使用して本発明に係るポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るため、PCR のような増幅技術を用いることができる。

【0056】

別法として、合成化学技術を用いてケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝コードの縮重は、例えば配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するケモカイン様レセプターポリペプチドまたはその生物学的に活性な変異体をコードする、別のヌクレオチド配列の合成を可能にする。

【0057】

ポリヌクレオチドの伸長

PCR に基づく様々な方法を用いて本明細書に開示の核酸配列を伸長させ、プロモーターおよび調節エレメントといった上流配列を検出することができる。例えば制限部位 PCR は、既知の座に隣接する未知配列を回収するため、普遍的プライマーを使用する (Sarkar

10

20

30

40

50

, PCR Methods Applic. 2, 318-322, 1993)。まず、ゲノムDNAを、リンカー配列に対するプライマーおよび既知領域に対し特異的なプライマーの存在下で増幅する。次に、増幅させた配列を、同じリンカープライマーおよび最初のものの内部にある別の特異的プライマーを用いる第二回目のPCRに付す。各回のPCRの産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し、逆転写酵素を用いて配列決定する。

【0058】

既知領域に基づく異なるプライマーを用いて配列を増幅または伸長するために、逆PCRを使用することもできる(Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16, 8186, 1988)。OLIGO 4.06 Primer Analysisソフトウェア(National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.)のような市販ソフトウェアを用いて、長さ22-30ヌクレオチド長、50%またはそれ以上のGC含有量を持ち、約68-72の温度で標的配列とアニーリングするプライマーを設計できる。この方法は、遺伝子の既知領域に適当な断片を作り出す幾つかの制限酵素を使用する。次いでこの断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鑄型として使用する。

【0059】

使用できるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む、捕捉PCRである(Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1, 111-119, 1991)。この方法では、複数の制限レセプター消化物とライゲーションを行って、作製したある二本鎖の配列を、PCRを行う前にそのDNA分子の未知断片中に入れることができる。

【0060】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はParker et al., Nucleic Acids Res. 19, 3055-3060, 1991の方法である。加えて、PCR、入れ子式(nested)プライマー、およびPROMOTERFINDERライブラリー(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)を用いてゲノムDNAを移動させることができる(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、イントロン/エクソン接合点の発見に有用である。

【0061】

完全長cDNAに対してスクリーニングする場合、より大きなcDNAを含むようサイズ選択したライブラリーを使用するのが望ましい。遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含んでいるという点で、無作為プライミングしたライブラリーが好ましい。無作為プライミングしたライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを産生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、配列を5'非転写調節領域へと伸長させるのに有用であり得る。

【0062】

市販品が入手可能な毛細管電気泳動系を用いて、PCRまたは配列決定産物のサイズを分析、またはヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、毛細管配列決定は、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザー励起する4種の異なる蛍光色素(各ヌクレオチドにつき1種ずつ)、および電荷結合素子カメラによる放射された波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア(例えばGENOTYPERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer)を用いて電気信号に変換でき、試料のロードからコンピューター分析および電子的データ表示に至る全プロセスをコンピューター管理することができる。毛細管電気泳動は、特定の試料中に限られた量で存在するかも知れないDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

【0063】

ポリペプチドの取得

ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドは、例えばヒト細胞からの精製によって、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの発現によって、または直接的化学合成によって取得できる。

【0064】

10

20

30

40

50

タンパク質精製

ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドは、ケモカイン様レセプターを発現構築物でトランسفェクトした宿主細胞を包含する、該レセプターを発現する任意のヒト細胞から精製できる。精製されたケモカイン様レセプターポリペプチドは、細胞内のケモカイン様レセプターポリペプチドに通常付随するその他の化合物、例えば或る種のタンパク質、炭水化物、または脂質から、当分野で周知の方法を用いて分離する。このような方法は、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、および調製用ゲル電気泳動を包含するが、これらに限定されない。精製ケモカイン様レセプターポリペプチドの調製物は少なくとも 80 % 純粋であり、好ましくは該調製物は 90 %、95 %、または 99 % 純粋である。調製物の純度は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような当分野で既知の任意の手段によって評価できる。

【0065】

ポリヌクレオチドの発現

ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを発現させるため、挿入されたコード配列の転写と発現に必要な要素を含む発現ベクター中にそのポリヌクレオチドを挿入することができる。ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列および適当な転写および翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを組み立てるため、当業者に周知の方法が利用できる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビトロ遺伝子組換えがある。このような技術は、例えば Sambrook et al. (1989) および Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York., 1989 に記載されている。

【0066】

様々な発現ベクター / 宿主系が、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列を含みそして発現させるために利用できる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）により感染させた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）、もしくは細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）により形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が含まれるがこれらに限定される訳ではない。

【0067】

調節エレメントまたは調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写と翻訳を実行する、ベクターの非翻訳領域 エンハンサー、プロモーター、5' および 3' 非翻訳領域である。このようなエレメントはその強さと特異性において異なっている。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導的プロモーターを包含する、多数の好適な転写および翻訳エレメントを使用できる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、BLUESCRIPTファージミド (Stratagene, LaJolla, Calif.) または pSPORT1 プラスミド (Life Technologies) 等のハイブリッド lacZ プロモーターのような誘導的プロモーターを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用できる。植物細胞のゲノムから（例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子）、または植物ウイルスから（例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）誘導したプロモーターまたはエンハンサーを該ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来の、または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を複数コピー含むセルラインを作製する必要がある場合は、SV40 または EBV に基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

【0068】

細菌および酵母発現系

細菌系では、ケモカイン様レセプターポリペプチドに対して意図する用途に応じて数多くの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体の誘導のため大量のケモカイン様レセプター

10

20

30

40

50

ポリペプチドが必要である場合は、容易に精製できる融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターが使用できる。このようなベクターは、BLUESCRIPT(Stratagene)のような多機能E.coliクローニングおよび発現ベクターを包含するが、これに限定される訳ではない。BLUESCRIPTベクターにおいては、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列を、-ガラクトシダーゼのアミノ末端Metと共に続く7残基の配列と共にフレーム内で該ベクター中にライゲーションすることができ、その結果ハイブリッドタンパク質が產生される。pINベクター(Van Heeke & Schuster, J.Biol.Chem. 264, 5503-5509, 1989)またはpGEXベクター(Promega, Madison, Wis.)もまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)を伴う融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるのに使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、その後遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより、溶菌させた細胞から容易に精製できる。このような系で調製したタンパク質は、ヘパリン、トロンビン、または第Xa因子プロテアーゼ開裂部位を含むよう設計でき、その結果、目的とするクローンポリペプチドをGST部分から随意に解放することができる。10

【0069】

酵母Saccharomyces cerevisiaeにおいては、因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHのような構成的または誘導的プロモーターを含む幾つかのベクターが使用できる。総説としてAusubel et al.(1989)およびGrant et al., Methods Enzymol. 153, 516-544, 1987を参照されたい。

【0070】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列の発現は、幾つかのプロモーターのうち任意のものにより駆動できる。例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、またはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる(Takamatsu, EMBO J. 6, 307-311, 1987)。別法として、RUBISCOの小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用することもできる(Coruzzi et al., EMBO J. 3, 1671-1680, 1984; Broglie et al., Science 224, 838-843, 1984; Winter et al., Results Probl. Cell Differ. 17, 85-105, 1991)。これらの組み立て物は、直接DNA形質転換または病原体介伝トランスフェクションにより植物細胞中に導入できる。このような技術は幾つかの一般に入手可能な総説に記載されている(例えば、HobbsまたはMurray, McGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp191-196, 1992)。30

【0071】

昆虫系もまたケモカイン様レセプターポリペプチドの発現に使用できる。例えば、係る系の1つAutographa californica核多角体病ウイルス(ACNPV)は、Spodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusiaの幼虫で外来遺伝子を発現させるベクターとして使用する。ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列を、ポリヘドリン遺伝子のような該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置くことができる。ケモカイン様レセプターポリペプチドをうまく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが生成する。次いでこの組換えウイルスをS.frugiperda細胞またはTrichoplusiaの幼虫への感染に使用し、そこでケモカイン様レセプターポリペプチドを発現させることができる(Engelhard et al., Proc.Nat.Acad.Sci. 91, 3224-3227, 1994)。40

【0072】

哺乳動物発現系

ウイルスに基づく多くの発現系を用いて哺乳動物宿主細胞でケモカイン様レセプターポリペプチドを発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列は、後期プロモーターおよび3部に分かれたリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体中にライ

ゲーションできる。該ウイルスゲノムの非必須 E 1 または E 3 領域における挿入を用いて、感染宿主細胞においてケモカイン様レセプターポリペプチドを発現できる生存ウイルスを取得できる (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655-3659, 1984)。所望により、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて哺乳動物宿主細胞での発現を増大させることができる。

【0073】

ヒト人工染色体 (HAC) もまた、プラスミドが内包し発現するDNA断片よりも大きなDNA断片の運搬に使用できる。6Mないし10MのHACを組み立て、常套的デリバリー法により細胞に到達させる (例えば、リポソーム、ポリカチオニアミノポリマー、または小胞)。

10

【0074】

さらに、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列の、より効率的な翻訳を達成するために、特異的開始シグナルを使用できる。係るシグナルはATG開始コドンおよび連続配列を包含する (Kozak配列)。ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入した場合、さらなる転写または翻訳調節シグナルは必要ないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入した場合は、外因性の翻訳調節シグナル (ATG開始コドンを包含する) を供給すべきである。開始コドンは挿入物全体を確実に翻訳させるために、正しいリーディングフレームになければならない。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは天然および合成両者の様々な起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に対し適切なエンハンサーを存在させることにより増強できる (Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20, 125-162, 1994)。

20

【0075】

宿主細胞

宿主細胞菌株は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現されたケモカイン様レセプターポリペプチドを所望の方法で処理できる能力を目的として選択できる。該ポリペプチドのこのような修飾には、アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、燐酸化、脂質化、およびアシル化が包含されるがこれらに限定されない。該ポリペプチドの「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進するために使用できる。翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的メカニズムを持つ異なる宿主細胞 (例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、1321N1およびWI38) が、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) から入手でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセシングを確実するために選択できる。

30

【0076】

組換えタンパク質の、長期高収量産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、セルラインは、クローニングされたケモカイン様レセプター cDNAまたはゲノムDNA、ウイルス複製起点および/または内因性発現エレメント、および同じまたは別のベクター上にある選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを使用して、常套的トランسفエクション法、例えばリポソーム、ポリカチオニアミノポリマー、小胞、電気穿孔、燐酸カルシウム等によって安定にトランسفエクトされ得る。該ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1-2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在が、導入されたケモカイン様レセプター配列をうまく発現する細胞の生育と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型にとって適当な組織培養技術を用いて増殖させることができる。例えば、ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986を参照されたい。

40

【0077】

幾つかの選択系を用いて、形質転換されたセルラインを回収できる。

【0078】

これらには、それぞれtk⁻ またはaprt⁻ 細胞で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジン

50

キナーゼ (Wigler et al., Cell 11, 223-32, 1977) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., Cell 22, 817-23, 1980) 遺伝子が包含されるがこれらに限定される訳ではない。さらに、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤耐性を選択の基準に用いることができる。例えば、dhfrはメソトレキサートに対する耐性を付与し (Wigler et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 3567-70, 1980) nptはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与し (Colbere-Garapin et al., J.Mol. Biol. 150, 1014, 1981)、そしてalsおよびpatはそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する (Murray, 1992, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するようにさせ、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するようにさせる (Hartman & Mulligan, Proc.Natl.Acad.Sci. 85, 8047-51, 1988)。アントシアニンのような可視マーカー、-グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定し、特異的ベクター系に帰すことのできる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用できる (Rhodes et al., Methods Mol.Biol. 55, 121-131, 1995)。

10

【0079】

発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在はケモカイン様レセプターポリヌクレオチドもまた存在することを示唆しているが、その存在と発現は確認する必要がある。例えば、もしケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列がマーカー遺伝子配列内部に挿入されるならば、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の不在によって同定できる。これに代わり、マーカー遺伝子は、単一のプロモーターの調節下にケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列とタンデムに並べて位置させることもできる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は、通常、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの発現を示す。

20

【0080】

これとは別に、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを含みケモカイン様レセプターポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者に知られる様々な方法によって同定できる。これらの方法には、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質生検またはイムノアッセイ技術（核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための膜、溶液、またはチップに基づく技術を包含する）が包含されるがこれらに限定されない。例えば、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片またはケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの断片を使用するDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを含む形質転換体を検出するための、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列から選択されるオリゴヌクレオチドの使用を含む。

30

【0081】

ケモカイン様レセプターポリペプチドに対し特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用して該ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコルが当分野で知られている。例として、レセプター結合イムノソルベント検定 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および蛍光活性化セルソーティング (FACS) がある。ケモカイン様レセプターポリペプチド上の2個の非干渉性エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイが使用でき、または、競合的結合検定を使用することができる。これらのそしてその他の検定はHampton et al., SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St.Paul, Minn., 1990およびMaddox et al., J.Exp.Med. 158, 1211-1216, 1983) に記載されている。

40

【0082】

50

多岐にわたる標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、様々な核酸およびアミノ酸検定に使用できる。ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識化ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを調製する手段は、標識したヌクレオチドを使用する、オリゴ標識化、ニック翻訳、末端標識化、またはPCR増幅を包含する。これとは別に、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列を、mRNAプローブの產生のためのベクター中にクローニングすることもできる。このようなベクターは当分野で既知であり、市販品が入手でき、標識化ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、またはSP6を添加することによりインビトロでのRNAプローブの合成に使用することができる。これら的方法は、市販の様々なキットを用いて実施できる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なリポーター分子または標識には、放射性核種、レセプター、および蛍光、化学ルミネセント、または色素生成物質、ならびに基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが包含される。

10

20

30

40

50

【0083】

ポリペプチドの発現および精製

ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列で形質転換させた宿主細胞は、発現と、細胞培養からのタンパク質の回収に適した条件下で培養できる。形質転換細胞により產生されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに応じて分泌されまたは細胞内に貯留され得る。当業者には理解できるであろうが、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通った可溶性ケモカイン様レセプターポリペプチドの分泌を指令する、または膜結合ケモカイン様レセプターポリペプチドの、膜挿入を指令する、シグナル配列を含むよう設計できる。

【0084】

上に論じたように、他の組み立て物を用いて、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードしているヌクレオチド配列と結合させることができる。このような精製促進ドメインは、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAGS伸長/親和精製系で利用するドメインが包含されるが、これらに限定されない(Immunex Corp., Seattle, Wash.)。精製ドメインとケモカイン様レセプターポリペプチドとの間に開裂可能リンカー配列、例えば第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列を入れること(Invitrogen, San Diego, CA)もまた、精製を促進するために利用できる。このような発現ベクターの1つは、ケモカイン様レセプターポリペプチドと、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質の発現を提供する。このヒスチジン残基はIMAC(Porath et al., Prot.Exp.Purif. 3,263-281,1992に記載の固定化金属イオン親和クロマトグラフィー)による精製を促進し、一方エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からのケモカイン様レセプターポリペプチドの精製手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターはKroll et al., DNA Cell Biol. 12,441-453,1993に開示されている。

【0085】

化学合成

ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている配列は、その全体または一部を、当分野で周知の化学的方法を用いて合成できる(Caruthers et al., Nucl.Acids Res.Symp.Ser. 215-223,1980; Horn et al., Nucl.Acids Res.Symp.Ser. 225-232,1980)。これとは別に、ケモカイン様レセプターポリペプチド自身を、そのアミノ酸配列を合成するための化学的方法、例えば固相技術を用いる直接ペプチド合成を用いて調製できる(Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 85,2149-2154,1963; Roberge et al., Science 269,202-204,1995)。タンパク質合成は手動技術またはオートメーションを用いて実施できる。自動化合成

は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を用いて達成できる。所望により、ケモカイン様レセプターポリペプチドの断片を別々に合成し、化学的方法を用いて合して完全長の分子を調製することもできる。

【0086】

新たに合成したペプチドは、調製用高速液体クロマトグラフ(例えはCreighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983)により実質的に精製できる。合成ケモカイン様レセプターポリペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定により確認できる(例えはエドマン分解法; Creighton、上記を参照されたい)。さらに、直接合成中にケモカイン様レセプターポリペプチドのアミノ酸配列の任意の部分を改変させ、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質由來の配列と合して、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を調製することができる。

【0087】

改变ポリペプチドの調製

当業者には理解できるであろうが、天然に存在しないコドンを有するケモカイン様レセプターポリペプチドコード化ヌクレオチドを調製することは有利であり得る。例えは、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させ、または所望の性質、例えは天然に存在する配列から産み出される転写物の半減期より長い半減期を持つRNA転写物を調製することができる。

【0088】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当分野で一般的に知られる方法を用いて、該ポリペプチドまたはmRNA産物のクローニング、プロセシング、および/または発現を修飾する改変を包含する(但しこれらに限定される訳ではない)様々な理由で、ケモカイン様レセプターポリペプチドコード配列を改変させるように設計できる。無作為断片化によるDNAシャフリングと遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再集合を用いてヌクレオチド配列を設計できる。例えは、位置指定突然変異誘発を用いて、新たな制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調製し、突然変異を導入する等を実施できる。

【0089】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、ケモカイン様レセプターポリペプチドのエピトープに特異的に結合するよう作製できる。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の免疫グロブリン分子、およびその断片、例えはFab、F(ab')₂、およびFvを包含し、これらはケモカイン様レセプターポリペプチドのエピトープに結合できる。典型的には、エピトープを形成するためには少なくとも6、8、10、または12の連続するアミノ酸が必要である。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープはより多くの、例えは少なくとも15、25、または50のアミノ酸を必要とするかも知れない。

【0090】

ケモカイン様レセプターポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体は治療に使用でき、そして免疫化学検定、例えはウェスタンプロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学検定、免疫沈降、またはその他の当分野で既知の免疫化学的検定に使用できる。所望の特異性を有する抗体の同定のため、様々なイムノアッセイが使用できる。競合的結合または免疫放射検定のための多数のプロトコルが当分野でよく知られている。このようなイムノアッセイは典型的には、免疫原と、その免疫原に特異結合する抗体との間の複合体形成の測定を含んでいる。

【0091】

典型的には、ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学検定に使用する時、他のタンパク質が提供する検出シグナルより少なくとも5、10、または20倍高い検出シグナルを提供する。好ましくは、ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異結合する抗体は、免疫化学検定で他のタンパク質を検出せず、ケモカイン様レセプターポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

10

20

30

40

50

【0092】

ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドは、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトを免疫してポリクローナル抗体を産生させるのに使用できる。所望により、ケモカイン様レセプターポリペプチドは、担体タンパク質、例えば牛血清アルブミン、チログロブリン、およびスカシガイヘモシアニンとコンジュゲートさせることができる。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増大させるために種々のアジュバントを使用できる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、鉱物性ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性物質（例えばリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール）を包含するがこれらに限定されない。ヒトに使用するアジュバントの中ではB C G (*bacilli Calmette-Guerin*) および *Corynebacterium parvum* が特に有用である。10

【0093】

ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養中の連続的セルラインにより抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製できる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術があるがこれらに限定されない (Kohler et al., *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor et al., *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole et al., *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984)。20

【0094】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして適当な抗原特異性と生物活性を持つ分子を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が利用できる (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda et al., *Nature* 314, 452-454, 1985)。モノクローナルおよびその他の抗体はまた、これを治療に使用した場合に患者が該抗体に対する免疫反応を起こすのを防ぐため、「ヒト化」することができる。このような抗体は、治療に直接使用できるほど配列が充分ヒトに類似しているかも知れず、または幾つかの重要残基の変更を必要とするかも知れない。齧歯類の抗体とヒト配列の間の配列相違は、個々の残基の位置指定突然変異誘発により、または相補性決定領域全体のgratingにより、ヒト配列内の残基と相違する残基を置き換えることによって最小化することができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載のように組換え法を用いて調製できる。ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異的に結合する抗体は、U.S.5565332に開示のように、部分的または完全にヒト化した抗原結合部位を含むことができる。30

【0095】

これに代わり、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の調製のために記載した技術を適合させ、ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異結合する一本鎖抗体を調製することができる。関連する特異性を持つが別個のイディオタイプ組成を有する抗体を、無作為組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから鎖シャフリングによって調製することができる (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991)。40

【0096】

一本鎖抗体はまた、ハイブリドーマcDNAを鑄型に用いて、PCRのようなDNA增幅法を用いて組み立てることができる (Thirion et al., 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11)。一本鎖抗体は單一または二重特異性であり得、また、二価または四価であり得る。四価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては例えばColoma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63に教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の組み立てはMallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206に教示されている。50

【0097】

下記のように、一本鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列を手動または自動ヌクレオチド合成を用いて組み立て、標準的組換えDNA法を用いて発現組み立て物中にクローニングし、そして細胞中に導入してコード配列を発現させることができる。別法として、一

本鎖抗体を、例えば糸状ファージ技術を用いて直接調製することもできる (Verhaar et al., 1995, Int.J.Cancer 61, 497-501; Nicholla et al., 1993, J.Immunol.Meth. 165, 81-91)。

【0098】

ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異結合する抗体はまた、リンパ球集団においてインビオ産生を誘導することによって、または、文献に開示されている極めて特異的な結合試薬のパネルまたは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって調製することもできる (Orlandi et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter et al., Nature 349, 293-299, 1991)。

【0099】

その他の型の抗体を、本発明方法において組み立て、治療に使用することができる。例えば、W093/03151に開示のように、キメラ抗体を組み立てることができる。免疫グロブリンから誘導され多価且つ多重特異的である結合タンパク質、例えばW094/13804に記載の「diabodies」もまた調製できる。

【0100】

本発明に係る抗体は当分野で周知の方法により精製できる。例えば、抗体は、ケモカイン様レセプターポリペプチドが結合しているカラムを通過させることにより親和精製できる。次いで、結合した抗体を、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出することができる。

【0101】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対し相補的なヌクレオチド配列である。いったん細胞中に導入されるとこの相補的ヌクレオチドは、該細胞が產生した天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよい。より長い配列もまた使用できる。アンチセンスオリゴヌクレオチド分子をDNA組み立て物に提供し、上記のように細胞中に導入して、その細胞におけるケモカイン様レセプター遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

【0102】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこの両者の組み合わせであってよい。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、磷酸エステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カルボネート、および磷酸トリエステルといった非ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する別のヌクレオチドの3'末端と共有結合させることにより、手動で、または自動合成機によって合成できる。Brown, Meth.Mol. Biol. 20, 1-8, 1994; Sonveaux, Meth.Mol.Biol. 26, 1-72, 1994; Uhlmann et al., Chem.Rev. 90, 543-583, 1990を参照されたい。

【0103】

ケモカイン様レセプター遺伝子の制御、5'、または調節領域と二本鎖を形成するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することにより、ケモカイン様レセプター遺伝子発現の修飾が得られる。転写開始部位、例えば開始部位から-10および+10位の間から誘導されるオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対合法を用いて阻害を達成できる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子またはシャペロンの結合に足るほど開く能力の阻害を惹起するため、有用である。三本鎖DNAを用いる治療上の進歩が文献に記載されている (例えばGee et al., Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt.Kisco, N.Y., 1994)。転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによりmRNAの翻訳を遮断するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた設計できる。

10

20

30

40

50

【0104】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとケモカイン様レセプターポリヌクレオチドの相補配列との間に好結果の複合体を形成させるためには、正確な相補性は必要ない。例えばケモカイン様レセプターポリヌクレオチドに対し正確に相補的である2、3、4、もしくは5またはそれ以上の長さの連続するヌクレオチドであって、その各々が、隣接するケモカイン様レセプタータンパク質ヌクレオチドとは相補的ではない連続するある長さのヌクレオチドによって隔てられているものを含有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ケモカイン様レセプタータンパク質mRNAに対する充分な標的化特異性を提供できる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの長さはそれぞれ少なくとも4、5、6、7もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド長である。非相補的な介在配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス-センスの対の算出融点を容易に使用して、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定のケモカイン様レセプターポリヌクレオチド配列間で寛容されるミスマッチの程度を決定できるであろう。10

【0105】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力に影響を及ぼすことなく修飾できる。これらの修飾は該アンチセンス分子の内部、または一端もしくは両端である。例えば、ヌクレオシド間の磷酸結合は、アミノ基と末端リボースの間にいろいろな数の炭素残基を有するコレステリルまたはジアミン部分を加えることによって修飾できる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースの代わりのアラビノース、または3'ヒドロキシ基または5'磷酸基が置換されている3',5'-置換オリゴヌクレオチドもまた修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用できる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法により調製できる。例えば、Agrawal et al., Trends Biotechnol. 10, 152-158, 1992; Uhlmann et al., Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmann et al., Tetrahedron Lett. 215, 3539-3542, 1987を参照されたい。20

【0106】

リボザイム

リボザイムは触媒活性を有するRNA分子である。例えば、Cech, Science 236, 1532-1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543-568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510-515, 1996を参照されたい。当分野で知られるように、リボザイムは、RNA配列を開裂することにより遺伝子機能を阻害するのに使用できる（例えば、Haseloff et al., 米国特許5641673）。リボザイムの作用機構は、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後のendonucleolyticな開裂を含む。例には、特異的ヌクレオチド配列のendonucleolyticな開裂を特異的且つ効果的に触媒できる、設計されたハンマー・ヘッドモチーフリボザイム分子がある。30

【0107】

ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドのコード配列、例えば配列番号1に示したもののが相補物を用いて、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドから転写されたmRNAに特異結合するリボザイムを作製できる。他のトランスのRNA分子を極めて配列特異的に開裂できるリボザイムを設計し組み立てる方法が開発され、当分野で記載されている（Haseloff et al. Nature 334, 585-591, 1988）。例えば、リボザイムの開裂活性は、別個の「ハイブリダイゼーション」領域を該リボザイム中に組み入れることによって、特定のRNAを標的とさせることができる。このハイブリダイゼーション領域は標的RNAに対し相補的な配列を含んでおり、したがってその標的と特異的にハイブリダイズする（例えばGerlach et al., EP321201を参照されたい）。

【0108】

ケモカイン様レセプターRNA標的内部の特異的リボザイム開裂部位は、この標的分子を、以下の配列：GUA、GUU、およびGUCを包含するリボザイム開裂部位についてスキャンすることにより同定できる。同定できたならば、該開裂部位を含む標的RNAの領4050

域に対応する、15および20の間のリボヌクレオチドを有する短いRNA配列を、標的を非機能的にし得る二次構造の特徴について評価できる。さらに、候補のケモカイン様レセプタータンパク質RNA標的の適合性を、リボヌクレアーゼ防護検定を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する利用可能性を試験することによって評価できる。配列番号1、3に示すヌクレオチド配列およびこれらの相補物は、適当なハイブリダイゼーション領域配列の供給源を提供する。より長い相補配列を用いて、標的にに対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増大させることができる。リボザイムのハイブリダイズおよび開裂する領域は、相補領域を介して標的RNAにハイブリダイズする時、リボザイムの触媒領域が標的を開裂し得るといったように、完全に相関している。

【0109】

10

リボザイムはDNA組み立て物の一部として細胞内に導入できる。マイクロ注入、リポソーム介伝スフェクション、電気穿孔、または磷酸カルシウム沈殿といった機械的方法を用いて、ケモカイン様レセプター発現の低下が望まれる細胞中にリボザイム含有DNA組み立て物を導入することができる。これとは別に、細胞がDNA組み立て物を安定的に保持することができる場合は、該組み立て物をプラスミド上で供給し、当分野で知られるように、別個のエレメントとして維持するか、または細胞のゲノム中に組み込むことができる。リボザイムコード化DNA組み立て物は、細胞中のリボザイムの転写を調節するために、プロモーターエレメント、エンハンサーまたはUASエレメント、および転写ターミネーターシグナルといった転写調節エレメントを含み得る。

【0110】

20

Haseloff et al.,米国特許5641673に教示のように、リボザイムは、標的遺伝子の発現を誘導する因子に応答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。リボザイムはまた、追加レベルの調節を提供するよう設計でき、その結果、mRNAの破壊はリボザイムと標的遺伝子の両者が細胞に誘導された時にのみ起こる。

【0111】

30

区別的に発現される遺伝子

遺伝子産物がヒトケモカイン様レセプターポリペプチドと相互作用する遺伝子の同定方法をここに記載する。このような遺伝子は、HIV感染、心臓血管障害、喘息およびCOPDを包含する（但しこれらに限定されない）疾患において区別して（区別的に）発現される遺伝子を表し得る。さらに、係る遺伝子は、このような疾患の進行または治療に関連する操作に応答して区別的に調節される遺伝子を表し得る。加えて、このような遺伝子は、組織または生物の発生の異なる段階で増大または低下する、一時的に調節される発現を示すことができる。区別的に発現される遺伝子はまた、その発現を、対照対実験条件の下で調節させることができる。さらに、ヒトケモカイン様レセプターポリペプチド遺伝子または遺伝子産物は、これ自体区別的発現について試験できる。

【0112】

40

発現が正常対疾病状態で相違する程度は、標準的特性決定技術、例えば区別的ディスプレイ技術によって視覚化されるに充分大きいというだけでよい。発現の相違を視覚化することができる、その他のこのような標準的特性決定技術は、定量的RT（逆転写酵素）、PCR、およびノーザン分析を包含するが、これらに限定されない。

【0113】

区別的に発現される遺伝子の同定

区別的に発現される遺伝子を同定するためには、目的とする組織から全RNA、または好ましくはmRNAを単離する。例えば、RNA試料は、実験対象の組織から、そして対照となる対象の対応組織から取得する。mRNAの単離に対して不利に選択しない任意のRNA単離技術を、係るRNA試料の精製に利用できる。例えば、Ausubel et al., ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993を参照されたい。当業者に周知の技術、例えばChomczynski、米国特許4843155の一段階RNA単離プロセスを用いて多数の組織試料を容易に処理することができる。

【0114】

50

区別的に発現される遺伝子が產生したRNAを表す、集められたRNA試料内部の転写物は、当業者に周知の方法により同定する。これらには、例えば、ディファレンシャルスクリーニング (Tedder et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85,208-12,1988)、差引きハイブリダイゼーション (Hedrick et al., Nature 308,149-53; Lee et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 88,2825,1984)、および好ましくはディファレンシャルディスプレイ (Liang & Pardee, Science 257,967-71,1992; 米国特許5262311) が包含される。

【0115】

区別的発現の情報はこれ自体、ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドの関与する疾病的治療のための関連法を示唆している。例えば、治療は、区別的に発現される遺伝子および/またはヒトケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしている遺伝子の発現の調節を包含し得る。区別的発現の情報は、区別的に発現される遺伝子もしくは遺伝子産物またはヒトケモカイン様レセプターポリペプチド遺伝子もしくは遺伝子産物の活性または発現が、アップレギュレーションであるかダウンレギュレーションであるかを示すことができる。

【0116】

スクリーニング方法

本発明は、ケモカイン様レセプターポリペプチドまたはケモカイン様レセプターポリヌクレオチドに結合する、またはその活性を調節する、被験化合物をスクリーニングするための検定を提供する。被験化合物は好ましくはケモカイン様レセプターポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、ヒトケモカイン様を、被験化合物の不在時と比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下または増大させる。

【0117】

被験化合物

被験化合物は当分野で既知の薬理学的物質であってよく、または薬理活性を持っていることが前もって分かっていない化合物であってよい。この化合物は天然に存在する、または実験室で設計されたものであってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス特定可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボルーションを要する合成ライブラリー法、「ビーズー化合物」ライブラリー法、および親和クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する（但しこれらに限定される訳ではない）当分野で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用できる。Lam, Anticancer Drug Des. 12,145,1997を参照されたい。

【0118】

分子ライブラリーの合成法は当分野でよく知られている（例えば、DeWitt et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90,6909,1993; Erb et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 91,11422,1994; Zuckermann et al., J.Med.Chem. 37,2678,1994; Cho et al., Science 261,1303,1993; Carell et al., Angew.Chem.Int.Ed. Engl. 33,2059,1994; Carell et al., Angew.Chem.Int.Ed. Engl. 33,2061; Gallop et al., J.Med.Chem. 37,1233,1994を参照されたい）。化合物のライブラリーは溶液で（例えば、Houghten, Biotechniques 13,412-421,1992）、またはビーズ（Lam, Nature 354,82-84,1991）、チップ（Fodor, Nature 364,555-556,1993）、細菌または胞子（Ladner、米国特許5223409）プラスミド（Cull et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89,1865-1869,1992）、またはファージ（Scott & Smith, Science 249,386-390, 1990; Devlin, Science 249,404-406,1990）; Cwirla et al., Proc.Nat.Acad.Sci. 97,6378-6382,1990; Felici, J.Mol.Biol. 222,301-310,1991; およびLadner、米国特許5223409）上に提供できる。

【0119】

10

20

30

40

50

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、高（ハイ）スループットスクリーニングを用いて、ケモカイン様レセプターポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する能力、またはケモカイン様レセプタータンパク質活性もしくはケモカイン様レセプター遺伝子発現に影響を及ぼす能力についてスクリーニングできる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの個別的化合物を並行して試験でき、その結果多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできる。最も広範に確立されている技術は96ウェル微量定量プレートを利用するものである。この微量定量プレートのウェルは、典型的には50ないし500μlの範囲の検定容量を必要とする。このプレートに加えて、96ウェルフォーマットに適合させた多くの機器、材料、ピペット、ロボット、プレート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。 10

【0120】

別法として、「自由フォーマット検定」、または試料間に物理的障壁を持たない検定が使用できる。例えば、組み合わせペプチドライブラリーのための、単純な均質検定で色素細胞（メラノサイト）を用いる検定が、Jayawickreme et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 19, 1614-18(1994)に記載されている。ペトリ皿中のアガロースの下にこの細胞を入れ、次いで組み合わせ化合物を伴っているビーズをアガロースの表面に載せる。組み合わせ化合物はこのビーズから化合物を部分的に放出する。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化合物が細胞の色の変化を惹起するため、活性化合物を暗色色素領域として視覚化することができる。 20

【0121】

自由フォーマット検定のもう一つの例は、生体分子スクリーニング学会第1回年次総会（Philadelphia, Pa.、1995年11月7-10日）で報告されたChelsky、「組み合わせライブラリーのスクリーニングのための戦略：新規な、そして伝統的なアプローチ」により記載されている。Chelskyは、カルボニックアンヒドライゼのための単純な均質レセプター検定をアガロースゲルの内部に入れ、その結果ゲル中のレセプターがゲル全体に色の変化を惹起するようにさせた。その後、光リンカーを介して組み合わせ化合物を持つビーズをゲル内部に入れ、すると該化合物はUV光により部分的に放出された。レセプターを阻害する化合物は、色の変化がより少ない局所阻害領域として観察された。 20

【0122】

さらに別の例がSalmon et al., Molecular Diversity 2, 57-63(1996)に記載されている。この例では、組み合わせライブラリーを、寒天中で生育する癌細胞への細胞毒性効果を有する化合物についてスクリーニングした。 30

【0123】

もう一つのハイスループットスクリーニング法がBeutel et al.、米国特許5976813に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次に1またはそれ以上の検定成分を、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、またはその他の形の容易に操作できる固体担体の内部、上、または底に入れる。試料がこの多孔性マトリックスに導入されるとこれらは充分ゆっくりと拡散し、その結果、被験試料が混ざらずに検定が遂行できる。 40

【0124】

結合検定

結合検定については、被験化合物は好ましくは、例えばケモカイン様レセプターポリペプチドの活性部位に結合してこれを占有し、それにより基質がリガンド結合部位に接近できなくさせ、その結果正常な生物活性が妨げられるような小分子またはペプチド様分子である。このような小分子の例は小ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが、これらに限定される訳ではない。

【0125】

結合検定では、被験化合物またはケモカイン様レセプターポリペプチドのいずれかが検出可能な標識、例えば蛍光、放射性同位元素、化学ルミネセント、または酵素標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）を含む 50

ことができる。そこで、ケモカイン様レセプターポリペプチドに結合している被験化合物の検出は、例えば放射能の放出を直接計数することにより、またはシンチレーション計数により、または検出可能産物への適当な基質の変換を測定することにより、達成できる。

【0126】

別法として、ケモカイン様レセプターポリペプチドへの被験化合物の結合を、反応体のいずれをも標識せずに測定することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、被験化合物とケモカイン様レセプターポリペプチドとの結合を検出できる。マイクロフィジオメーター（例えばサイトセンサー）とは、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレッサブル電位差センサー（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、被験化合物とケモカイン様レセプターポリペプチドの相互作用の指標として使用できる（McConnell et al., Science 257, 1906-1912, 1992）。

【0127】

被験化合物がケモカイン様レセプターポリペプチドに結合する能力の測定はまた、実時間 Bimolecular Interaction Analysis (BIA) のような技術を用いて達成できる (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-2345, 1991、および Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995)。BIA は、いかなる反応体をも標識せずに、生体特異的相互作用を実時間で研究するための技術である（例えば BIACore(登録商標)）。光学的現象表面プラズモン共鳴 (SPR) の変化を、生体分子間の実時間反応の指標に使用できる。

【0128】

本発明のさらに別の態様では、ケモカイン様レセプターポリペプチドを二ハイブリッド検定または三ハイブリッド検定（例えば、米国特許 5283317; Zervos et al., Cell 72, 223-232, 1993; Madura et al., J. Biol. Chem. 268, 12046-12054, 1993; Bartel et al., Biotechniques 14, 920-924, 1993; Iwabuchi et al., Oncogene 8, 1693-1696, 1993; および Brent W094/10300）における「おとりタンパク質」として使用し、ケモカイン様レセプターポリペプチドに結合またはこれと相互作用してその活性を調節する他のタンパク質を同定することができる。

【0129】

二ハイブリッド系は殆どの転写因子のモジュール的性格に基づくものであり、それは、分離可能な DNA 結合および活性化ドメインから成っている。簡潔に述べると、この検定は二種の異なる DNA 組み立て物を利用する。例えば、一方の組み立て物においては、ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、既知の転写因子の DNA 結合ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる（例えば GAL-4）。別の組み立て物においては、未同定タンパク質（「餌」または「試料」）をコードしている DNA 配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる。もし「おとり」および「餌」タンパク質がインビオで相互作用してタンパク質依存複合体を形成できたならば、該転写因子の DNA 結合および活性化ドメインは極めて近位に招来される。この近位性が、転写因子に応答する転写調節部位と機能的に結合しているリポーター遺伝子（例えば LacZ）の転写を可能にする。リポーター遺伝子の発現が検出でき、機能的転写因子を含む細胞コロニーを単離し、ケモカイン様レセプターポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードしている DNA 配列取得に使用することができる。

【0130】

反応体の一方または両方の非結合型からの結合型の分離を促進するため、そして検定の自動化の便宜を図るため、ケモカイン様レセプターポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固定化することが望ましいかも知れない。したがって、このレセプターポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体は、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、微量定量ウェル、管、シリコンチップ、またはビーズ（ラテックス、ポリスチレン、またはガラスピーズを包含するがこれらに限定されない）のよ

10

20

30

40

50

うな粒子を包含するがこれらに限定されない。共有および非共有結合、受動吸収、またはそれぞれポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物に付着させた結合部分と固体支持体の対、の使用を包含する、当分野で既知の任意の方法を用いてケモカイン様レセプターポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物を固体支持体に付着させることができる。被験化合物は好ましくは整列して固体支持体に結合させ、その結果個々の被験化合物の位置を追跡することができる。ケモカイン様レセプターポリペプチド（またはポリヌクレオチド）への被験化合物の結合は、反応体を入れるのに適した任意の容器で達成できる。係る容器の例には微量定量プレート、試験管、および微量遠沈管がある。

【0131】

10

一つの態様において、ケモカイン様レセプターポリペプチドは、ケモカイン様レセプターポリペプチドを固体支持体に結合させるドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St.Louis, Mo.）上またはグルタチオン誘導体化微量定量プレート上に吸着させ、次いでこれを被験化合物または被験化合物および非吸着ケモカイン様レセプターポリペプチドに合し；次にこの混合物を複合体形成が行われる条件下でインキュベートする（例えば、塩およびpHに関して生理的条件）。インキュベーションの後、ビーズまたは微量定量プレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去する。反応体の結合は上記のように直接的または間接的に測定できる。別法として、複合体を固体支持体から解離させた後に結合を測定することもできる。

20

【0132】

本発明に係るスクリーニング検定には、タンパク質またはポリヌクレオチドを固体支持体上に固定化するためのその他の技術を使用することもできる。例えば、ケモカイン様レセプターポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを、ビオチンとストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して固定化できる。当分野で周知の技術（例えばビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）を用いて、ビオチニル化したケモカイン様レセプターポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物をビオチン - N H S（N-ヒドロキシスルシンイミド）から調製し、ストレプトアビジン被覆した96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化できる。別法として、ケモカイン様レセプターポリペプチド、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望の結合部位、例えばケモカイン様レセプターポリペプチドの活性部位に干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができる。未結合の標的またはタンパク質が抗体コンジュゲーションによりウェル中に捕捉できる。

30

【0133】

G S T - 固定化複合体について上に記載した方法に加え、このような複合体を検出する方法には、ケモカイン様レセプターポリペプチドまたは被験化合物に特異結合する抗体を用いる、複合体の免疫検出、ケモカイン様レセプターポリペプチドの活性検出へと引き継がれる酵素結合検定、および非還元条件下でのS D S ゲル電気泳動がある。

【0134】

40

ケモカイン様レセプターポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する被験化合物を求めるスクリーニングは、無傷の細胞で実施することもできる。ケモカイン様レセプターポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の細胞が、細胞に基づく検定系で使用できる。ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドは細胞中に天然に存在し、または上記のような技術を用いて導入できる。ケモカイン様レセプターポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように測定する。

【0135】

機能検定

ケモカインポリペプチドの生物学的効果を増大または低下させる能力について被験化合物を試験できる。そのような生物学的効果は、下記の具体的実施例に記載の機能検定を用いて測定できる。機能検定は、精製したケモカイン様レセプターポリペプチド、細胞膜調製

50

物、または無傷の細胞を被験化合物と接触させた後に実施できる。ケモカインの機能的活性を少なくとも約10%、好ましくは約50%、より好ましくは約75%、90%、または100%低下させる被験化合物を、ケモカインを減少させる可能性ある物質として同定する。ケモカイン活性を少なくとも約10%、好ましくは約50%、より好ましくは約75%、90%、または100%増大させる被験化合物を、ケモカインを増大させる可能性ある物質として同定する。

【0136】

遺伝子発現

別の態様では、ケモカイン様レセプタータンパク質遺伝子の発現を増大または減少させる被験化合物を同定する。ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、RNAまたはケモカイン様レセプターポリヌクレオチドのポリペプチド産物の発現を測定する。被験化合物存在下での適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、該被験化合物不在下でのmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。すると被験化合物が、この比較に基づく発現のモジュレーターとして同定できる。例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により大きい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質または増強物質と同定する。そうではなく、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により小さい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現のインヒビターと同定する。

【0137】

細胞におけるケモカイン様レセプタータンパク質mRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、mRNAまたはポリペプチドを検出するための当分野で周知の方法により決定できる。定性または定量的方法のいずれかが使用できる。ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えばラジオイムノアッセイのような免疫化学的方法、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学を包含する、当分野で周知の様々な技術を用いて決定できる。別法として、ポリペプチド合成は、ケモカイン様レセプターポリペプチド内への標識アミノ酸の取り込みを検出することにより、インビボで、細胞培養で、またはインビトロ翻訳系で決定できる。

【0138】

このようなスクリーニングは、無細胞検定系または無傷の細胞のいずれかで実施できる。ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドを発現するいかなる細胞も細胞に基づく検定系で使用できる。ケモカイン様レセプターポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在するか、または上記のような技術を用いて導入することができる。一次培養または確立されたセルライン、例えばCHOまたはヒト胚性腎293細胞のいずれかを使用できる。

【0139】

医薬組成物

本発明はさらに、治療効果を達成するために患者に投与できる医薬組成物を提供する。本発明に係る医薬組成物は、例えばケモカイン様レセプターポリペプチド、ケモカイン様レセプターポリヌクレオチド、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ケモカイン様レセプターポリペプチドに特異的に結合する抗体、または類似体、アゴニスト、アンタゴニスト、またはケモカイン様レセプターポリペプチド活性のインヒビターを含み得る。この組成物は単独で、または少なくとも1種類の他の物質、例えば安定化化合物と組み合わせて投与でき、これは、食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース、および水を包含する（但しこれらに限定されない）任意の無菌で生物学的適合性のある製薬的担体中で投与できる。この組成物は単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと組み合わせて患者に投与できる。

【0140】

活性成分に加えてこれらの医薬組成物は、賦形剤および補助物質を含む適当な製薬的に許容し得る担体を含有でき、これらは、製薬的に使用できる調製物への活性化合物の処理を促進する。本発明に係る医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、

10

20

30

40

50

心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段を包含する（但しこれらに限定されない）多くの経路により投与できる。経口投与用医薬組成物は、当分野で既知の製薬的に許容し得る担体を用いて経口投与に適した用量に調合できる。このような担体により、該医薬組成物を、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに調合できる。

【0141】

経口使用のための医薬製剤は、活性化合物を、固体賦形剤と合し、得られた混合物を所望により粉碎し、そしてこの顆粒混合物を、所望ならば適当な補助物質を加えた後に処理して錠剤または糖衣剤核を得る。好適な賦形剤は炭水化物またはタンパク質增量剤、例えば乳糖、シュクロース、マンニトール、またはソルビトールを包含する糖；トウモロコシ、小麦、米、馬鈴薯、またはその他の植物由来の澱粉；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを包含するゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。所望により崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加できる。

【0142】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適当な被覆剤と共に使用でき、これはさらに、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、carbopolゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカーレ溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むことができる。製品の同定のためまたは活性化合物の量、即ち用量をあらわすために染料または色素を錠剤または糖衣被覆剤に添加できる。

【0143】

経口的に使用できる医薬調合物は、ゼラチン製の押してはめ込むカプセル剤、ならびに、ゼラチンおよび被覆剤、例えばグリセロールまたはソルビトールでできた軟封入カプセル剤を包含する。押してはめ込むカプセル剤は、活性成分を、乳糖または澱粉のような增量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定剤と混合して含有できる。軟カプセル剤では、活性化合物を、安定剤を加えたまたは加えない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁できる。

【0144】

非経口投与に好適な医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的適合性の緩衝液、例えばハンクス溶液、リソゲル溶液、または生理学的に緩衝化した食塩水中で調合できる。水性注射用懸濁剤は、該懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有できる。さらに、活性化合物の懸濁剤は適当な油性注射用懸濁剤として調製できる。好適な親油性溶媒または媒質は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを包含する。非脂質ポリカチオニアミノポリマーもまたデリバリーに使用できる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増し高濃縮溶液の調製を可能にするような適当な安定剤または物質を含むことができる。局所または鼻腔投与のためには、透過すべき特定の障壁に対し適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当分野で一般に知られている。

【0145】

本発明に係る医薬組成物は当分野で既知の方法で、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。この医薬組成物は塩として提供でき、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、琥珀酸などを包含する（但しこれらに限定されない）多くの酸を用いて調製できる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基型よりもより可溶性の傾向がある。別の場合には、好ましい調製物は、pH範囲4.5ないし5.5において以下のもの：1-50 mMヒスチジン、0.1%-2%シュクロース、および2-7%マンニト

10

20

30

40

50

ール、の全てまたは任意のものを含有できる凍結乾燥粉末であってよく、これを使用前に緩衝液と合する。

【0146】

調合と投与のための技術のさらなる詳細は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, Pa) の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、これらを適当な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルを貼る。このようなラベル表示は、投与の量、頻度、および投与方法を包含する。

【0147】

治療上の適応および方法

ヒトケモカイン様レセプターを調節して、HIV感染、心臓血管疾患、喘息およびCOPDを処置することができる。 10

【0148】

心臓血管疾患には、次の心臓および血管系の障害が含まれる：うっ血性心不全、心筋梗塞、虚血性心疾患、すべての種類の心房性および心室性不整脈、高血圧血管疾患および末梢血管疾患。

【0149】

心不全とは、心機能の異常性のせいで、心臓が、代謝中の組織の必要に見合う割合で血液をポンプすることができない病態生理学的状態として定義される。これには、ハイアウトプットおよびローアウトプット、急性および慢性、右側または左側、収縮性または弛緩性のようなすべての型のポンプ不全が、原因に関係なく含まれる。 20

【0150】

心筋梗塞 (MI) は一般に、冠血流の突然の減少、その後の、動脈硬化症によってあらかじめ狭小化した冠動脈の血栓性閉塞によって生じる。MI予防 (初期および二次的予防) は、MIの急性処置および合併症の予防と同様に包含される。

【0151】

虚血性疾患は、冠流が制限され、酸素に関して心筋の必要量に見合わない灌流を生じる症状である。この群の疾患には、安定狭心症、不安定狭心症および無症候性虚血が含まれる。

【0152】

不整脈には、すべての型の心房性および心室性頻脈性不整脈 (心房性頻脈、心房粗動、心房細動、房室リエントラント頻脈、興奮前症候群、心室頻脈、心室粗動、心室細動)、ならびに徐脈性型不整脈が含まれる。 30

【0153】

血管疾患には、初期ならびにすべての種類の二次的動脈高血圧 (腎、内分泌、神経原性、その他) が含まれる。開示した遺伝子およびその産物は、高血圧の処置、ならびにすべての合併症の予防に関する薬物標的として用いることができる。末梢血管疾患とは、動脈および/または静脈流が減少し、血液供給と組織酸素要求の間の不均衡が生じる血管疾患として定義される。これには、慢性末梢動脈閉塞疾患 (P A O D)、急性動脈血栓症および塞栓症、炎症性血管障害、レイノー現象および静脈障害が含まれる。

【0154】

アレルギーは、環境抗原により臨床的な副作用が引き起こされる複合過程である。アレルゲンと称される誘導性抗原は、一般に特異的なIgE応答を引き起こし、大抵の場合、アレルゲン自体には毒性がほとんどないか、あるいは全くないが、IgE応答により次々とIgE依存性又はT細胞依存性の過敏反応が誘導され、病理が発症する。過剰反応は、局所的又は全身性の場合があり、以前にあるアレルゲンに対して敏感となった個体にそのアレルゲンを曝すと、典型的には数分以内に過剰反応を発症する。このアレルギーの過剰反応は、エフェクター細胞 (例えば、肥満細胞、好塩基球または好酸球) 表面の特異的な受容体と結合しているIgE抗体がアレルゲンを認識して、エフェクター細胞を活性化し、そして急性サイン及び応答の症状を起こす媒介物質を放出することにより発症する。アレルギー疾患には、喘息、アレルギー性鼻炎 (枯草熱)、アトピー性皮膚炎及びアナフィキ 40

ラシーが含まれる。

【0155】

喘息は、多くの遺伝子と環境因子との相互作用による結果として考えられており、以下の3つの主要な特性：1) 気管支収縮、粘液生産増大、気道の狭小化を引き起こす気道壁の肥厚化により引き起こされる断続的かつ可逆的な気道閉塞、2) 気道口径制御の低下により引き起こされる気道反応亢進、及び3) 気道炎症、により特徴付けられる。特定の細胞は、喘息の炎症反応に重要であり、それらにはT細胞、及び抗原提示細胞、IgEを産生するB細胞、並びにIgEと結合する肥満細胞、好塩基球、好酸球及び他の細胞が含まれる。これらのエフェクター細胞は、気道のアレルギー反応部位に蓄積しており、そして急性病状に及び最終的に該疾患に関連する組織破壊に関する毒性産物を放出する。平滑筋細胞、肺上皮細胞、粘液生産細胞及び神経細胞などの他の常在(resident)細胞もまた喘息を患っている個体においては異常なものとなり得、病状に寄与し得る。臨床的に断続喘鳴及び呼吸不足などを示す喘息の気道閉塞は、一般に緊急処置が必要とされる疾患の多くの圧迫症状を引き起こすと同時に、該疾患と関連した炎症及び組織破壊は、最終的に喘息を長期管理が必要な身体障害とする不可逆変化を引き起こし得る。

【0156】

近年の喘息に対する病理理解の大きな進展にも拘わらず、この疾患の罹患率及び重傷度は増大しているようである(Gergen及びWeiss, Am. Rev. Respir. Dis. 146, 823-24, 1992)。人口の30~40%がアトピー性アレルギーに苦しんでおり、人口のうち子供15%及び成人5%が喘息に苦しんでいる(Gergen及びWeiss, 1992)。従って、我々の医療財源に莫大な負担がかかっている。しかしながら、喘息の診断及び処置は困難である。肺組織炎症の重症度を測定するのは容易でなく、この疾患の症状はしばしば呼吸器感染症、慢性呼吸器炎症疾患、アレルギー性鼻炎又は他の呼吸性疾患から区別できない。原因となる環境因子を取り出すことが困難であるため、刺激性アレルゲンを決定できないことがしばしばである。現在の薬理学的処置はそれ自体の不利益さによる問題がある。一般に用いられる治療物質、例えばアクチベーターは、一時的に肺機能を改善する症状緩和物として作用し得るが、根本的な炎症には作用しない。根本的な炎症を低減させ得る物質、例えば抗炎症性ステロイドは、免疫抑制から骨喪失の範囲にまで及ぶという大きな欠点があり得る(Goodman及びGilman's THE PHARMACOLOGIC BASIS OF THERAPEUTICS, Seventh Edition, MacMillan Publishing Company, NY, USA, 1985)。さらに、コルチコステロイドを吸入するなどの現在の治療の多くは持続性が短く、使用に不便であり、そして症例によってはしばしば一生定期的に用いなければならない、重要な問題は患者が処置に応じるのを止めることで処置の有効性が低減することである。

【0157】

この従来の治療に関する問題のため、代わりとなる処置ストラテジーが評価されている。グリコホリンA(Chu及びSharon, Cell. Immunol. 145, 223-39, 1992)、シクロスボリン(Alexanderら、Lancet 339, 324-28, 1992)及びIL-2のノナペプチド断片(Zav'yalovら、Immunol. Lett. 31, 285-88, 1992)の全てはインターロイキン-2依存性Tリンパ球増殖を阻害するが、これらは多くの別の効果を示すことが知られている。例えば、シクロスボリンは臓器移植後の免疫抑制物質として使用される。これらの物質は、喘息の処置におけるステロイドの代替物に相当し得ると同時に、インターロイキン-2依存性Tリンパ球増殖及びホメオスタシスと関連する潜在的に重要な免疫機能を阻害する。気管支圧縮(bronchoconstriction)の媒介物質、例えばクロモン(cromones)又は抗ロイコトリエンの放出又は活性化をブロックする別の処置が穏和な喘息の処置に最近導入されたが、これらは非常に高価な上に、全ての患者に有効という訳でもなく、これらが喘息性炎症と関連する慢性変化に何らかの影響を及ぼすか否かについても明らかではない。喘息の発症に重要な経路において作用でき、該疾患の偶発的攻撃をブロックし、患者を免疫無防備状態にすることなく過剰反応アレルギー免疫応答を優先的に弱らせることのできる処置の同定が、当分野で必要とされている。

【0158】

10

20

30

40

50

慢性閉塞性肺（又は気道）疾患（COPD）は、慢性気管支炎による肺気腫及び末梢気道閉塞の併発が一般的な原因である、気流閉塞として生理的に定義される状態である（Senior & Shapiro, *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3d ed., New York, McGraw-Hill, 1998, pp. 659-681, 1998; Barnes, *Chest* 117, 10S-14S, 2000）。肺気腫は、肺空気間隙の異常な拡張を引き起こす肺胞壁の破壊によって特徴付けられる。慢性気管支炎は、連續2年間それぞれに3ヶ月間の慢性多産咳（chronic productive cough）が見られるというように臨床的に定義される。COPDにおいては、気流閉塞は通常進行性であり、希に好転することがある。COPDの発症において、タバコの喫煙はかなり重要な危険因子であるが、この疾患は非喫煙者にも発症する。

【0159】

10

気道の慢性炎症は、COPDの鍵となる病態的特徴である（Senior & Shapiro, 1998）。炎症細胞群には、増加した数の貪食細胞、好中球およびCD⁺8リンパ球が含まれる。吸引した刺激物、例えばタバコの煙が、気道に常在する貪食細胞を活性化し、同様にケモカイン（例えば、インターロイキン-8）及び他の走化因子を放出することになる上皮細胞を活性化する。これらの走化因子が作用して、血液から肺組織及び気道へ輸送する好中球/単球を増加させる。気道に補充された好中球及び単球が、ダメージを与える可能性のある種々の媒介物、例えばタンパク質分解酵素や活性酸素種を放出し得る。マトリックス分解、並びに気道壁の肥大化、界面活性剤機能障害及び粘液過分泌を伴う肺気腫、これら全てが障害性気流及びガス交換を引き起こす炎症性応答となる可能性がある後遺症である。

【0160】

20

いくつかのGPCRはCOPDの病理と関連付けられている。例えば、ケモカインIL-8はCXCR1及びCXCR2を通じて作用し、これらの受容体のアンタゴニストはCOPDの治療として研究されている。代謝調節型受容体のP2Yファミリーメンバーは、正常な肺機能において非常に重要な役割を果たし得る。特に、P2Y₂受容体は肺の粘膜毛様体排除機構の調節に関与すると考えられており、この受容体のアゴニストが慢性気管支炎を患っている患者の気道の粘液排除を刺激し得る（Yerxa Johnson, *Drugs of the Future* 24, 759-769, 1999）。従って、GPCRはCOPDについての治療標的であり、既存のGPCRファミリー又は新規GPCRの更なるメンバーを同定することで、より魅力的な標的を産出できる。

【0161】

30

本発明は、上記のスクリーニング検定によって同定される新規物質の使用にさらに関する。従って、本明細書に記載するように同定される被験化合物を適当な動物モデルに使用することは、本発明の範囲内にある。例えば、本明細書に記載するように同定される物質（例えば、調節物質、アンチセンス核酸分子、特異的抗体、リボザイム又はケモカイン様レセプターポリペプチド結合分子）を、そのような物質を用いた処置の効果、毒性又は副作用を決定するために、動物モデルに用いることがある。あるいは、本明細書に記載するように同定された物質を、該物質の作用機構を決定するために、動物モデルに使用する場合がある。さらに、本発明は、本明細書に記載の処置に対する上記スクリーニング検定によって同定される新規物質の使用に関する。

【0162】

40

ケモカイン様レセプター活性に影響を及ぼす試薬を、ケモカイン様レセプター活性を低下させるために、インビトロ又はインビボのいずれかにおいてヒト細胞に投与することができる。試薬は、ヒトケモカイン様レセプター遺伝子の発現産物と結合することが好ましい。その発現産物がタンパク質である場合、試薬は抗体であることが好ましい。生体外でのヒト細胞の処置については、抗体を、人体から取り出しておいた幹細胞の調製物に添加することができる。その後、その細胞を、当分野で周知のように、クローン増殖させるか、又はさせずに同じ又は別の人體に移すことができる。

【0163】

1つの態様においては、試薬を、リポソームを用いて送達する。リポソームは、投与した動物中にて、少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらにより好

50

ましくは少なくとも約24時間安定であることが好ましい。リポソームは、試薬、特にポリヌクレオチドを、動物（例えはヒト）の特定の部位に標的化することができる脂質組成物を含む。リポソームの脂質組成物は、動物の特有の器官、例えは肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節及び皮膚を標的化できることが好ましい。

【0164】

本発明に有用なリポソームは、標的化した細胞の原形質膜と融合でき、その内容物を細胞に送達できる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームのトランスフェクション効率は約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $0.5\mu\text{g}$ であり、より好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $1.0\mu\text{g}$ であり、さらにより好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $2.0\mu\text{g}$ である。好ましくは、リポソームは直径が、約 $100\sim500\text{nm}$ であり、より好ましくは約 $150\sim450\text{nm}$ であり、さらにより好ましくは約 $200\sim400\text{nm}$ である。

【0165】

本発明に用いるに適したリポソームは、例えは当業者に知られる遺伝子送達法に標準的に用いられるリポソームを含む。より好ましいリポソームは、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールと連結されたコレステロールバックボーン（骨格鎖）を有するリポソームを含む。場合により、リポソームは特定の細胞タイプを標的化できる化合物、例えはリポソームの外側表面に曝される細胞特異的リガンドを包含する。

【0166】

リポソームを、試薬、例えはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムと複合体化することは、当分野で標準的な方法（例えは、米国特許5,705,151を参照のこと）を用いて達成することができる。好ましくは、ポリヌクレオチド約 $0.1\mu\text{g}$ ～約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と組み合わせる、より好ましくはポリヌクレオチド約 $0.5\mu\text{g}$ ～約 $5\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と組み合わせる、さらにより好ましくはポリヌクレオチド約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と組み合わせる。

【0167】

別の態様においては、抗体を、受容体媒介性標的化送達を用いて、インビボにて特定の組織に送達することができる。受容体媒介性DNA送達技術は、例えはFindeisら、Trends in Biotechnol. 11, 202-05 (1993); Chiouら、GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J. A. Wolffら、) (1994); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263, 621-24 (1988); Wuら、J. Biol. Chem. 269, 542-46 (1994); Zenkeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59 (1990); Wuら、J. Biol. Chem. 266, 338-42 (1991)にて教示されている。

【0168】

治療的有効量の決定

治療的有効量の決定は、充分当業者の能力の範囲内にある。治療的有効量とは、治療的有効量の不在下で起こるケモカイン様レセプター活性に比較してケモカイン様レセプター活性を増大させ、または低下させる活性成分の量を指す。

【0169】

いかなる化合物に関しても、治療的有効量は最初に細胞培養検定で、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌ、またはブタで見積もることができる。動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次にこのような情報を用いて人間での有用な用量と投与経路を決定できる。

【0170】

治療的有効性および毒性、例えはED₅₀（集団の50%で治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%で致死的な用量）は、細胞培養または実験動物における標準的薬学的方法により決定できる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指數であり、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。

10

20

30

40

50

【0171】

大きな治療指數を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養検定および動物研究から得られるデータを、人間への使用のための用量範囲を処方する際に使用する。かかる組成物に含まれる用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を持たないED₅₀を包含する循環濃度の範囲内である。この用量は、使用する用量型、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

【0172】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、充分なレベルの活性成分を提供するよう、または所望の効果を保持するよう、調節する。考慮できる因子は、疾病状態の重篤度、対象の全身健康状態、年齢、体重、および対象の性別、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応の感受性、および療法に対する寛容/応答を包含する。長時間作用性医薬組成物は、その製剤の半減期およびクリアランス率に応じて3から4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

【0173】

標準的な用量は投与経路に応じて0.1から100,000マイクログラムまで変えることができ、約1gまでの総用量とすることができます。特定の用量および送達方法についての指針は文献に提供されており、一般に当分野の医師が入手できる。当業者は、ヌクレオチド用にはタンパク質またはそれらのインヒビター用のものとは異なる製剤を使用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、場所などに特異的である。

【0174】

この試薬が一本鎖抗体である場合、この抗体をコードしているポリヌクレオチドを構築し、トランスフェリン-ポリカチオン-媒介DNA転移、裸のまたはカプセル内核酸を用いるトランスフェクション、リポソームの媒介する細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、「遺伝子銃」、およびDEAE-または燐酸カルシウム-媒介トランスフェクションを包含する（但しこれらに限定される訳ではない）充分確立した技術を用いて、ex vivoまたはインビボで細胞内に導入できる。

【0175】

抗体の有効なインビボ用量は、約5μgから約50μg/kg、約50μgから約5mg/kg、約100μgから約500μg/kg（患者の体重）、および約200から約250μg/kg（患者の体重）の範囲である。一本鎖抗体をコードしているポリヌクレオチドの投与のためには、有効なインビボ用量は、約100ngから約200ng、500ngから約50mg、約1μgから約2mg、約5μgから約500μg、および約20μgから約100μgのDNAの範囲である。

【0176】

発現産物がmRNAである場合、試薬は好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現するポリヌクレオチドは、上記のように多岐にわたる方法によって細胞中に導入できる。

【0177】

好ましくは、試薬は、ケモカイン様レセプター遺伝子の発現またはケモカイン様レセプター-ポリペプチドの活性を、該試薬の不在時と比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる。ケモカイン様レセプター遺伝子の発現レベルまたはケモカイン様レセプター-ポリペプチドの活性を低下させるよう選択した機構の有効性は、当分野で周知の方法、例えばケモカイン様レセプター特異的mRNAへのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、ケモカイン様レセプター-ポリペプチドの免疫学的検出、またはケモカイン様レセプター活性の測定を用いて評価できる。

【0178】

10

20

30

40

50

上記のいずれの態様においても、本発明に係る任意の医薬組成物は他の適当な治療薬と組み合わせて投与できる。併用療法に使用するための適当な物質の選択は、常套的製薬原理に従い、当業者により実施することができる。治療薬の組み合わせは、相乗的に働いて、上記の様々な疾患の治療または予防を奏効させる。このアプローチを用いて、より低い各物質の用量で治療効果を達成することができ、したがって有害な副作用の可能性を低減することができる。

【0179】

上記の治疗方法のいずれも、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトといった哺乳動物を包含する、このような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

10

【0180】

診断方法

ヒトケモカイン様レセプターはさらに、このレセプターをコードしている核酸配列における突然変異の存在に関連する疾病および異常、または疾病および異常に対する感受性を検出する診断検定に使用できる。例えば、疾病に罹患している個体と正常な個体とにおけるケモカイン様レセプターをコードしているcDNAまたはゲノム配列の間の相違を決定できる。もし罹患している個体の幾つかまたは全てに突然変異が観察され、正常な個体には観察されないならば、この突然変異がその疾病の原因であると思われる。

【0181】

レファレンス遺伝子および突然変異を有する遺伝子の間の配列相違は、直接DNA配列決定法によって明らかにできる。加えて、クローニングしたDNAセグメントを、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用できる。この方法の感受性はPCRと組み合わせる時極めて増強される。例えば、二本鎖PCR産物または修飾PCRにより調製された一本鎖鋳型分子と共に、配列決定プライマーを使用することができる。配列決定は、放射標識したヌクレオチドを用いる常套的方法によって、または蛍光標識を使用する自動配列決定法によって実施する。

20

【0182】

DNA配列相違に基づく遺伝子試験は、変性させる物質を含むまたは含まないゲル中のDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより実施できる。小配列の欠失および挿入は、例えば高分解能ゲル電気泳動によって視覚化できる。異なる配列のDNA断片は変性させるホルムアミド勾配ゲル上で識別でき、ここでは、異なるDNA断片の移動度が、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って、ゲル中の異なる位置で遅延する（例えば、Myersら、Science 230, 1242, 1985を参照されたい）。特定の位置での配列変更もまたヌクレアーゼ保護検定、例えばRNアーゼおよびS1保護または化学的開裂法によって明らかにできる（例えば、Cottonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 4397-4401, 1985）。即ち特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護、化学的開裂、直接DNA配列決定といった方法によって、または制限酵素とゲノムDNAのサザンプロットティングを使用することによって実施できる。ゲル電気泳動およびDNA配列決定のような直接法に加えて、突然変異はin situ分析により検出することもできる。

30

【0183】

ケモカイン様レセプターのレベルの変化もまた種々の組織で検出できる。血液または組織生検のように、宿主から誘導した身体試料中の受容体ポリペプチドのレベルを検出するために用いる検定は、当業者に周知であり、ラジオイムノアッセイ、競合的結合検定、ウェスタンプロット分析、およびELISA検定を包含する。

40

【0184】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用により特に本明細書の一部とする。上記の内容は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は以下の具体的実施例を参照することによって得られ、それらの実施例は例示のみの目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定する意図は無い。

50

【実施例】

【0185】

実施例1

ケモカイン様レセプター活性の検出

配列番号1に記載のポリヌクレオチドを発現ベクターpCEV4に挿入し、得られた発現ベクターpCEV4-ケモカイン様レセプターポリペプチドをヒト胚の腎臓293細胞にトランスフェクトする。これらの細胞から溶解物を得、1000 rpm、5分間の遠心を4にて行う。その上清を30,000×g、4で20分間遠心分離する。そのペレットを、50 mM トリスHCl、5 mM MgSO₄、1 mM EDTA、100 mM NaClを含み、0.1% BSA、2 µg/mlアプロチニン、0.5 mg / mLロイペプチドおよび10 µg / mLホスホラミドンを添加した結合バッファー(pH 7.5)中に懸濁する。添加する放射性リガンド、即ちケモカインの10%未満と結合するのに必要とされるタンパク質濃度で規定される最適な膜懸濁希釈液を、リガンド、非標識化ペプチド、および結合バッファーを含む96ウェルポリプロピレンマイクロタイプレートに添加し、最終量を250 µLとする。

【0186】

平衡飽和結合検定において、膜調製物を¹²⁵I標識リガンドの増大濃度(0.1 nM ~ 4 nM)の存在下でインキュベートする。

【0187】

結合反応混合物を30で1時間インキュベートする。この反応を、0.5%ポリエチレンイミンを用いて処理したGF/Bフィルターに通じてろ過し、反応を停止させ、細胞を回収する。放射活性をシンチレーション計数して計測し、データをコンピューターによる非線形回帰プログラムによって分析する。

【0188】

非特異的結合は、非標識化ペプチド100 nMの存在下にて、膜タンパク質をインキュベートした後に残存する放射活性の量として規定される。タンパク質濃度を、標準的としてウシ血清アルブミンと共にBio-Rad Reagentを用いるBradford法により測定する。配列番号2のポリペプチドがケモカイン様レセプター活性を有することが示される。

【0189】

実施例2

組換えヒトケモカイン様レセプターの発現

ピキア パストリス(Pichia pastoris)発現ベクターpPICZB(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて、大量の組換えヒトケモカイン様ポリペプチドを酵母中に生産させる。ヒトP2Y1様GPCRコード化DNA配列は配列番号1、4または5に示されるヌクレオチド配列から誘導する。ベクターpPICZB中に挿入する前に、DNA配列を、その5'端に開始コドン、及び3'端にエンテロキナーゼ開列部位、His6レポータータグや終止コドンを含ませるといった周知の方法によって修飾する。さらに、その両末端に制限エンドヌクレアーゼの認識配列を加え、対応する制限酵素を用いてpPICZBのマルチクローニングサイトを消化した後に、修飾ポリペプチドをコードするDNA配列をpPICZB中にライゲートする。この発現ベクターを、ピキア パストリスにて発現が酵母プロモーターにより誘導される誘導性発現用に設計する。得られたpPICZ/md-His6ベクターを用いて、酵母を形質転換する。

【0190】

この酵母を、5リッター攪拌フラスコ中で通常の条件下にて培養し、組換え産物タンパク質を、8Mウレアの存在下で親和性クロマトグラフィー(Ni-NTA-樹脂)により培養物から単離する。結合したポリペプチドを、pH 3.5の緩衝液を用いて溶出し、中性化する。His6レポータータグからのポリペプチドの分離は、製造元の指示に従い、エンテロキナーゼ(Invitrogen, San Diego, CA)を用いる部位特異的タンパク質分解により行なう。精製ヒトケモカイン様レセプターポリペプチドを得る。

【0191】

10

20

30

40

50

実施例 3

ケモカイン様レセプターポリペプチドと結合する被験化合物の同定

グルタチオン - S - トランスフェラーゼタンパク質を含み 96 ウエルマイクロタイタープレートのグルタチオン誘導化ウェルに吸着した精製ケモカイン様レセプターポリペプチドを、生理緩衝溶液 pH 7.0 の小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触させる。ケモカイン様レセプターポリペプチドは、配列番号 2、7 または 8 に示すアミノ酸配列を含む。被験化合物は蛍光標識を含む。この試料を 5 分間～1 時間インキュベートする。コントロール試料は、被験化合物の非存在下にてインキュベートする。

【0192】

被験化合物を含む緩衝液を、ウェルから洗い出す。ケモカイン様レセプターポリペプチドに対する被験化合物の結合を、ウェルの内容物の蛍光測定により検出する。被験化合物をインキュベートしていないウェルの蛍光と比較して少なくとも 15% ウエル中の蛍光を増大させる被験化合物を、ケモカイン様レセプターポリペプチドと結合する化合物と同定する。

【0193】

実施例 4

ケモカイン様レセプター遺伝子発現を低下させる被験化合物の同定

被験化合物を、ケモカイン様レセプター発現構築物でトランスフェクトしたヒト培養細胞に投与し、37℃ で 10～45 分間インキュベートする。トランスフェクトしなかった同じタイプの細胞培養を、被験化合物なしで同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。

【0194】

RNA を、Chirgwinら、Biochem. 18, 5294-99, 1979 に記載のように 2 つの培養物から単離する。ノーザンプロットを全 RNA 20～30 μg を用いて調製し、エクスプレスハイブ (Expresshyb) (CLONTECH) にて 65℃ で、³²P - 標識化ケモカイン様レセプター特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる。このプローブは配列番号 1 より選ばれる少なくとも 11 個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較してケモカイン様レセプター特異的シグナルを低下させる被験化合物を、ケモカイン様レセプター遺伝子発現の阻害物質として同定する。

【0195】

実施例 5

ケモカイン様レセプター活性を低下させる被験化合物の同定

被験化合物を、ケモカイン様レセプター発現構築物でトランスフェクトしたヒト培養細胞に投与し、37℃ で 10～45 分間インキュベートする。トランスフェクトしなかった同じタイプの細胞培養を、被験化合物なしで同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。ケモカインレセプター活性は、米国特許第 5,955,303 号の方法を用いて測定する。ケモカイン様レセプターのケモカイン活性を試験化合物非存在下でのケモカイン活性と比べて減少させる試験化合物を、ケモカイン様レセプター活性のインヒビターとして同定する。

【0196】

実施例 6

ケモカインレセプター様タンパク質の組織特異的発現

ケモカインレセプター様タンパク質が COPD の疾患過程に関与することを実証するために、初期発現パネルは COPD に関連する呼吸器組織及び炎症細胞由来の RNA 試料からなる：肺（成人及び胎児）、気管、新たに単離された肺胞型 II 細胞、培養されたヒト気管支上皮細胞、培養された小気道上皮細胞、培養された気管支平滑筋細胞、培養された H441 細胞 (Clara 様)、新たに単離された好中球及び単球、並びに培養された単球（マクロファージ様）。また、Clontech から購入した全 RNA パネルを用いてボディマッププロファイリングも行う。組織は、副腎腺、骨髄、脳、大腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、脾臓、唾液腺、骨格筋、小腸、脾臓、胃、精巣、胸腺、気管、甲状腺及び子宮である

10

20

30

40

50

。

【0197】

定量的発現プロファイル。定量的発現プロファイルは、Higuchiら、BioTechnology 10, 4 13-17, 1992、及びHiguchiら、BioTechnology 11, 1026-30, 1993に初めて記載された、「速度論的解析」と呼ばれる定量的PCR解析の方式により実施した。原理は、PCRの対数相内の任意に与えられたサイクルにおいて、産物の量が最初の錆型のコピー数に比例するというものである。

【0198】

PCR増幅は、標的配列に相補的な、クエンチングを内部に有する(*internally quenched*)蛍光オリゴヌクレオチド(*TaqMan*プローブ)の存在下で行なう。プローブはTaq DNAポリメラーゼの5'-3'エンドヌクレアーゼ活性により開裂され、媒体中に蛍光色素が放出される(Hollandら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7276-80, 1991)。蛍光発光は、特異的な増幅産物の量に直接比例して増大するため、PCR産物の対数増幅相を検出し、最初の錆型濃度を決定するのに用いることができる(Heidら、Genome Res. 6, 986-94, 1996、及びGibsonら、Genome Res. 6, 995-1001, 1996)。

【0199】

内部対照の増幅を行って、反応物に添加したサンプルRNAの量を標準化することができる。この種類の実験では、選択した対照は18SリボソームRNAである。異なる染料で標識下プローブを用いれば、異なる放射スペクトルを有するレセプター染料が得られるため、標的と内部標準とを同じ試験管内で独立して定量することができる。

【0200】

蛍光のリアルタイムPCR測定はすべて、ABI Prism 7700で行う。
RNA抽出およびcDNA調製。上記の組織から得た全RNAを発現の定量化に使用する。「剖検から得た」標識RNAを、TRIzol試薬(Life Technologies, MD)を用い、製造元のプロトコルにしたがって、剖検組織から抽出した。

【0201】

各RNA 50 μgを、以下の反応混合物中、DNase Iで37 °Cにて1時間処理する: 0.2 U / μL RNase不含DNase I (Roche Diagnostics, Germany); 0.4 U / μL RNaseイソヒビター(PE Applied Biosystems, CA); 10 mM Tris-HCl pH 7.9; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; および1 mM DTT。

【0202】

インキュベーション後、RNAを1体積のフェノール:クロロホルム-イソアミールアルコール(24:24:1)で1回、クロロホルムで1回抽出し、1/10体積の3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)および2体積のエタノールで沈殿させた。

【0203】

剖検組織から得た各RNA 50 μgを、Ambion(Ambion, TX)から購入したDNA不含キットを用いてDNase処理する。再懸濁および分光学的定量の後、各サンプルをTaqMan逆転写試薬(PE Applied Biosystems, CA)を用い、製造元のプロトコルにしたがって逆転写する。反応混合物中のRNAの最終濃度は200 ng/μLである。逆転写は2.5 μMのランダムヘキサマープライマーを用いて行う。

【0204】

TaqMan定量分析。特異的プライマー及びプローブは、PE Applied Biosystemsの推奨に基づいて設計する。プローブは、FAM(6-カルボキシフルオレセイン)またはTAMRA(6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン)のいずれかを用いて標識する。定量実験は、それぞれの試料由来の逆転写RNA 10 ngに対して行う。それぞれの測定は3回行なう。

【0205】

全cDNA含有量を、Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (PDAR)コントロールキット(PE Applied Biosystems, CA)を用いて、18SリボソームRNAの同時定量(多重PCR)により標準化する。

10

20

30

40

50

【0206】

検定反応混合物は以下のとおりである：1×最終TaqManユニバーサルPCRマスター・ミックス（2×ストック溶液から）（PE Applied Biosystems, CA）；1×P D A R コントロール-18S RNA（2×ストック溶液から）；300nM フォワードプライマー；900nM リバースプライマー；200nM プローブ；10ng cDNA；及び水を加えて25μlにする。

【0207】

以下の工程のそれを一回行う：50で2分間、そして95で10分間のプレ（前）PCR。以下の工程は40回行なう：95で15秒の変性、60で1分のアニーリング／伸長。

10

【0208】

実験は、ABI Prism 7700 シークエンス検出器（PE Applied Biosystems, CA）を用いて実施する。より良いバックグラウンド控除、並びに出発標的量に対する直線性を達成するために、この実施の最後に、PCRの間に得られた蛍光データを、ABI Prism 7700 使用者マニュアルに記載のように処理する。

【0209】

実施例7

新規ヒトケモカインレセプター様mRNAの定量的発現プロファイル

発現プロファイリングは定量ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、または動的（キネティクス）分析とも称される分析（最初にHiguchiら, 1992、およびHiguchiら, 1993によって記載された）に基づく。重要なことは、PCR対数期の任意のサイクルにおいて、産生物量が最初の鋳型のコピー数に比例していることである。この技術を用いることで、染色体からメッセンジャーRNA（mRNA）として転写される特定の遺伝子の発現レベルを、最初にDNAコピー（cDNA）をmRNAから作製した後に、そのcDNAについて定量PCRを行なう、定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（定量RT-PCR）と称される方法で測定する。

20

【0210】

種々のヒト組織由来のRNAの定量RT-PCR分析を行い、新規のC-Cケモカインレセプター様mRNAの組織分布を調査した。種々の組織由来の全RNA（ヒト全RNAパネルI～V、Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) 25μgを鋳型として用いて、第一ストランドcDNAをRT-PCR用のSUPERSCRIPTTM 第一ストランドA合成系（Life Technologies, Rockville, MD, USA）を用いて合成した。第一ストランドcDNA合成は工業手順に従い、mRNAの3'ポリAテイルとハイブリダイズするオリゴ(dT)を用い、合成反応を開始させて行なった。その後、第一ストランドcDNA約10ngをポリメラーゼ連鎖反応における鋳型として用いた。その他の場合では、10ngの商業的に入手可能なcDNA（Human Immune System MTC Panel and Human Blood Fraction s MTC Panel, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA）をポリメラーゼ連鎖反応の鋳型として用いた。ポリメラーゼ連鎖反応は、ポリメラーゼ連鎖反応で2本鎖DNAの合成が上手くいった場合にのみ形成されるDNA2重螺旋の副溝（minor groove）に結合するDNA結合蛍光染色SYBR Green Iの存在下で、LightCycler（Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA）にて行なった（Morrisonら、1998）。2本鎖DNAと結合すると、SYBR Green Iは、LightCycler機によって定量的に測定することができる光を発する。このポリメラーゼ連鎖反応はオリゴヌクレオチドプライマー-LBRI_263_DNA-L1（配列番号10）およびLBRI_263_DNA-R2（配列番号11）を用いて行い、反応が温度81

30

に達する反応サイクルごとに、発せられる光の強度を測定した。発せられた光の強度を、同時に反応させた既知濃度の標準と比較することによって、鋳型cDNA 1ng当たりの遺伝子転写物のコピー数に変換した。

40

【0211】

種々の組織の種類における細胞当たりのmRNA転写物レベルの差異を較正するために、標準化法は、種々の組織の5種のハウスキーピング遺伝子：グリセルアルデヒド-3-ホ

50

スファターゼ (G 3 P D H) 、ヒポキサチングアニン フォフォリボシル (phophoribosyl) トランスフェラーゼ (H P R T) 、 - アクチン、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ (P B G D) 、および - 2 - ミクログロブリンにおいて同様に計算した発現レベルを用いて行なった。このハウスキーピング遺伝子発現のレベルは、全ての組織で比較的一定していると考えられており (Adamsら、1993, Adamsら、1995, Liewら、1994) 、それ故 c D N A の合成工程に用いられる全 R N A m u . g 当たりの、細胞の適当な相対数に対する目盛として用いることができる。わずかに異なる組みのハウスキーピング遺伝子を用いること、および発現レベルを測定するのにライトサイクラー系を用いることを除けば、標準化法は R N A Master Blot User Manual, Appendix C (1997, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) に記載のものと実質的に同様であった。簡潔に述べると、全ての組織試料における 5 つのハウスキーピング遺伝子の発現レベルを、LightCycler と一定量の出発 R N A (25 μ g) を用いて遺伝子当たり、独立した 3 回の反応で測定した。同時に反応させた既知濃度標準と比較して得られた各々の遺伝子について計算されたコピー数を記録し、全組織サンプルにおける各遺伝子コピー数の平均値を求めた。次いで、各組織サンプルについて、平均に対する各ハウスキーピング遺伝子の発現を計算し、5 つのハウスキーピング遺伝子についてこれら数値の平均を求めた。次いで、各数値についての標準化因子を、標準として任意に選択した組織の 1 つについての最終値を、組織のそれぞれについての対応する数値で割ることにより計算した。組織サンプルにおいて特定の遺伝子の発現について実験的に得られた数値を標準化するために、得られた数値に、試験した組織の標準化因子を乗じた。組織が活性化されているか否かよっていくつかのハウスキーピング遺伝子において劇的な変動を示すヒト血液画分 M T C パネルから得られるものを除き、この標準化法をすべての組織に用いた。これらの組織では、1 つのハウスキーピング遺伝子、即ち - 2 - ミクログロブリンを用いて標準化を行った。

10

20

30

【 0 2 1 2 】

結果を図 1 3 および 1 4 に示し、その左には実験的に得られた第一ストランド c D N A 1 0 n g 当たりの m R N A のコピー数を示し、右にはその標準値を示す。 c D N A 合成に用いた R N A を、その供給元およびカタログナンバーとともに、図 1 および 2 に示す。

30

【 0 2 1 3 】

引用文献

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* 10:413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology* 11:1026-1030.

T.B. Morrison, J.J. Weis & C.T. Wittwer .(1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954962.

Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fields, C. & Venter, C. (1993) 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nature Genet.* 4:256265.

Adams, M. D., et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 supp:3174.

Liew, C. C., Hwang, D. M., Fung, Y. W., Laurenson, C., Cukerman, E., Tsui, S. & Lee, C. Y. (1994) A catalog of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1014510649.

40

【 0 2 1 4 】
表 1 : 全身スクリーン組織

40

【 表 1 】

組織	供給元	パネル名およびカタログ番号
1. 脳	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
2. 心臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
3. 腎臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
4. 肝臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
5. 肺	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
6. 気管	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
7. 骨髄	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
8. 結腸	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
9. 小腸	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
10. 脾臓	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
11. 胃	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
12. 胸腺	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
13. 乳腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
14. 骨格筋	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
15. 前立腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
16. 睾丸	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
17. 子宮	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
18. 小脳	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
19. 胎児脳	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
20. 胎児肝臓	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
21. 脊髄	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
22. 胎盤	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
23. 副腎	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
24. 脾臓	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
25. 唾液腺	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
26. 甲状腺	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1

10

20

30

【0215】

表2：血液／肺スクリーン組織

【表2】

組織	供給元	パネル名およびカタログ番号
1. リンパ節	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
2. 末梢血白血球	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
3. 扁桃	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
4. 末梢血単核球細胞	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
5. 末梢血単核球細胞-活性化	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
6. T細胞 (CD8+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
7. T細胞(CD8+) - 活性化	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
8. T細胞 (CD4+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
9. T細胞 (CD4+) - 活性化	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
10. B細胞 (CD19+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
11. B細胞 (CD19+) - 活性化	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
12. 単球(CD14+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
13. Th1 クローン	In-house	
14. Th2 クローン	In-house	
15. 好中球	In-house	
16. 好中球	In-house	
17. 正常気管支／気管支上皮細胞	In-house	
18. 正常気管支／気管支平滑筋細胞	In-house	
19. 正常肺線維芽細胞	In-house	
20. 微小血管内皮細胞	In-house	
21. U937	In-house	
22. RAMOS	In-house	
23. Jurkat	In-house	
24. HelaS3	In-house	
25. IMR-90	In-house	
26. HEK293	In-house	

10

20

30

40

【0216】

実施例8

ヒトケモカインレセプター様mRNAに特異的に結合する試薬による患者の処置

配列番号1の相補物より選択される少なくとも11個の連続ヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成は、ホスホラミダイト手順を用いるPharmacia Gene Assembler series synthesizerにて実施する(Uhlmannら、Chem. Rev. 90, 534-83, 1990を参考のこと)。アセンブリーおよび脱保護に続き、オリゴヌクレオチドを2度エタノール沈殿させ、乾燥させ、そしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に所望の濃度に懸濁する。これらのオリゴヌクレオチドの純度は、キャピラリーゲル電気泳動及びイオン交換HPLCにより試験する。オリゴヌクレオチド調製のエンドトキシンレベルは、リムルスマーバ様検定(Limulus Amebocyte Assay)(Bang, Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105, 361-362, 1953)を用いて決定する。

【0217】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを0.1~100μMの濃度で含有する水性組成物を注射により直接患者に投与する。患者の重症度は低減する。

【0218】

実施例9

50

喘息処置のための化合物 / 標的確認の *in vivo* 試験

1. T 細胞の活性に関する試験

共刺激分子 - サイトカイン、サイトカインレセプター、シグナル伝達分子、T 細胞活性化に関する任意の分子

マウス抗 CD3 誘導サイトカイン産生モデル

BALB/c マウスに $10 \mu\text{g}$ の 145-2C11 (精製したハムスター抗マウス CD3 モノクローナル抗体、PHARMINGEN)を 1 回静脈注射した。抗 CD3 mAb 注射の 60 分前に化合物を腹腔内注射した。血液を抗体注射の 90 分後に採取した。血清を 3000 r.p.m.、10 分の遠心により得た。血清中の IL-2 および IL-4 のレベルを ELISA により測定した。

【0219】

10

2. B 細胞の活性に関する試験

B 細胞レセプター - シグナル伝達分子、B 細胞活性化 / Ig クラススイッ칭に関する任意の分子

マウス抗 IgD 誘導 IgE 産生モデル

BALB/c マウスに 0.8 mg の精製したヤギ抗マウス IgD 抗体または PBS を静脈注射した (0 日目と定義)。化合物を 0 ~ 6 日目までの間腹腔内投与した。7 日目に血液を集め、血清を 3000 r.p.m.、10 分の遠心により得た。IgE 血清総レベルをヤマサ ELISA キットにより測定し、その Ig サブタイプを Ig ELISA キットにより測定した (Rougier Bio-tech's, Montreal, Canada)。

【0220】

20

3. 単球 / マクロファージの活性に関する試験、シグナル伝達分子、転写因子

マウス LPS - 誘導 TNF - 産生モデル

BALB/c マウスに LPS ($200 \mu\text{g}$ / マウス) を腹腔内投与した。化合物を LPS 注射の 1 時間前に投与した。LPS 注射から 90 分後に血液を集め、血漿を得た。サンプル中の TNF - 濃度を ELISA キットを用いて測定した。

【0221】

4. 好酸球活性化試験

エオタキシン - エオタキシンレセプター (GPCR)

シグナル伝達分子、細胞骨格分子、接着分子

マウスエオタキシン誘導好酸球モデル

30

BALB/c マウスに 2.5 mL の空気を -6 および -3 に日目に皮内注射し、airpouch を作製した。0 日目に、エオタキシン注射 ($3 \mu\text{g}$ / マウス、i.d.) の 60 分間前に化合物を投与した。IL-5 (300 ng / マウス) をエオタキシン注射の 30 分間前に静脈内注射した。エオタキシン注射の 4 時間後、滲出液中の白血球を集め、細胞の総数を計測した。滲出液における識別的細胞計数を May-Grunwald Giemsa 溶液で染色することにより行った。

【0222】

5. Th2 細胞の活性化試験

抗原提示に関する分子、共刺激分子、シグナル伝達分子、転写因子に関する分子

マウス D10 細胞移動モデル

生理食塩水中に 2 mg の粗アルブミンを含む D10.G4.1 細胞 (1×10^7 細胞 / マウス) を AKR マウスに静脈内投与した。6 時間後に血液を集め、3000 r.p.m. 10 分の遠心により血清を得た。血清中の IL-4 および L-5 レベルを ELISA キットにより測定した。これら細胞の注射の、4 時間目および +1 時間目に化合物を腹腔内投与した。

【0223】

40

6. ラットにおける受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 試験

6 週齢の雄性 Wistar ラットの剃毛した背中に対し、弱い麻酔下で、 $0.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ マウス抗 DNP-IgE モノクローナル抗体 (SPE-7) $50 \mu\text{L}$ で皮内 (i.d.) 感作した。24 時間後、このラットに対し、 0.6 mg の DNP-BSA (30) (LSL CO., LTD) および 0.005 g の Evans ブルーを含有する生理食塩水 1 mL を静脈内投与により抗原投与した。抗原注射の 0.5 時間前に化合物を腹腔内 (i.p.) 投与した。ランク (対照) として、感作、抗原投与およ

50

び化合物処置を行わないラットを用いて、阻害なしの値を測定する。抗原投与の30分後に、ラットを殺し、背中の皮膚を剥がした。皮膚のEvansブルー染料をホルムアルデヒド中63にて一晩抽出する。次いで、620nmでの吸光度を測定し、漏れ出た染料の光学密度を求める。

化合物によるPCAの阻害の百分率を以下のようにして計算する：

%阻害 = { (平均のピークル値 - サンプル値) / (平均ピークル値 - 平均対照値) } × 100

【0224】

7. ラットにおけるアナフィラキシー性気管支収縮

6週齢の雄性Wistarラットに対し、10μgマウス抗DNP IgE、SPE-7で静脈内(i.v.)感作し、1日後に、ラットに対し、1.5mgDNP-BSA(30)を含有する0.3mLの生理食塩水を、ウレタン(1000mg/kg, i.p.)およびガラミン(50mg/kg, i.v.)による軽い麻酔下で静脈内投与により抗原投与した。

圧力変換器につないだカニューレのサイドアームを介して最大吸気圧(PIP)を記録する。PIPの変化は、肺の抵抗とコンプライアンスの両方の変化を反映する。薬物を評価するために、各薬物を抗原投与の5分前にi.v.投与する。

【図面の簡単な説明】

【0225】

【図1】ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号1)を示す。

【図2】図1のDNA配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】SwissProt受託番号No.P56492によって同定されるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号3)を示す。

【図4】ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号4)を示す。

【図5】ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号5)を示す。

【図6】ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号6)を示す。

【図7】図4のDNA配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号7)を示す。

【図8】図5のDNA配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号8)を示す。

【図9】ケモカイン様レセプターポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号9)を示す。

【図10】SwissProt受託番号No.P56492によって同定されるタンパク質(配列番号3)に対する、ヒトケモカイン様レセプター(配列番号2)のFASTAアライメントを示す

【図11】pfam | hmm | 7tm_1に対する配列番号2のHMMFAMアライメントを示す。

【図12】新規のヒトケモカインレセプター様タンパク質と、その最も近い3つのヒト同族体、TRHR、CCR1、CXCR4およびCCR3とのアライメントを示す。ダッシュは、配列にギャップを附加してアライメントを改善した部分を示す。背景の網掛けは、特定の残基における5つの配列間の保存のレベルを示す。ここで、黒の部分は5つの配列の間での同一性を示し、グレーが薄くなるほど保存のレベルが低いことを示す。

【図13】新規のヒトC-Cケモカインレセプター様mRNA発現プロファイル(全身スクリーン)を示す。

【図14】新規のヒトC-Cケモカインレセプター様mRNA発現プロファイル(血液/肺スクリーン)を示す。

【 図 1 0 - 1 】

FASTA - swiss|P56492|CKR3 CERAEに対する263のアライメント

このヒットは以下でのスコアリングである: 64.8
スコアリングコード: 00100000 (コード: 00100000)

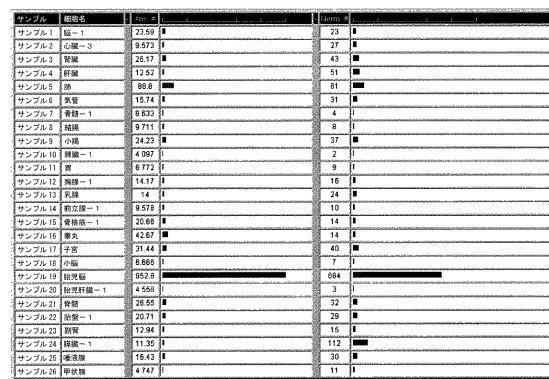
ヨリシタリタス: BLUSUM62 (ヨシセシサスハタニシの權測に使用)

【 図 1 1 】

【図10-2】

YGAPTONRWLWIMNSDIANMALLNTAINFELLYCELSKRFRTMAATLKFHKQ
 :G :V :A :N :Y :RFF: L :F :
 FGLDERSKHDVLVLTETAYSCICVNPVYAFVGERFRKY ---LRHVFHRVLMHL
 KOPYHNFNSFTSSPWPSPANSH---CL 335
 ::F:: ::TSS :SP:: :CT

13



【 図 1 4 】

サンプル	細胞名	性別	年齢	死因	死因
サンプル 1	リンパ球		527	0	*
サンプル 2	PBL		5966	0	*
サンプル 3	腫瘍細胞		444	2	†
サンプル 4	PB MNM		281	0	*
サンプル 5	PB MNM-轉換		58075	0	*
サンプル 6	下咽癌 (16H)		2385	0	*
サンプル 7	下咽癌 (16H)-活性化		3315	412	■
サンプル 8	腫瘍細胞 (24H)		5,21	0	*
サンプル 9	腫瘍細胞 (24H)-活性化		378	0	*
サンプル 10	白血病 (20H)		3,321	1	†
サンプル 11	白血病 (20H)-活性化		80036	0	*
サンプル 12	HEK (20H)		1,334	0	*
サンプル 13	Th1 (20H)		2,812	0	*
サンプル 14	Th2 (20H)		959	0	*
サンプル 15	肝細胞癌 A		322	0	*
サンプル 16	好中球 B-2		164	0	*
サンプル 17	正常末梢免疫 乳頭瘤病細胞		3,815	17	■
サンプル 18	正常免疫細胞		86503	0	*
サンプル 19	正常免疫細胞		1,244	0	*
サンプル 20	頭頸癌(内正細胞)		2,135	1	†
サンプル 21	U251		316	0	*
サンプル 22	GAMO		174	0	*
サンプル 23	Jurkat		782	2	†
サンプル 24	HeLaS2		758	0	*
サンプル 25	16H-90		2153	271	■
サンプル 26	HEK293		701	0	*

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/48358 A2(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, 631-0804 (JP). OKIGAMI, Hiromi [JP/JP]; 7-1-1-8-204 C07K 14/15, C12Q 1/68, C12N 15/62, G01N 33/68, Saganakadai, Kizu-cho, Sourakugun, Kyoto 619-0223 A61K 39/395, 31/7088, A61P 37/00, C12N 1/19, A61P (JP). 9/00

(21) International Application Number: PCT/EP01/14571

(74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, 51368 Leverkusen (DE).

(22) International Filing Date:
12 December 2001 (12.12.2001)

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

(25) Filing Language: English

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

(26) Publication Language: English

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

(30) Priority Data:
60/255,150 14 December 2000 (14.12.2000) US
60/280,110 2 April 2001 (02.04.2001) US
60/299,474 21 June 2001 (21.06.2001) US(86) Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(87) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SMOLYAR, Alex [US/US]; 734 Boylston Street, Brookline, MA 02467 (US). ZHU, Zhenlin [CN/US]; 45 Hinckley Road, Waban, MA 02468 (US). ENCINAS, Jeffrey [US/JP]; 3-17-15, Ayanenike-cho, Nara 631-0032 (JP). WATANABE, Shinichi [JP/JP]; 6-3-1-504 Jingu-cho, Nara-shi, Nara

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



WO 02/48358 A2

(54) Title: REGULATION OF HUMAN CHEMOKINE-LIKE RECEPTOR

(57) Abstract: Reagents which regulate human chemokine-like receptor and reagents which bind to human chemokine-like receptor gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, HIV infection, cardiovascular disorders, asthma and COPD.

REGULATION OF HUMAN CHEMOKINE-LIKE RECEPTOR

This application incorporates by reference co-pending applications Serial No. 60/255,150 filed December 14, 2000 and Serial No. 60/280,110 filed April 2, 2001.

5

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to the area of receptor regulation. More particularly, the invention relates to the regulation of human chemokine-like receptor.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION**G Protein-Coupled Receptors**

15 Many medically significant biological processes are mediated by signal transduction pathways that involve G-proteins (Lefkowitz, *Nature* 351, 353-354, 1991). The family of G protein-coupled receptors (GPCR) includes receptors for hormones, neurotransmitters, growth factors, and viruses. Specific examples of GPCRs include receptors for such diverse agents as calcitonin, adrenergic hormones, endothelin, cAMP, adenosine, acetylcholine, serotonin, dopamine, histamine, thrombin, kinin, follicle stimulating hormone, opsins, endothelial differentiation gene-1, rhodopsins, odorants, cytomegalovirus, G proteins themselves, effector proteins such as phospholipase C, adenylyl cyclase, and phosphodiesterase, and actuator proteins such as protein kinase A and protein kinase C.

25

The GPCR protein superfamily now contains over 250 types of paralogues, receptors that represent variants generated by gene duplications (or other processes), as opposed to orthologues, the same receptor from different species. The superfamily can be broken down into five families: Family I, receptors typified by rhodopsin and the β 2-adrenergic receptor and currently represented by over 200 unique members (reviewed by Dohlman *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 60, 653-88, 1991, and references

30

therein); Family II, the recently characterized parathyroid hormone/calcitonin/secretin receptor family (Juppner *et al.*, *Science* 254, 1024-26, 1991; Lin *et al.*, *Science* 254, 1022-24, 1991); Family III, the metabotropic glutamate receptor family in mammals (Nakanishi, *Science* 258, 597-603, 1992); Family IV, the cAMP receptor family, 5 important in the chemotaxis and development of *D. discoideum* (Klein *et al.*, *Science* 241, 1467-72, 1988; and Family V, the fungal mating pheromone receptors such as STE2 (reviewed by Kurjan, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 1097-1129, 1992).

10 GPCRs possess seven conserved membrane-spanning domains connecting at least eight divergent hydrophilic loops. GPCRs (also known as 7TM receptors) have been characterized as including these seven conserved hydrophobic stretches of about 20 to 30 amino acids, connecting at least eight divergent hydrophilic loops. Most GPCRs have single conserved cysteine residues in each of the first two extracellular loops, which form disulfide bonds that are believed to stabilize functional protein 15 structure. The seven transmembrane regions are designated as TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, and TM7. TM3 has been implicated in signal transduction.

20 Phosphorylation and lipidation (palmitylation or farnesylation) of cysteine residues can influence signal transduction of some GPCRs. Most GPCRs contain potential phosphorylation sites within the third cytoplasmic loop and/or the carboxy terminus. For several GPCRs, such as the β -adrenergic receptor, phosphorylation by protein kinase A and/or specific receptor kinases mediates receptor desensitization.

25 For some receptors, the ligand binding sites of GPCRs are believed to comprise hydrophilic sockets formed by several GPCR transmembrane domains. The hydrophilic sockets are surrounded by hydrophobic residues of the GPCRs. The hydrophilic side of each GPCR transmembrane helix is postulated to face inward and form a polar ligand binding site. TM3 has been implicated in several GPCRs as 30 having a ligand binding site, such as the TM3 aspartate residue. TM5 serines, a TM6 asparagine, and TM6 or TM7 phenylalanines or tyrosines also are implicated in ligand binding.

5 GPCRs are coupled inside the cell by heterotrimeric G-proteins to various intra-cellular enzymes, ion channels, and transporters (see Johnson *et al.*, *Endoc. Rev.* 10, 317-331, 1989). Different G-protein alpha-subunits preferentially stimulate particular effectors to modulate various biological functions in a cell. Phosphorylation of cytoplasmic residues of GPCRs is an important mechanism for the regulation of some GPCRs. For example, in one form of signal transduction, the effect of hormone binding is the activation inside the cell of the enzyme, adenylate cyclase. Enzyme activation by hormones is dependent on the presence of the 10 nucleotide GTP. GTP also influences hormone binding. A G protein connects the hormone receptor to adenylate cyclase. G protein exchanges GTP for bound GDP when activated by a hormone receptor. The GTP-carrying form then binds to activated adenylate cyclase. Hydrolysis of GTP to GDP, catalyzed by the G protein itself, returns the G protein to its basal, inactive form. Thus, the G protein serves a 15 dual role, as an intermediate that relays the signal from receptor to effector, and as a clock that controls the duration of the signal.

20 Over the past 15 years, nearly 350 therapeutic agents targeting GPCRs receptors have been successfully introduced onto the market. This indicates that these receptors have an established, proven history as therapeutic targets. Clearly, there is an on-going need for identification and characterization of further GPCRs which can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, infections such as bacterial, fungal, protozoan, and viral infections, particularly those caused by HIV viruses, pain, cancers, anorexia, bulimia, asthma, 25 Parkinson's diseases, acute heart failure, hypotension, hypertension, urinary retention, osteoporosis, angina pectoris, myocardial infarction, ulcers, asthma, allergies, benign prostatic hypertrophy, and psychotic and neurological disorders, including anxiety, schizophrenia, manic depression, delirium, dementia, several mental retardation, and dyskinesias, such as Huntington's disease and Tourette's 30 syndrome.

Chemokine Receptors

Chemokines are a large family of low molecular weight, inducible, secreted, pro-inflammatory cytokines which are produced by various cell types. U.S. Patent 5,955,303. They have been divided into several subfamilies on the basis of the positions of their conserved cysteines. The CXC family includes interleukin-8 (IL-8), growth regulatory gene, neutrophil-activating peptide-2, and platelet factor 4 (PF-4). Although IL-8 and PF-4 are both polymorphonuclear chemoattractants, angiogenesis is stimulated by IL-8 and inhibited by PF-4. The CC family includes monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), RANTES (regulated on activation, normal T cell-expressed and secreted), macrophage inflammatory proteins (MIP-1.alpha., MIP-1.beta.), and eotaxin. MCP-1 is secreted by numerous cell types including endothelial, epithelial, and hematopoietic cells, and is a chemoattractant for monocytes and CD45RO+lymphocytes (Proost, P. (1996) *Int J. Clin. Lab. Res.* 26: 211-223; Raport, C. J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 17161-17166).

Cells respond to chemokines through G-protein-coupled receptors. These receptors are seven transmembrane molecules which transduce their signal through heterotrimeric GTP-binding proteins. Stimulation of the GTP-binding protein complex by activated receptor leads to the exchange of guanosine diphosphate for guanosine triphosphate and regulates the activity of effector molecules. There are distinct classes of each of the subunits which differ in activity and specificity and can elicit inhibitory or stimulatory responses. When stimulation of the known cytokine receptors shows agonist-dependent inhibition of adenylyl cyclase and mobilization of intracellular calcium, the receptor coupling to G_{αi} subunits (Myers, S. J. et al (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 5786-5792).

Chemokine receptors play a major role in the mobilization and activation of cells of the immune system. The effects of receptor stimulation are dependent on the cell type and include chemotaxis, proliferation, differentiation, and production of cytokines. Chemokine stimulation produces changes in vascular endothelium,

chemotaxis to sites of inflammation, and activates the effector functions of cells (Taub, D. D. (1996) *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 355-376).

5 The chemokine receptors display a range of sequence diversity and ligand promiscuity. The known chemokine receptor protein sequence identities range from 22 to 40%, and certain receptors can respond to multiple ligands. Although mainly expressed in immune cells, viral homologues are expressed by human cytomegalovirus and Herpes virus saimiri. The chemokine receptor known as the Duffy blood group antigen binds both CC and CXC family chemokines and serves as the receptor on erythrocytes for the malarial parasite Plasmodium vivax. Chemokine receptors play a crucial role during the entry of human immunodeficiency virus (HIV) into host cells. This initial event requires specific interactions between the viral envelope glycoprotein and two cellular receptors, CD4 and a chemokine coreceptor. The latter belongs to the family of seven-transmembrane G-protein-coupled receptors 10 comprising the principal coreceptors CCR5, CXCR4 and others of minor importance including CCR3, CCR2b, CCR8, CX3CR1. *Moore et al., Curr. Opin. Immunol.* 9, 551-562, 1997.

15

Chemokines appear to be involved in a variety of pro-inflammatory and autoimmune 20 diseases, which makes them and their receptors very attractive therapeutic targets. In fact, small-molecule antagonists of seven of the chemokine receptor family have already been reported, some with potency in the low nanomolar range. Schwarz & Wells, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 407-17, 1999. It is likely that novel chemokines which affect the trafficking and activation of monocyte and CD8⁺ cells remain to be 25 discovered.

Because of the importance of chemokine receptors, there is a need in the art to identify additional members of this receptor family that can be regulated to provide therapeutic effects.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the invention to provide reagents and methods of regulating a human chemokine-like receptor. This and other objects of the invention are provided by one or more of the embodiments described below.

One embodiment of the invention is a chemokine-like receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

10

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

15

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

20

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8 and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8

25

Yet another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a chemokine-like receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

30

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

5

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

10

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8 and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8

15

Binding between the test compound and the chemokine-like receptor polypeptide is detected. A test compound which binds to the chemokine-like receptor polypeptide is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the activity of the chemokine-like receptor.

20

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

25

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

30

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 4;

5 the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 4;

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 5;

10 the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 5;

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9; and

15 the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9.

Binding of the test compound to the polynucleotide is detected. A test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the amount of the 20 chemokine-like receptor through interacting with the chemokine-like receptor mRNA.

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a 25 chemokine-like receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

30 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

5 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8 and

10 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8

A chemokine-like receptor activity of the polypeptide is detected. A test compound which increases chemokine-like receptor activity of the polypeptide relative to chemokine-like receptor activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for increasing extracellular matrix degradation. A test compound which decreases chemokine-like receptor activity of the polypeptide relative to chemokine-like receptor activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

15 20 Even another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a chemokine-like receptor product of a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

25 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

30 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 4;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 4;

5 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 5;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 5;

10 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9.

15 Binding of the test compound to the chemokine-like receptor product is detected. A test compound which binds to the chemokine-like receptor product is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

20 Still another embodiment of the invention is a method of reducing extracellular matrix degradation. A cell is contacted with a reagent which specifically binds to a polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide or the product encoded by the polynucleotide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

25 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

30 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 4;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 4;

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 5;

5

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 5;

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9; and

10

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9.

Chemokine-like receptor activity in the cell is thereby decreased.

15

The invention thus provides a human chemokine-like receptor which can be used to identify test compounds which may act, for example, as activators or inhibitors at the receptor's active site. Human chemokine-like receptor and fragments thereof also are useful in raising specific antibodies that can block the receptor and effectively reduce its activity.

20

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the DNA-sequence encoding a chemokine-like receptor Polypeptide (SEQ ID NO: 1).

25

Fig. 2 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.1 (SEQ ID NO: 2).

30

Fig. 3 shows the amino acid sequence of the protein identified by SwissProt Accession No. P56492 (SEQ ID NO: 3).

Fig. 4 shows the DNA-sequence encoding a chemokine-like receptor Polypeptide (SEQ ID NO: 4).

5 Fig. 5 shows the DNA-sequence encoding a chemokine-like receptor Polypeptide (SEQ ID NO: 5).

Fig. 6 shows the DNA-sequence encoding a chemokine-like receptor Polypeptide (SEQ ID NO: 6).

10 Fig. 7 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.4 (SEQ ID NO: 7).

Fig. 8 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.5 (SEQ ID NO: 8).

15 Fig. 9 shows the DNA-sequence encoding a chemokine-like receptor Polypeptide (SEQ ID NO: 9).

Fig. 10 shows the FASTA alignment of human chemokine-like receptor (SEQ ID 20 NO: 2) with the protein identified with SwissProt Accession No. P56492 (SEQ ID NO: 3).

25 Fig. 11 shows the HMMPFAM alignment of SEQ ID NO: 2 against pfam|hmm|7tm_1.

Fig. 12 shows alignment of the novel human chemokine receptor-like protein with 30 its three closest human homologues, TRHR, CCR1, CXCR4, and CCR3. Dashes indicate where gaps were added to a sequence to improve the alignment. Background shading denotes the level of conservation between the five sequences at a particular residue, where black is identity between

the five and decreasingly dark shades of gray show decreasing levels of conservation.

5 Fig. 13 shows the expression profiling of the novel human C-C chemokine receptor-like mRNA, whole-body screen.

Fig. 14 shows the expression profiling of the novel human C-C chemokine receptor-like mRNA, blood/lung screen.

10 **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The invention relates to an isolated polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide and being selected from the group consisting of:

15 a) a polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
20 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;

25 amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8; and
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8.

30 b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9;

- 14 -

- c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b);
- 5 d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code; and
- e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).

10

Furthermore, it has been discovered by the present applicant that a novel chemokine-like receptor, particularly a human chemokine-like receptor, can be used in therapeutic methods to treat HIV infection, cardiovascular disorders, asthma or COPD.

15

The novel human chemokine-like receptor transcript encodes a polypeptide of 356 amino acids with a calculated molecular mass of 41.4 kD. Analysis of the translation of human chemokine-like receptor reveals that the protein contains seven putative transmembrane domains, consistent with the structure of a GPCR. The gene is composed of two exons.

20

The amino acid sequence of human chemokine-like receptor shows 17.6% identity over its full length with its closest human homolog, C-C chemokine receptor 3 (CCR3). This value increases to an overall sequence similarity of 34.1% when amino acids with related physicochemical properties are included. Homology of human chemokine-like receptor with other chemokine receptors CCR1, CXCR1, and CXCR4 likewise shows an overall identity ranging from 13 to 17% and a similarity ranging from 29 to 32%. The novel human chemokine-like receptor additionally shows a similar degree of sequence homology to the thyrotropin releasing hormone receptor (TRHR), with an identity of 17.9% and a similarity of 32.8%, but structurally, TRHR has an extended third cytoplasmic loop between the fifth and

25

30

sixth transmembrane domains that is not seen in human chemokine-like receptor (Fig. 12).

The distribution of human chemokine-like receptor mRNA expression was examined 5 in several different human tissues, cell types, and commonly used cell lines (Figs. 13 and 14). Among the tissues tested, fetal brain showed the most prominent expression, while pancreas and lung showed a moderate expression level. The novel human chemokine-like receptor appears to be expressed at low levels in most tissues, indicating expression on a cell type found in a variety of different tissues such as 10 blood or vascular cells.

In specific cell types or cell lines tested, human chemokine-like receptor was found 15 to be expressed at a high level in phytohemagglutinin-stimulated CD8⁺ cells, but strikingly in none of the other immune cells tested. High expression was also observed in a human fetal lung fibroblast line IMR-90, and moderate expression was seen in normal bronchial/tracheal epithelial cells.

Its high expression in activated CD8⁺ cells and its homology to chemokine receptors 20 together suggest that the novel human chemokine-like receptor can act as a receptor of chemoattractant molecules on activated lymphocytes and thereby is involved, in a similar way to other chemokine receptors, in cell trafficking and homing to sites of infection, inflammation, or tissue injury. The regulation of activity of the novel human chemokine-like receptor therefore can be utilized to treat cardiovascular, immunological and inflammatory diseases, including but not limited to asthma and 25 COPD. The combined expression in brain and CD8⁺ lymphocytes also suggests that this receptor is an advantageous target for viruses that reside in the nervous system. Therefore regulating the binding of ligands, for example chemoattractant molecules or virus particles, to this receptor can be used as a mechanism to modulate the immune response or to inhibit viral infections, including but not limited to HIV 30 infection.

Human chemokine-like receptor comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 7, or 8. Coding sequences for human chemokine-like receptor are shown in SEQ ID NO: 1, 4, and 5. A longer sequence comprising the coding sequences is shown in SEQ ID NO: 5. This sequence is located on chromosome 16. Alternate 5 start codons and the stop codon are shown in bold in Fig. 12.

Human chemokine-like receptor is 24.7% identical over 331 amino acids to the protein identified with SwissProt Accession No. P56492 (SEQ ID NO: 3) and annotated as "C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3" (Fig. 10). Human 10 chemokine-like receptor has a conserved acidic-Arg-aromatic triplet present in the second cytoplasmic loop, as shown in bold in Fig. 10.

Human chemokine-like receptor of the invention expected to be useful for the same purposes as previously identified chemokine receptors. Human chemokine-like 15 receptor is believed to be useful in therapeutic methods to treat disorders such as HIV infection, cardiovascular disorders, asthma and COPD. Human chemokine-like receptor also can be used to screen for human chemokine-like receptor activators and inhibitors.

20 *Polypeptides*

Human chemokine-like receptor polypeptides according to the invention comprise at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 25 or 353 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, or 357 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7, at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, or 344 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8, or a biologically active variant thereof, as defined 30 below. A chemokine-like receptor polypeptide of the invention therefore can be a portion of a chemokine-like receptor protein, a full-length chemokine-like receptor

protein, or a fusion protein comprising all or a portion of a chemokine-like receptor protein.

Biologically Active Variants

5 Human chemokine-like receptor polypeptide variants that are biologically active, e.g., retain a chemokine activity, also are chemokine-like receptor polypeptides. Preferably, naturally or non-naturally occurring chemokine-like receptor polypeptide variants have amino acid sequences which are at least about 26, 30, 35, 40, 45, 50,
10 55, 60, 65, or 70, preferably about 75, 80, 85, 90, 96, 96, or 98% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 7, or 8 or a fragment thereof. Percent identity between a putative chemokine-like receptor polypeptide variant and an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, 7, or 8 is determined by conventional methods. See, for example, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986), and
15 Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). Briefly, two amino acid sequences are aligned to optimize the alignment scores using a gap opening penalty of 10, a gap extension penalty of 1, and the "BLOSUM62" scoring matrix of Henikoff and Henikoff (ibid.). Those skilled in the art appreciate that there are many established algorithms available to align two amino acid sequences. The
20 "FASTA" similarity search algorithm of Pearson and Lipman is a suitable protein alignment method for examining the level of identity shared by an amino acid sequence disclosed herein and the amino acid sequence of a putative variant. The FASTA algorithm is described by Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), and by Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990). Briefly, FASTA first
25 characterizes sequence similarity by identifying regions shared by the query sequence (e.g. SEQ ID NO: 2, 7 or 8) and a test sequence that have either the highest density of identities (if the ktup variable is 1) or pairs of identities (if ktup=2), without considering conservative amino acid substitutions, insertions, or deletions. The ten regions with the highest density of identities are then rescored by comparing the
30 similarity of all paired amino acids using an amino acid substitution matrix, and the ends of the regions are "trimmed" to include only those residues that contribute to the

highest score. If there are several regions with scores greater than the "cutoff" value (calculated by a predetermined formula based upon the length of the sequence and the ktup value), then the trimmed initial regions are examined to determine whether the regions can be joined to for man approximate alignment with gaps. Finally, the 5 highest scoring regions of the two amino acid sequences are aligned using a modification of the Needleman-Wunsch- Sellers algorithm (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol.48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787 (1974)), which allows for amino acid insertions and deletions. Preferred parameters for FASTA analysis are: ktup=1, gapopeningpenalty=10, gap extension penalty=1, and substitution matrix=BLOSUM62. These parameters can be introduced into a FASTA 10 program by modifying the scoring matrix file ("SMATRIX"), as explained in Appendix 2 of Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990).FASTA can also be used to determine the sequence identity of nucleic acid molecules using a ratio as disclosed above. For nucleotide sequence comparisons, the ktup value can range between one 15 to six, preferably from three to six, most preferably three, with other parameters set as default.

Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, 20 insertions, or deletions. Amino acid substitutions are defined as one for one amino acid replacements. They are conservative in nature when the substituted amino acid has similar structural and/or chemical properties. Examples of conservative replacements are substitution of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine.

25 Amino acid insertions or deletions are changes to or within an amino acid sequence. They typically fall in the range of about 1 to 5 amino acids. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity of a chemokine-like receptor polypeptide can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software.

30 Whether an amino acid change results in a biologically active chemokine-like

receptor polypeptide can readily be determined by assaying for chemokine receptor activity, as described for example, in U.S. Patent 5,955,303.

Fusion Proteins

5

Fusion proteins are useful for generating antibodies against chemokine-like receptor polypeptide amino acid sequences and for use in various assay systems. For example, fusion proteins can be used to identify proteins which interact with portions of a chemokine-like receptor polypeptide. Protein affinity chromatography or library-based assays for protein-protein interactions, such as the yeast two-hybrid or phage display systems, can be used for this purpose. Such methods are well known in the art and also can be used as drug screens.

10

A chemokine-like receptor polypeptide fusion protein comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, or 353 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, or 357 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7, at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, or 344 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8, or of a biologically active variant, such as those described above. The first polypeptide segment also can comprise full-length chemokine-like receptor protein.

15

20

The second polypeptide segment can be a full-length protein or a protein fragment. Proteins commonly used in fusion protein construction include β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), auto-fluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horse-radish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including histidine (His)

25

30

tags, FLAG tags, influenza hemagglutinin (HA) tags, Myc tags, VSV-G tags, and thioredoxin (Trx) tags. Other fusion constructions can include maltose binding protein (MBP), S-tag, Lex a DNA binding domain (DBD) fusions, GAL4 DNA binding domain fusions, and herpes simplex virus (HSV) BP16 protein fusions. A 5 fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between the chemokine-like receptor polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the chemokine-like receptor polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

10 A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a fusion protein is produced by covalently linking two polypeptide segments or by standard procedures in the art of molecular biology. Recombinant DNA methods can be used to prepare fusion proteins, for example, by making a DNA construct which comprises coding sequences selected from the complement of SEQ ID NO: 1 in

15 proper reading frame with nucleotides encoding the second polypeptide segment and expressing the DNA construct in a host cell, as is known in the art. Many kits for constructing fusion proteins are available from companies such as Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International

20 Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

Identification of Species Homologs

25 Species homologs of human chemokine-like receptor polypeptide can be obtained using chemokine-like receptor polypeptide polynucleotides (described below) to make suitable probes or primers for screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast, identifying cDNAs which encode homologs of chemokine-like receptor polypeptide, and expressing the cDNAs as is known in

30 the art.

Polynucleotides

5 A chemokine-like receptor polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for a chemokine-like receptor polypeptide. Coding sequences for human chemokine-like receptor are shown in SEQ ID NO: 1, 4, and 5.

10 Degenerate nucleotide sequences encoding human chemokine-like receptor polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, or 5 or its complement also are chemokine-like receptor polynucleotides. Percent sequence identity between the sequences of two 15 polynucleotides is determined using computer programs such as ALIGN which employ the FASTA algorithm, using an affine gap search with a gap open penalty of -12 and a gap extension penalty of -2. Complementary DNA (cDNA) molecules, species homologs, and variants of chemokine-like receptor polynucleotides which encode biologically active chemokine-like receptor polypeptides also are chemokine-like receptor polynucleotides.

20 Identification of Polynucleotide Variants and Homologs

25 Variants and homologs of the chemokine-like receptor polynucleotides described above also are chemokine-like receptor polynucleotides. Typically, homologous chemokine-like receptor polynucleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known chemokine-like receptor polynucleotides under stringent conditions, as is known in the art. For example, using the following wash conditions--2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, room temperature twice, 30 minutes each; then 2X SSC, 0.1% SDS, 50°C once, 30 30 minutes; then 2X SSC, room temperature twice, 10 minutes each--homologous sequences can be identified which contain at most about 25-30% basepair

mismatches. More preferably, homologous nucleic acid strands contain 15-25% basepair mismatches, even more preferably 5-15% basepair mismatches.

Species homologs of the chemokine-like receptor polynucleotides disclosed herein 5 also can be identified by making suitable probes or primers and screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast. Human variants of chemokine-like receptor polynucleotides can be identified, for example, by screening human cDNA expression libraries. It is well known that the T_m of a double-stranded DNA decreases by 1-1.5°C with every 1% decrease in homology 10 (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973)). Variants of human chemokine-like receptor polynucleotides or chemokine-like receptor polynucleotides of other species can therefore be identified by hybridizing a putative homologous chemokine-like receptor polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ 15 ID NO: 1 or the complement thereof to form a test hybrid. The melting temperature of the test hybrid is compared with the melting temperature of a hybrid comprising polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.

Nucleotide sequences which hybridize to chemokine-like receptor polynucleotides or 20 their complements following stringent hybridization and/or wash conditions also are chemokine-like receptor polynucleotides. Stringent wash conditions are well known and understood in the art and are disclosed, for example, in Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, at pages 9.50-9.51.

25 Typically, for stringent hybridization conditions a combination of temperature and salt concentration should be chosen that is approximately 12-20°C below the calculated T_m of the hybrid under study. The T_m of a hybrid between a chemokine-like receptor polynucleotide having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, or 5 or the complement thereof and a polynucleotide sequence which is at least 30 about 50, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to one of those nucleotide

sequences can be calculated, for example, using the equation of Bolton and McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l,$$

5 where l = the length of the hybrid in basepairs.

Stringent wash conditions include, for example, 4X SSC at 65°C, or 50% formamide, 4X SSC at 42°C, or 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Highly stringent wash conditions include, for example, 0.2X SSC at 65°C.

10

Preparation of Polynucleotides

15

A chemokine-like receptor polynucleotide can be isolated free of other cellular components such as membrane components, proteins, and lipids. Polynucleotides can be made by a cell and isolated using standard nucleic acid purification techniques, or synthesized using an amplification technique, such as the polymerase chain reaction (PCR), or by using an automatic synthesizer. Methods for isolating polynucleotides are routine and are known in the art. Any such technique for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated chemokine-like receptor 20 polynucleotides. For example, restriction receptors and probes can be used to isolate polynucleotide fragments which comprises chemokine-like nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations which are free or at least 70, 80, or 90% free of other molecules.

25

Human chemokine-like receptor cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using chemokine-like receptor mRNA as a template. Human chemokine-like receptor cDNA molecules can thereafter be replicated using molecular biology techniques known in the art and disclosed in manuals such as Sambrook *et al.* (1989). An amplification technique, such as PCR, can be used to 30 obtain additional copies of polynucleotides of the invention, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize chemokine-like receptor polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode a chemokine-like receptor 5 polypeptide having, for example, an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 or a biologically active variant thereof.

Extending Polynucleotides

10 Various PCR-based methods can be used to extend the nucleic acid sequences disclosed herein to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, restriction-site PCR uses universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (Sarkar, *PCR Methods Appl.* 2, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a 15 linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

20 Inverse PCR also can be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Primers can be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), to be 22-30 25 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68-72°C. The method uses several restriction receptors to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

30 Another method which can be used is capture PCR, which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial

chromosome DNA (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic. 1*, 111-119, 1991). In this method, multiple restriction receptor digestions and ligations also can be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown fragment of the DNA molecule before performing PCR.

5

Another method which can be used to retrieve unknown sequences is that of Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res. 19*, 3055-3060, 1991). Additionally, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) can be used to walk genomic DNA (CLONTECH, Palo Alto, Calif.). This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

10

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

15

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

20

25

Obtaining Polypeptides

5 Human chemokine-like receptor polypeptides can be obtained, for example, by purification from human cells, by expression of chemokine-like receptor poly-
nucleotides, or by direct chemical synthesis.

Protein Purification

10 Human chemokine-like receptor polypeptides can be purified from any cell which expresses the receptor, including host cells which have been transfected with chemokine-like receptor expression constructs. A purified chemokine-like receptor polypeptide is separated from other compounds which normally associate with the chemokine-like receptor polypeptide in the cell, such as certain proteins, carbohydrates, or lipids, using methods well-known in the art. Such methods include, but are not limited to, size exclusion chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and preparative gel electrophoresis. A preparation of purified chemokine-like receptor polypeptides is at least 80% pure; preferably, the preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the
15 preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-
20 polyacrylamide gel electrophoresis.

Expression of Polynucleotides

25 To express a chemokine-like receptor polynucleotide, the polynucleotide can be inserted into an expression vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding chemokine-like receptor polypeptides and appropriate
30 transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic re-

combination. Such techniques are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989) and in Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

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

15 The control elements or regulatory sequences are those non-translated regions of the vector -- enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions -- which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in
20 bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, Calif.) or pSPORT1 plasmid (Life Technologies) and the like can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO, and storage protein genes) or from plant viruses (e.g.,
25 viral promoters or leader sequences) can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of a nucleotide sequence encoding a chemokine-like receptor polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

Bacterial and Yeast Expression Systems

In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the chemokine-like receptor polypeptide. For example, when a 5 large quantity of a chemokine-like receptor polypeptide is needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, multi-functional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene). In a BLUESCRIPT vector, a sequence encoding the chemokine-like receptor polypeptide can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal 10 Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced. pIN vectors (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) or pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) also can be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In 15 general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

20 In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. For reviews, see Ausubel *et al.* (1989) and Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

25 Plant and Insect Expression Systems

If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding chemokine-like receptor polypeptides can be driven by any of a number of promoters. 30 For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV

(Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters can be used (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). These constructs can be introduced 5 into plant cells by direct DNA transformation or by pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (e.g., Hobbs or Murray, in *MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY*, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

10 An insect system also can be used to express a chemokine-like receptor polypeptide. For example, in one such system *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. Sequences encoding chemokine-like receptor polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, 15 and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of chemokine-like receptor polypeptides will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to infect *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which chemokine-like receptor polypeptides can be expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 20 3224-3227, 1994).

Mammalian Expression Systems

A number of viral-based expression systems can be used to express chemokine-like 25 receptor polypeptides in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding chemokine-like receptor polypeptides can be ligated into an adenovirus transcription/translation complex comprising the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus 30 which is capable of expressing a chemokine-like receptor polypeptide in infected host cells (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). If desired,

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

5 Human artificial chromosomes (HACs) also can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid. HACs of 6M to 10M are constructed and delivered to cells via conventional delivery methods (e.g., liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles).

10 Specific initiation signals also can be used to achieve more efficient translation of sequences encoding chemokine-like receptor polypeptides. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding a chemokine-like receptor polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding 15 sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals (including the ATG initiation codon) should be provided. The initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the 20 inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used (see Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

Host Cells

25 A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed chemokine-like receptor polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. 30 Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic

mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38), are available from the American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

5

Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant proteins. For example, cell lines which stably express chemokine-like receptor polypeptides can be transformed using expression vectors which can contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells can be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium before they are switched to a selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced chemokine-like receptor sequences. Resistant clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type. See, for example, ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986.

10

Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines.

20

These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980) genes which can be employed in *tk* or *aprl* cells, respectively. Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *npt* confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981), and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotriien acetyltransferase, respectively (Murray, 1992, *supra*). Additional selectable genes have been described. For example, *trpB* allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine

25

30

(Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Visible markers such as anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, can be used to identify transformants and to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system 5 (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

Detecting Expression

10 Although the presence of marker gene expression suggests that the chemokine-like receptor polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding a chemokine-like receptor polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences which encode a chemokine-like receptor polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in 15 tandem with a sequence encoding a chemokine-like receptor polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the chemokine-like receptor polynucleotide.

20 Alternatively, host cells which contain a chemokine-like receptor polynucleotide and which express a chemokine-like receptor polypeptide can be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or 25 immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein. For example, the presence of a polynucleotide sequence encoding a chemokine-like receptor polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or fragments or fragments of polynucleotides encoding a chemokine-like receptor polypeptide. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of 30 oligonucleotides selected from sequences encoding a chemokine-like receptor poly-

peptide to detect transformants which contain a chemokine-like receptor polynucleotide.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of a chemokine-like receptor polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include receptor-linked immuno-sorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay using monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a chemokine-like receptor polypeptide can be used, or a competitive binding assay can be employed. These and other assays are described in Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) and Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

15 A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to 20 polynucleotides encoding chemokine-like receptor polypeptides include oligo-labeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, sequences encoding a chemokine-like receptor polypeptide 25 can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of labeled nucleotides and an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Suitable reporter molecules or labels which can be used for ease of detection include radionuclides, receptors, and fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

Expression and Purification of Polypeptides

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding a chemokine-like receptor polypeptide can be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The polypeptide produced by a transformed cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode chemokine-like receptor polypeptides can be designed to contain signal sequences which direct secretion of soluble chemokine-like receptor polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane or which direct the membrane insertion of membrane-bound chemokine-like receptor polypeptide.

As discussed above, other constructions can be used to join a sequence encoding a chemokine-like receptor polypeptide to a nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAgs extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor Xa or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the chemokine-like receptor polypeptide also can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a chemokine-like receptor polypeptide and 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification by IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography, as described in Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the chemokine-like receptor polypeptide from the fusion protein. Vectors which contain fusion proteins are disclosed in Kroll *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, 1993.

Chemical Synthesis

Sequences encoding a chemokine-like receptor polypeptide can be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.* *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternatively, a chemokine-like receptor polypeptide itself can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Optionally, fragments of chemokine-like receptor polypeptides can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic chemokine-like receptor polypeptide can be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; *see* Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the chemokine-like receptor polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion protein.

Production of Altered Polypeptides

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce chemokine-like receptor polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular

prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

5

The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter chemokine-like receptor polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

10

Antibodies

15

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of a chemokine-like receptor polypeptide. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of a chemokine-like receptor polypeptide. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids.

20

An antibody which specifically binds to an epitope of a chemokine-like receptor polypeptide can be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, such as Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Various immunoassays can be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well

25

30

known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between an immunogen and an antibody which specifically binds to the immunogen.

5 Typically, an antibody which specifically binds to a chemokine-like receptor polypeptide provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to chemokine-like polypeptides do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a 10 chemokine-like receptor polypeptide from solution.

Human chemokine-like receptor polypeptides can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, a chemokine-like receptor polypeptide can be conjugated to a 15 carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g. lyssolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, 20 keyhole limpet hemocyanin, and dimitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

Monoclonal antibodies which specifically bind to a chemokine-like receptor polypeptide can be prepared using any technique which provides for the production of 25 antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies which specifically bind to a chemokine-like receptor polypeptide can contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. 5,565,332.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which specifically bind to chemokine-like receptor polypeptides. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

Single-chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Single-chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single-chain antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

5 A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology (Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

10 Antibodies which specifically bind to chemokine-like receptor polypeptides also can be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

15 Other types of antibodies can be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies can be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multispecific, such as the "diabodies" described in WO 94/13804, also can be prepared.

20 Antibodies according to the invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to which a chemokine-like receptor polypeptide is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

25 Antisense Oligonucleotides

30 Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form complexes and block either transcription or translation. Preferably, an antisense oligonucleotide

is at least 11 nucleotides in length, but can be at least 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 or more nucleotides long. Longer sequences also can be used. Antisense oligonucleotide molecules can be provided in a DNA construct and introduced into a cell as described above to decrease the level of chemokine-like receptor gene products in the cell.

5 Antisense oligonucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or a combination of both. Oligonucleotides can be synthesized manually or by an automated synthesizer, by covalently linking the 5' end of one nucleotide with the 3' end of another nucleotide with non-phosphodiester internucleotide linkages such alkyl-phosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates, alkylphosphonothioates, alkylphosphonates, phosphoramidates, phosphate esters, carbamates, acetamide, carboxymethyl esters, carbonates, and phosphate triesters. *See* Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

10 Modifications of chemokine-like receptor gene expression can be obtained by designing antisense oligonucleotides which will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the chemokine-like receptor gene. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, *e.g.*, between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have 15 been described in the literature (*e.g.*, Gee *et al.*, in Huber & Carr, *MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). An antisense oligonucleotide also can be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

20 25 30 Precise complementarity is not required for successful complex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of a chemokine-like

receptor polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to a chemokine-like receptor polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent chemokine-like receptor nucleotides, can provide sufficient targeting specificity for chemokine-like receptor mRNA. Preferably, each stretch of complementary contiguous nucleotides is at least 4, 5, 6, 7, or 8 or more nucleotides in length. Non-complementary intervening sequences are preferably 1, 2, 3, or 4 nucleotides in length. One skilled in the art can easily use the calculated melting point of an antisense-sense pair to determine the degree of mismatching which will be tolerated between a particular antisense oligonucleotide and a particular chemokine-like receptor polynucleotide sequence.

Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to a chemokine-like receptor polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, inter-nucleoside phosphate linkages can be modified by adding cholesteryl or diamine moieties with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Modified bases and/or sugars, such as arabinose instead of ribose, or a 3', 5'-substituted oligonucleotide in which the 3' hydroxyl group or the 5' phosphate group are substituted, also can be employed in a modified antisense oligonucleotide. These modified oligonucleotides can be prepared by methods well known in the art. *See, e.g., Agrawal et al., Trends Biotechnol. 10, 152-158, 1992; Uhlmann et al., Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmann et al., Tetrahedron Lett. 215, 3539-3542, 1987.*

Ribozymes

Ribozymes are RNA molecules with catalytic activity. *See, e.g., Cech, Science 236, 1532-1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543-568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510-515,*

1996. Ribozymes can be used to inhibit gene function by cleaving an RNA sequence, as is known in the art (e.g., Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage.

5 Examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of specific nucleotide sequences.

The coding sequence of a chemokine-like receptor polynucleotide can be used to generate ribozymes which will specifically bind to mRNA transcribed from the chemokine-like receptor polynucleotide. Methods of designing and constructing ribozymes which can cleave other RNA molecules in trans in a highly sequence specific manner have been developed and described in the art (see Haseloff *et al.* *Nature* 334, 585-591, 1988). For example, the cleavage activity of ribozymes can be targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. The hybridization region contains a sequence complementary to the target RNA and thus specifically hybridizes with the target (see, for example, Gerlach *et al.*, EP 321,201).

10 Specific ribozyme cleavage sites within a chemokine-like receptor RNA target can be identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target RNA containing the cleavage site can be evaluated for secondary structural features which may render the target inoperable. Suitability of candidate chemokine-like receptor RNA targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. Longer complementary sequences can be used to increase the affinity of the hybridization sequence for the target. The hybridizing and cleavage regions of the ribozyme can be integrally related such that upon hybridizing to the target RNA

15

20

25

30

through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

5 Ribozymes can be introduced into cells as part of a DNA construct. Mechanical methods, such as microinjection, liposome-mediated transfection, electroporation, or calcium phosphate precipitation, can be used to introduce a ribozyme-containing DNA construct into cells in which it is desired to decrease chemokine-like receptor expression. Alternatively, if it is desired that the cells stably retain the DNA construct, the construct can be supplied on a plasmid and maintained as a separate 10 element or integrated into the genome of the cells, as is known in the art. A ribozyme-encoding DNA construct can include transcriptional regulatory elements, such as a promoter element, an enhancer or UAS element, and a transcriptional terminator signal, for controlling transcription of ribozymes in the cells.

15 As taught in Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, ribozymes can be engineered so that ribozyme expression will occur in response to factors which induce expression of a target gene. Ribozymes also can be engineered to provide an additional level of regulation, so that destruction of mRNA occurs only when both a ribozyme and a target gene are induced in the cells.

20

Differentially Expressed Genes

25 Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human chemokine-like receptor. Such genes may represent genes which are differentially expressed in disorders including, but not limited to, HIV infection, cardiovascular disorders, asthma and COPD. Further, such genes may represent genes which are differentially regulated in response to manipulations relevant to the progression or treatment of such diseases. Additionally, such genes may have a temporally modulated expression, increased or decreased at different stages of tissue 30 or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the

human chemokine-like receptor gene or gene product may itself be tested for differential expression.

The degree to which expression differs in a normal versus a diseased state need only 5 be large enough to be visualized via standard characterization techniques such as differential display techniques. Other such standard characterization techniques by which expression differences may be visualized include but are not limited to, quantitative RT (reverse transcriptase), PCR, and Northern analysis.

10 Identification of Differentially Expressed Genes

To identify differentially expressed genes total RNA or, preferably, mRNA is isolated from tissues of interest. For example, RNA samples are obtained from tissues of experimental subjects and from corresponding tissues of control subjects.

15 Any RNA isolation technique which does not select against the isolation of mRNA may be utilized for the purification of such RNA samples. See, for example, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Large numbers of tissue samples may readily be processed using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, the 20 single-step RNA isolation process of Chomczynski, U.S. Patent 4,843,155.

Transcripts within the collected RNA samples which represent RNA produced by differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill 25 in the art. They include, for example, differential screening (Tedder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988), subtractive hybridization (Hedrick *et al.*, *Nature* 308, 149-53; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984), and, preferably, differential display (Liang & Pardee, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311).

30 The differential expression information may itself suggest relevant methods for the treatment of disorders involving the human chemokine-like receptor. For example,

5 treatment may include a modulation of expression of the differentially expressed genes and/or the gene encoding the human chemokine-like receptor. The differential expression information may indicate whether the expression or activity of the differentially expressed gene or gene product or the human chemokine-like receptor gene or gene product are up-regulated or down-regulated.

Screening Methods

10 The invention provides assays for screening test compounds which bind to or modulate the activity of a chemokine-like receptor polypeptide or a chemokine-like receptor polynucleotide. A test compound preferably binds to a chemokine-like receptor polypeptide or polynucleotide. More preferably, a test compound decreases or increases chemokine-like by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the test compound.

15

Test Compounds

20 Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be compounds previously unknown to have any pharmacological activity. The compounds can be naturally occurring or designed in the laboratory. They can be isolated from microorganisms, animals, or plants, and can be produced recombinantly, or synthesized by chemical methods known in the art. If desired, test compounds can be obtained using any of the numerous combinatorial library methods known in the art, including but not limited to, biological libraries, spatially 25 addressable parallel solid phase or solution phase libraries, synthetic library methods requiring deconvolution, the "one-bead one-compound" library method, and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of 30 compounds. *See* Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Methods for the synthesis of molecular libraries are well known in the art (see, for example, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6909, 1993; Erb *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* **37**, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* **261**, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* **37**, 1233, 1994). Libraries of compounds can be presented in solution (see, e.g., Houghten, *BioTechniques* **13**, 412-421, 1992), or on beads (Lam, *Nature* **354**, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* **364**, 555-556, 1993), bacteria or spores (Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plasmids (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1865-1869, 1992), or phage (Scott & Smith, *Science* **249**, 386-390, 1990; Devlin, *Science* **249**, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* **222**, 301-310, 1991; and Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

High Throughput Screening

15 Test compounds can be screened for the ability to bind to chemokine-like receptor polypeptides or polynucleotides or to affect chemokine-like receptor activity or chemokine-like receptor gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested in parallel so that 20 large numbers of test compounds can be quickly screened. The most widely established techniques utilize 96-well microtiter plates. The wells of the microtiter plates typically require assay volumes that range from 50 to 500 μ l. In addition to the plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

25 Alternatively, "free format assays," or assays that have no physical barrier between samples, can be used. For example, an assay using pigment cells (melanocytes) in a simple homogeneous assay for combinatorial peptide libraries is described by Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1614-18 (1994). The cells are 30 placed under agarose in petri dishes, then beads that carry combinatorial compounds are placed on the surface of the agarose. The combinatorial compounds are partially

released the compounds from the beads. Active compounds can be visualized as dark pigment areas because, as the compounds diffuse locally into the gel matrix, the active compounds cause the cells to change colors.

5 Another example of a free format assay is described by Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," reported at the First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky placed a simple homogenous receptor assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the receptor in the gel
10 would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the compounds were partially released by UV-light. Compounds that inhibited the receptor were observed as local zones of inhibition having less color change.

15 Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). In this example, combinatorial libraries were screened for compounds that had cytotoxic effects on cancer cells growing in agar.

Another high throughput screening method is described in Beutel *et al.*, U.S. Patent
20 5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more assay components are then placed within, on top of, or at the bottom of a matrix such as a gel, a plastic sheet, a filter, or other form of easily manipulated solid support. When samples are introduced to the porous matrix they diffuse sufficiently slowly, such that the assays can be performed without the test samples running together.

25 Binding Assays

For binding assays, the test compound is preferably a small molecule which binds to and occupies, for example, the active site of the chemokine-like receptor polypeptide,
30 such that normal biological activity is prevented. Examples of such small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules.

In binding assays, either the test compound or the chemokine-like receptor polypeptide can comprise a detectable label, such as a fluorescent, radioisotopic, chemiluminescent, or enzymatic label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase. Detection of a test compound which is bound to the chemokine-like receptor polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radioemission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

10 Alternatively, binding of a test compound to a chemokine-like receptor polypeptide can be determined without labeling either of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect binding of a test compound with a chemokine-like receptor polypeptide. A microphysiometer (e.g., Cytosensor™) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a test compound and a chemokine-like receptor polypeptide (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

15 20 Determining the ability of a test compound to bind to a chemokine-like receptor polypeptide also can be accomplished using a technology such as real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any 25 of the interactants (e.g., BIACore™). Changes in the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

25 In yet another aspect of the invention, a chemokine-like receptor polypeptide can be used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.*

268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; and Brent W094/10300), to identify other proteins which bind to or interact with the chemokine-like receptor polypeptide and modulate its activity.

5

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. For example, in one construct, polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide can be fused to a polynucleotide encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct a DNA sequence that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") can be fused to a polynucleotide that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo* to form an protein-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ), which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected, and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the DNA sequence encoding the protein which interacts with the chemokine-like receptor polypeptide.

25 It may be desirable to immobilize either the chemokine-like receptor polypeptide (or polynucleotide) or the test compound to facilitate separation of bound from unbound forms of one or both of the interactants, as well as to accommodate automation of the assay. Thus, either the chemokine-like receptor polypeptide (or polynucleotide) or the test compound can be bound to a solid support. Suitable solid supports include, but are not limited to, glass or plastic slides, tissue culture plates, microtiter wells, tubes, silicon chips, or particles such as beads (including, but not limited to, latex, polystyrene, or glass beads). Any method known in the art can be used to attach the receptor polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent linkages, passive absorption, or pairs of

30

binding moieties attached respectively to the polypeptide (or polynucleotide) or test compound and the solid support. Test compounds are preferably bound to the solid support in an array, so that the location of individual test compounds can be tracked. Binding of a test compound to a chemokine-like receptor polypeptide (or polynucleotide) can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and microcentrifuge tubes.

In one embodiment, the chemokine-like receptor polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the chemokine-like receptor polypeptide to be bound to a solid support. For example, glutathione-S-transferase fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and the non-adsorbed chemokine-like receptor polypeptide; the mixture is then incubated under conditions conducive to complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components. Binding of the interactants can be determined either directly or indirectly, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the solid support before binding is determined.

Other techniques for immobilizing proteins or polynucleotides on a solid support also can be used in the screening assays of the invention. For example, either a chemokine-like receptor polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated chemokine-like receptor polypeptides (or polynucleotides) or test compounds can be prepared from biotin-NHS(N-hydroxysuccinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to a chemokine-like receptor polypeptide, polynucleotide, or a test compound, but which do not interfere with a desired binding

site, such as the active site of the chemokine-like receptor polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

5 Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies which specifically bind to the chemokine-like receptor polypeptide or test compound, receptor-linked assays which rely on detecting an activity of the chemokine-like receptor polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

10 Screening for test compounds which bind to a chemokine-like receptor polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises a chemokine-like receptor polypeptide or polynucleotide can be used in a cell-based assay system. A chemokine-like receptor polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Binding of the test compound to a chemokine-like receptor polypeptide or polynucleotide is determined as described above.

15 20 *Functional Assays*

Test compounds can be tested for the ability to increase or decrease a biological effect of an chemokine polypeptide. Such biological effects can be determined using the functional assays described in the specific examples, below. Functional assays 25 can be carried out after contacting either a purified polypeptide, a cell membrane preparation, or an intact cell with a test compound. A test compound which decreases a functional activity of an chemokine by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential agent for decreasing chemokine. A test compound which increases chemokine activity by at 30 least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential agent for increasing chemokine.

Gene Expression

In another embodiment, test compounds which increase or decrease chemokine-like receptor gene expression are identified. A chemokine-like receptor polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the chemokine-like receptor polynucleotide is determined. The level of expression of appropriate mRNA or polypeptide in the presence of the test compound is compared to the level of expression of mRNA or polypeptide in the absence of the test compound. The test compound can then be identified as a modulator of expression based on this comparison. For example, when expression of mRNA or polypeptide is greater in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as a stimulator or enhancer of the mRNA or polypeptide expression. Alternatively, when expression of the mRNA or polypeptide is less in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of the mRNA or polypeptide expression.

The level of chemokine-like receptor mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods well known in the art for detecting mRNA or polypeptide. Either qualitative or quantitative methods can be used. The presence of polypeptide products of a chemokine-like receptor polynucleotide can be determined, for example, using a variety of techniques known in the art, including immunochemical methods such as radioimmunoassay, Western blotting, and immunohistochemistry. Alternatively, polypeptide synthesis can be determined *in vivo*, in a cell culture, or in an *in vitro* translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into a chemokine-like receptor polypeptide.

Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell which expresses a chemokine-like receptor polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The chemokine-like receptor polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those

described above. Either a primary culture or an established cell line, such as CHO or human embryonic kidney 293 cells, can be used.

Pharmaceutical Compositions

5

The invention also provides pharmaceutical compositions which can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of the invention can comprise, for example, a chemokine-like receptor polypeptide, chemokine-like receptor polynucleotide, ribozymes or antisense oligonucleotides, antibodies which specifically bind to a chemokine-like receptor polypeptide, or mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of a chemokine-like receptor polypeptide activity. The compositions can be administered alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which can be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or hormones.

10

In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Pharmaceutical compositions of the invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrahepatic, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, parenteral, topical, sublingual, or rectal means. Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

15

20

25

30

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

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

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions can contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspen-

sions of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Non-lipid polycationic amino polymers also can be used for delivery. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

10

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a manner that is known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The pharmaceutical composition can be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.

15

20

25

Further details on techniques for formulation and administration can be found in the latest edition of REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. Such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

Therapeutic Indications and Methods

Human chemokine-like receptor can be regulated to treat HIV infection, cardiovascular diseases, asthma and COPD.

5

Cardiovascular diseases include the following disorders of the heart and the vascular system: congestive heart failure, myocardial infarction, ischemic diseases of the heart, all kinds of atrial and ventricular arrhythmias, hypertensive vascular diseases, and peripheral vascular diseases.

10

Heart failure is defined as a pathophysiologic state in which an abnormality of cardiac function is responsible for the failure of the heart to pump blood at a rate commensurate with the requirement of the metabolizing tissue. It includes all forms of pumping failure, such as high-output and low-output, acute and chronic, right-sided or left-sided, systolic or diastolic, independent of the underlying cause.

15

Myocardial infarction (MI) is generally caused by an abrupt decrease in coronary blood flow that follows a thrombotic occlusion of a coronary artery previously narrowed by arteriosclerosis. MI prophylaxis (primary and secondary prevention) is included, as well as the acute treatment of MI and the prevention of complications.

20

Ischemic diseases are conditions in which the coronary flow is restricted resulting in a perfusion which is inadequate to meet the myocardial requirement for oxygen. This group of diseases includes stable angina, unstable angina, and asymptomatic ischemia.

25

Arrhythmias include all forms of atrial and ventricular tachyarrhythmias (atrial tachycardia, atrial flutter, atrial fibrillation, atrio-ventricular reentrant tachycardia, preexcitation syndrome, ventricular tachycardia, ventricular flutter, and ventricular fibrillation), as well as bradycardic forms of arrhythmias.

30

Vascular diseases include primary as well as all kinds of secondary arterial hypertension (renal, endocrine, neurogenic, others). The disclosed gene and its product may be used as drug targets for the treatment of hypertension as well as for the prevention of all complications. Peripheral vascular diseases are defined as 5 vascular diseases in which arterial and/or venous flow is reduced resulting in an imbalance between blood supply and tissue oxygen demand. It includes chronic peripheral arterial occlusive disease (PAOD), acute arterial thrombosis and embolism, inflammatory vascular disorders, Raynaud's phenomenon, and venous disorders.

10

Allergy is a complex process in which environmental antigens induce clinically adverse reactions. The inducing antigens, called allergens, typically elicit a specific IgE response and, although in most cases the allergens themselves have little or no intrinsic toxicity, they induce pathology when the IgE response in turn elicits an 15 IgE-dependent or T cell-dependent hypersensitivity reaction. Hypersensitivity reactions can be local or systemic and typically occur within minutes of allergen exposure in individuals who have previously been sensitized to an allergen. The hypersensitivity reaction of allergy develops when the allergen is recognized by IgE antibodies bound to specific receptors on the surface of effector cells, such as mast 20 cells, basophils, or eosinophils, which causes the activation of the effector cells and the release of mediators that produce the acute signs and symptoms of the reactions. Allergic diseases include asthma, allergic rhinitis (hay fever), atopic dermatitis, and anaphylaxis.

25

Asthma is thought to arise as a result of interactions between multiple genetic and environmental factors and is characterized by three major features: 1) intermittent and reversible airway obstruction caused by bronchoconstriction, increased mucus production, and thickening of the walls of the airways that leads to a narrowing of the airways, 2) airway hyperresponsiveness caused by a decreased control of airway 30 caliber, and 3) airway inflammation. Certain cells are critical to the inflammatory reaction of asthma and they include T cells and antigen presenting cells, B cells that

produce IgE, and mast cells, basophils, eosinophils, and other cells that bind IgE. These effector cells accumulate at the site of allergic reaction in the airways and release toxic products that contribute to the acute pathology and eventually to the tissue destruction related to the disorder. Other resident cells, such as smooth muscle cells, lung epithelial cells, mucus-producing cells, and nerve cells may also be abnormal in individuals with asthma and may contribute to the pathology. While the airway obstruction of asthma, presenting clinically as an intermittent wheeze and shortness of breath, is generally the most pressing symptom of the disease requiring immediate treatment, the inflammation and tissue destruction associated with the disease can lead to irreversible changes that eventually make asthma a chronic disabling disorder requiring long-term management.

Despite recent important advances in our understanding of the pathophysiology of asthma, the disease appears to be increasing in prevalence and severity (Gergen and Weiss, *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 823-24, 1992). It is estimated that 30-40% of the population suffer with atopic allergy, and 15% of children and 5% of adults in the population suffer from asthma (Gergen and Weiss, 1992). Thus, an enormous burden is placed on our health care resources. However, both diagnosis and treatment of asthma are difficult. The severity of lung tissue inflammation is not easy to measure and the symptoms of the disease are often indistinguishable from those of respiratory infections, chronic respiratory inflammatory disorders, allergic rhinitis, or other respiratory disorders. Often, the inciting allergen cannot be determined, making removal of the causative environmental agent difficult. Current pharmacological treatments suffer their own set of disadvantages. Commonly used therapeutic agents, such as beta activators, can act as symptom relievers to transiently improve pulmonary function, but do not affect the underlying inflammation. Agents that can reduce the underlying inflammation, such as anti-inflammatory steroids, can have major drawbacks that range from immunosuppression to bone loss (Goodman and Gilman's *THE PHARMACOLOGIC BASIS OF THERAPEUTICS*, Seventh Edition, MacMillan Publishing Company, NY, USA, 1985). In addition, many of the present therapies, such as inhaled corticosteroids, are short-lasting, inconvenient to use, and

must be used often on a regular basis, in some cases for life, making failure of patients to comply with the treatment a major problem and thereby reducing their effectiveness as a treatment.

5 Because of the problems associated with conventional therapies, alternative treatment strategies have been evaluated. Glycophorin A (Chu and Sharom, *Cell. Immunol.* 145, 223-39, 1992), cyclosporin (Alexander *et al.*, *Lancet* 339, 324-28, 1992), and a nonapeptide fragment of IL-2 (Zav'yalov *et al.*, *Immunol. Lett.* 31, 285-88, 1992) all inhibit interleukin-2 dependent T lymphocyte proliferation; however, they are known
10 to have many other effects. For example, cyclosporin is used as a immunosuppressant after organ transplantation. While these agents may represent alternatives to steroids in the treatment of asthmatics, they inhibit interleukin-2 dependent T lymphocyte proliferation and potentially critical immune functions associated with homeostasis. Other treatments that block the release or activity of mediators of
15 bronchoconstriction, such as cromones or anti-leukotrienes, have recently been introduced for the treatment of mild asthma, but they are expensive and not effective in all patients and it is unclear whether they have any effect on the chronic changes associated with asthmatic inflammation. What is needed in the art is the identification of a treatment that can act in pathways critical to the development of
20 asthma that both blocks the episodic attacks of the disorder and preferentially dampens the hyperactive allergic immune response without immunocompromising the patient.

25 Chronic obstructive pulmonary (or airways) disease (COPD) is a condition defined physiologically as airflow obstruction that generally results from a mixture of emphysema and peripheral airway obstruction due to chronic bronchitis (Senior & Shapiro, *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3d ed., New York, McGraw-Hill, 1998, pp. 659-681, 1998; Barnes, *Chest* 117, 10S-14S, 2000). Emphysema is characterized by destruction of alveolar walls leading to abnormal enlargement of the air spaces of
30 the lung. Chronic bronchitis is defined clinically as the presence of chronic productive cough for three months in each of two successive years. In COPD,

airflow obstruction is usually progressive and is only partially reversible. By far the most important risk factor for development of COPD is cigarette smoking, although the disease does occur in non-smokers.

5 Chronic inflammation of the airways is a key pathological feature of COPD (Senior & Shapiro, 1998). The inflammatory cell population comprises increased numbers of macrophages, neutrophils, and CD8⁺ lymphocytes. Inhaled irritants, such as cigarette smoke, activate macrophages which are resident in the respiratory tract, as well as epithelial cells leading to release of chemokines (e.g., interleukin-8) and other chemotactic factors. These chemotactic factors act to increase the neutrophil/monocyte trafficking from the blood into the lung tissue and airways. Neutrophils and monocytes recruited into the airways can release a variety of potentially damaging mediators such as proteolytic enzymes and reactive oxygen species. Matrix degradation and emphysema, along with airway wall thickening, surfactant dysfunction, and mucus hypersecretion, all are potential sequelae of this inflammatory response that lead to impaired airflow and gas exchange.

10

15

Several GPCRs have been implicated in the pathology of COPD. For example, the chemokine IL-8 acts through CXCR1 and CXCR2, and antagonists for these receptors are under investigation as therapeutics for COPD. Members of the P2Y family of metabotropic receptors may play key roles in normal pulmonary function. In particular, the P2Y₂ receptor is believed to be involved in the regulation of mucociliary clearance mechanisms in the lung, and agonists of this receptor may stimulate airway mucus clearance in patients with chronic bronchitis (Yerxa Johnson, 20 *Drugs of the Future* 24, 759-769, 1999). GPCRs, therefore, are therapeutic targets for COPD, and the identification of additional members of existing GPCR families or of novel GPCRs would yield further attractive targets.

25 This invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening assays described above. Accordingly, it is within the scope of this invention to use a test compound identified as described herein in an appropriate animal model. For

30

example, an agent identified as described herein (e.g., a modulating agent, an antisense nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or a chemokine-like receptor polypeptide binding molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, 5 an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

10 A reagent which affects chemokine-like receptor activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce chemokine-like receptor activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human chemokine-like receptor gene. If the expression product is a protein, the reagent is preferably an antibody. For treatment of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a 15 preparation of stem cells which have been removed from the body. The cells can then be replaced in the same or another human body, with or without clonal propagation, as is known in the art.

20 In one embodiment, the reagent is delivered using a liposome. Preferably, the liposome is stable in the animal into which it has been administered for at least about 30 minutes, more preferably for at least about 1 hour, and even more preferably for at least about 24 hours. A liposome comprises a lipid composition that is capable of targeting a reagent, particularly a polynucleotide, to a particular site in an animal, such as a human. Preferably, the lipid composition of the liposome is capable of 25 targeting to a specific organ of an animal, such as the lung, liver, spleen, heart brain, lymph nodes, and skin.

30 A liposome useful in the present invention comprises a lipid composition that is capable of fusing with the plasma membrane of the targeted cell to deliver its contents to the cell. Preferably, the transfection efficiency of a liposome is about 0.5 μ g of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, more

5 preferably about 1.0 μ g of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, and even more preferably about 2.0 μ g of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about 10^6 cells. Preferably, a liposome is between about 100 and 500 nm, more preferably between about 150 and 450 nm, and even more preferably between about 200 and 400 nm in diameter.

10 Suitable liposomes for use in the present invention include those liposomes standardly used in, for example, gene delivery methods known to those of skill in the art. More preferred liposomes include liposomes having a polycationic lipid composition and/or liposomes having a cholesterol backbone conjugated to polyethylene glycol. Optionally, a liposome comprises a compound capable of targeting the liposome to a particular cell type, such as a cell-specific ligand exposed on the outer surface of the liposome.

15 Complexing a liposome with a reagent such as an antisense oligonucleotide or ribozyme can be achieved using methods which are standard in the art (see, for example, U.S. Patent 5,705,151). Preferably, from about 0.1 μ g to about 10 μ g of polynucleotide is combined with about 8 nmol of liposomes, more preferably from about 0.5 μ g to about 5 μ g of polynucleotides are combined with about 8 nmol liposomes, and even more preferably about 1.0 μ g of polynucleotides is combined with about 8 nmol liposomes.

20 In another embodiment, antibodies can be delivered to specific tissues *in vivo* using receptor-mediated targeted delivery. Receptor-mediated DNA delivery techniques are taught in, for example, Findciss *et al.* *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

Determination of a Therapeutically Effective Dose

5 The determination of a therapeutically effective dose is well within the capability of those skilled in the art. A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient which increases or decreases chemokine-like receptor activity relative to the chemokine-like receptor activity which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

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

15 Therapeutic efficacy and toxicity, e.g., ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population), can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD₅₀/ED₅₀.

20 Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with 25 little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

30 The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active ingredient or to maintain the desired effect. Factors which can be taken into account include the severity of the disease state,

5 general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

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

15 If the reagent is a single-chain antibody, polynucleotides encoding the antibody can be constructed and introduced into a cell either *ex vivo* or *in vivo* using well-established techniques including, but not limited to, transferrin-polycation-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated cellular fusion, intracellular transportation of DNA-coated latex beads, 20 protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.

25 Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 μ g to about 50 μ g/kg, about 50 μ g to about 5 mg/kg, about 100 μ g to about 500 μ g/kg of patient body weight, and about 200 to about 250 μ g/kg of patient body weight. For administration of polynucleotides encoding single-chain antibodies, effective *in vivo* dosages are in the range of about 100 ng to about 200 ng, 500 ng to about 50 mg, about 1 μ g to about 2 mg, about 5 μ g to about 500 μ g, and about 20 μ g to about 100 μ g of DNA.

If the expression product is mRNA, the reagent is preferably an antisense oligonucleotide or a ribozyme. Polynucleotides which express antisense oligonucleotides or ribozymes can be introduced into cells by a variety of methods, as described above.

5

Preferrably, a reagent reduces expression of a chemokine-like receptor gene or the activity of a chemokine-like receptor polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the reagent. The effectiveness of the mechanism chosen to decrease the level of expression of a chemokine-like receptor gene or the activity of a chemokine-like receptor polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to chemokine-like receptor-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of a chemokine-like receptor polypeptide, or measurement of chemokine-like receptor activity.

10

In any of the embodiments described above, any of the pharmaceutical compositions of the invention can be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

15

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

20

25

Diagnostic Methods

Human chemokine-like receptor also can be used in diagnostic assays for detecting diseases and abnormalities or susceptibility to diseases and abnormalities related to the presence of mutations in the nucleic acid sequences which encode the receptor. For example, differences can be determined between the cDNA or genomic sequence encoding chemokine-like receptor in individuals afflicted with a disease and in normal individuals. If a mutation is observed in some or all of the afflicted individuals but not in normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

Sequence differences between a reference gene and a gene having mutations can be revealed by the direct DNA sequencing method. In addition, cloned DNA segments can be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this method is greatly enhanced when combined with PCR. For example, a sequencing primer can be used with a double-stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures using radiolabeled nucleotides or by automatic sequencing procedures using fluorescent tags.

Genetic testing based on DNA sequence differences can be carried out by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized, for example, by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences can be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (see, e.g., Myers *et al.*, *Science* 230, 1242, 1985). Sequence changes at specific locations can also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S 1 protection or the chemical cleavage method (e.g., Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4397-4401, 1985). Thus, the detection of a specific DNA sequence can be performed

by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction receptors and Southern blotting of genomic DNA. In addition to direct methods such as gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

5

Altered levels of a chemokine-like receptor also can be detected in various tissues. Assays used to detect levels of the receptor polypeptides in a body sample, such as blood or a tissue biopsy, derived from a host are well known to those of skill in the art and include radioimmunoassays, competitive binding assays, Western blot analysis, and ELISA assays.

10

All patents and patent applications cited in this disclosure are expressly incorporated herein by reference. The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following 15 specific examples which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

20

Detection of chemokine-like receptor activity

25

The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 is inserted into the expression vector pCEV4 and the expression vector pCEV4-chemokine-like receptor polypeptide obtained is transfected into human embryonic kidney 293 cells. From these cells extracts are obtained and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant is centrifuged at 30,000 x g for 20 minutes at 4°C. The pellet is suspended in binding buffer containing 50 mM Tris HCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5, supplemented with 0.1 % BSA, 2 µg/ml aprotinin, 0.5 mg/ml leupeptin, and 10 µg/ml phosphoramidon. Optimal membrane suspension dilutions, defined as the 30 protein concentration required to bind less than 10% of the added radioligand, i.e.

chemokine, are added to 96-well polypropylene microtiter plates containing ^{125}I -labeled ligand, non-labeled peptides, and binding buffer to a final volume of 250 μl .

5 In equilibrium saturation binding assays, membrane preparations are incubated in the presence of increasing concentrations (0.1 nM to 4 nM) of ^{125}I -labeled ligand.

10 Binding reaction mixtures are incubated for one hour at 30°C. The reaction is stopped by filtration through GF/B filters treated with 0.5% polyethyleneimine, using a cell harvester. Radioactivity is measured by scintillation counting, and data are analyzed by a computerized non-linear regression program.

15 Non-specific binding is defined as the amount of radioactivity remaining after incubation of membrane protein in the presence of 100 nM of unlabeled peptide. Protein concentration is measured by the Bradford method using Bio-Rad Reagent, with bovine serum albumin as a standard. It is shown that the polypeptide of SEQ ID NO: 2 has a chemokine-like receptor activity.

EXAMPLE 2

20 *Expression of recombinant human chemokine-like receptor*

25 The *Pichia pastoris* expression vector pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) is used to produce large quantities of recombinant human chemokine-like polypeptides in yeast. The chemokine-like receptor-encoding DNA sequence is derived from SEQ ID NO: 1, 4, or 5. Before insertion into vector pPICZB, the DNA sequence is modified by well known methods in such a way that it contains at its 5'-end an initiation codon and at its 3'-end an enterokinase cleavage site, a His6 reporter tag and a termination codon. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are added and after digestion of the multiple cloning site of pPICZ B with the corresponding restriction receptors the modified DNA sequence is ligated into pPICZB. This expression vector is designed for inducible expression in *Pichia*

pastoris, driven by a yeast promoter. The resulting pPICZ/md-His6 vector is used to transform the yeast.

The yeast is cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the recombinantly produced protein isolated from the culture by affinity chromatography (Ni-NTA-Resin) in the presence of 8 M urea. The bound polypeptide is eluted with buffer, pH 3.5, and neutralized. Separation of the polypeptide from the His6 reporter tag is accomplished by site-specific proteolysis using enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions. Purified human chemokine-like receptor polypeptide is obtained.

EXAMPLE 3

Identification of test compounds that bind to chemokine-like receptor polypeptides

Purified chemokine-like receptor polypeptides comprising a glutathione-S-transferase protein and absorbed onto glutathione-derivatized wells of 96-well microtiter plates are contacted with test compounds from a small molecule library at pH 7.0 in a physiological buffer solution. Human chemokine-like receptor polypeptides comprise the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 7, or 8. The test compounds comprise a fluorescent tag. The samples are incubated for 5 minutes to one hour. Control samples are incubated in the absence of a test compound.

The buffer solution containing the test compounds is washed from the wells. Binding of a test compound to a chemokine-like receptor polypeptide is detected by fluorescence measurements of the contents of the wells. A test compound which increases the fluorescence in a well by at least 15% relative to fluorescence of a well in which a test compound is not incubated is identified as a compound which binds to a chemokine-like receptor polypeptide.

30

EXAMPLE 4

Identification of a test compound which decreases chemokine-like receptor gene expression

5

A test compound is administered to a culture of human cells transfected with a chemokine-like receptor expression construct and incubated at 37°C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells which have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control.

10

RNA is isolated from the two cultures as described in Chirgwin *et al.*, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979). Northern blots are prepared using 20 to 30 µg total RNA and hybridized with a ³²P-labeled chemokine-like receptor-specific probe at 65°C in Express-hyb (CLONTECH). The probe comprises at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO: 1. A test compound which decreases the chemokine-like receptor-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of chemokine-like receptor gene expression.

20

EXAMPLE 5

Identification of a test compound which decreases chemokine-like receptor activity

25

A test compound is administered to a culture of human cells transfected with a chemokine-like receptor expression construct and incubated at 37°C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells which have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control. Chemokine receptor activity is measured using the method of U.S. Patent 5,955,303.

A test compound which decreases the chemokine activity of the chemokine-like receptor relative to the chemokine activity in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of chemokine-like receptor activity.

5 **EXAMPLE 6***Tissue-specific expression of chemokine receptor-like protein*

To demonstrate that chemokine receptor-like protein is involved in the disease process of COPD, the initial expression panel consists of RNA samples from 10 respiratory tissues and inflammatory cells relevant to COPD: lung (adult and fetal), trachea, freshly isolated alveolar type II cells, cultured human bronchial epithelial cells, cultured small airway epithelial cells, cultured bronchial smooth muscle cells, cultured H441 cells (Clara-like), freshly isolated neutrophils and monocytes, and 15 cultured monocytes (macrophage-like). Body map profiling also is carried out, using total RNA panels purchased from Clontech. The tissues are adrenal gland, bone marrow, brain, colon, heart, kidney, liver, lung, mammary gland, pancreas, prostate, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spleen, stomach, testis, thymus, trachea, thyroid, and uterus.

20 *Quantitative expression profiling.* Quantitative expression profiling is performed by the form of quantitative PCR analysis called "kinetic analysis" firstly described in Higuchi *et al.*, *BioTechnology* 10, 413-17, 1992, and Higuchi *et al.*, *BioTechnology* 11, 1026-30, 1993. The principle is that at any given cycle within the exponential 25 phase of PCR, the amount of product is proportional to the initial number of template copies.

If the amplification is performed in the presence of an internally quenched 30 fluorescent oligonucleotide (TaqMan probe) complementary to the target sequence, the probe is cleaved by the 5'-3' endonuclease activity of Taq DNA polymerase and a fluorescent dye released in the medium (Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

88, 7276-80, 1991). Because the fluorescence emission will increase in direct proportion to the amount of the specific amplified product, the exponential growth phase of PCR product can be detected and used to determine the initial template concentration (Heid *et al.*, *Genome Res.* 6, 986-94, 1996, and Gibson *et al.*, *Genome Res.* 6, 995-1001, 1996).

5 The amplification of an endogenous control can be performed to standardize the amount of sample RNA added to a reaction. In this kind of experiment, the control of choice is the 18S ribosomal RNA. Because reporter dyes with differing emission 10 spectra are available, the target and the endogenous control can be independently quantified in the same tube if probes labeled with different dyes are used.

All "real time PCR" measurements of fluorescence are made in the ABI Prism 7700. 15 *RNA extraction and cDNA preparation.* Total RNA from the tissues listed above are used for expression quantification. RNAs labeled "from autopsy" were extracted from autopic tissues with the TRIzol reagent (Life Technologies, MD) according to the manufacturer's protocol.

20 Fifty µg of each RNA are treated with DNase I for 1 hour at 37°C in the following reaction mix: 0.2 U/µl RNase-free DNase I (Roche Diagnostics, Germany); 0.4 U/µl RNase inhibitor (PE Applied Biosystems, CA); 10 mM Tris-HCl pH 7.9; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; and 1 mM DTT.

25 After incubation, RNA is extracted once with 1 volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (24:24:1) and once with chloroform, and precipitated with 1/10 volume of 3 M NaAcetate, pH 5.2, and 2 volumes of ethanol.

30 Fifty µg of each RNA from the autopic tissues are DNase treated with the DNA-free kit purchased from Ambion (Ampion, TX). After resuspension and spectrophotometric quantification, each sample is reverse transcribed with the TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems, CA) according to the manufac-

turer's protocol. The final concentration of RNA in the reaction mix is 200 ng/ μ L. Reverse transcription is carried out with 2.5 μ M of random hexamer primers.

5 *TaqMan quantitative analysis.* Specific primers and probe are designed according to the recommendations of PE Applied Biosystems. Probes are labeled either FAM = 6-carboxy-fluorescein or with TAMRA = 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine. Quantification experiments are performed on 10 ng of reverse transcribed RNA from each sample. Each determination is done in triplicate.

10 Total cDNA content is normalized with the simultaneous quantification (multiplex PCR) of the 18S ribosomal RNA using the Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (PDAR) Control Kit (PE Applied Biosystems, CA).

15 The assay reaction mix is as follows: 1X final TaqMan Universal PCR Master Mix (from 2X stock) (PE Applied Biosystems, CA); 1X PDAR control – 18S RNA (from 20X stock); 300 nM forward primer; 900 nM reverse primer; 200 nM probe; 10 ng cDNA; and water to 25 μ l.

20 Each of the following steps are carried out once: pre PCR, 2 minutes at 50°C, and 10 minutes at 95°C. The following steps are carried out 40 times: denaturation, 15 seconds at 95°C, annealing/extension, 1 minute at 60°C.

25 The experiment is performed on an ABI Prism 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, CA). At the end of the run, fluorescence data acquired during PCR are processed as described in the ABI Prism 7700 user's manual in order to achieve better background subtraction as well as signal linearity with the starting target quantity.

EXAMPLE 7*Quantitative Expression Profiling of the novel human chemokine receptor like mRNA*

5 Expression profiling is based on a quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis, also called kinetic analysis, first described in Higuchi et al., 1992 and Higuchi et al., 1993. The principle is that at any given cycle within the exponential phase of PCR, the amount of product is proportional to the initial number of template copies. Using this technique, the expression levels of particular genes, which are transcribed from the chromosomes as messenger RNA (mRNA), are measured by first making a DNA copy (cDNA) of the mRNA, and then performing quantitative PCR on the cDNA, a method called quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (quantitative RT-PCR).

10

15 Quantitative RT-PCR analysis of RNA from different human tissues was performed to investigate the tissue distribution of novel C-C chemokine receptor-like mRNA. In most cases, 25 µg of total RNA from various tissues (including Human Total RNA Panel I-V, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) was used as a template to synthesize first-strand cDNA using the SUPERSCRIPT™ First-Strand Synthesis

20 System for RT-PCR (Life Technologies, Rockville, MD, USA). First-strand cDNA synthesis was carried out according to the manufacturer's protocol using oligo (dT) to hybridize to the 3' poly A tails of mRNA and prime the synthesis reaction. Approximately 10 ng of the first-strand cDNA was then used as template in a polymerase chain reaction. In other cases, 10 ng of commercially available cDNAs

25 (Human Immune System MTC Panel and Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) were used as template in a polymerase chain reaction. The polymerase chain reaction was performed in a LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), in the presence of the DNA-binding fluorescent dye SYBR Green I which binds to the minor groove of the

30 DNA double helix, produced only when double-stranded DNA is successfully synthesized in the reaction (Morrison et al., 1998). Upon binding to double-stranded

DNA, SYBR Green I emits light that can be quantitatively measured by the LightCycler machine. The polymerase chain reaction was carried out using oligonucleotide primers LBRI_263_DNA-L1 (SEQ ID NO: 10,) and LBRI_263_DNA-R2 (SEQ ID NO: 11) and measurements of the intensity of emitted light were taken following each cycle of the reaction when the reaction had reached a temperature of 81 degrees C. Intensities of emitted light were converted into copy numbers of the gene transcript per nanogram of template cDNA by comparison with simultaneously reacted standards of known concentration.

5 To correct for differences in mRNA transcription levels per cell in the various tissue types, a normalization procedure was performed using similarly calculated expression levels in the various tissues of five different housekeeping genes: glyceraldehyde-3-phosphatase (G3PDH), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), beta-actin, porphobilinogen deaminase (PBGD), and beta-2-microglobulin. The level of housekeeping gene expression is considered to be relatively constant for all tissues (Adams et al., 1993, Adams et al., 1995, Liew et al., 1994) and therefore can be used as a gauge to approximate relative numbers of cells per .mu.g of total RNA used in the cDNA synthesis step. Except for the use of a slightly different set of housekeeping genes and the use of the LightCycler system to measure expression levels, the normalization procedure was similar to that described in the RNA Master Blot User Manual, Appendix C (1997, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). In brief, expression levels of the five housekeeping genes in all tissue samples were measured in three independent reactions per gene using the LightCycler and a constant amount (25 .mu.g) of starting RNA. The calculated copy numbers for each gene, derived from comparison with simultaneously reacted standards of known concentrations, were recorded and the mean number of copies of each gene in all tissue samples was determined. Then for each tissue sample, the expression of each housekeeping gene relative to the mean was calculated, and the average of these values over the five housekeeping genes was found. A normalization factor for each tissue was then calculated by dividing the final value for one of the tissues arbitrarily selected as a standard by the corresponding value for each of the

10

15

20

25

30

tissues. To normalize an experimentally obtained value for the expression of a particular gene in a tissue sample, the obtained value was multiplied by the normalization factor for the tissue tested. This normalization method was used for all tissues except those derived from the Human Blood Fractions MTC Panel, which 5 showed dramatic variation in some housekeeping genes depending on whether the tissue had been activated or not. In these tissues, normalization was carried out with a single housekeeping gene, beta-2-microglobulin.

Results are shown in Figs. 13 and 14, showing the experimentally obtained copy 10 numbers of mRNA per 10 ng of first-strand cDNA on the left and the normalized values on the right. RNAs used for the cDNA synthesis, along with their supplier and catalog numbers are shown in tables 1 and 2.

References

15

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* 10:413-417.

20

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology* 11:1026-1030.

T.B. Morrison, J.J. Weis & C.T. Wittwer .(1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-962.

25

Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fields, C. & Venter, C. (1993) 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nature Genet.* 4:256-265.

Adams, M. D., et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 supp:3-174.

5 Liew, C. C., Hwang, D. M., Fung, Y. W., Laurenson, C., Cukerman, E., Tsui, S. & Lee, C. Y. (1994) A catalog of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10145-10649.

Table 1: Whole-body-screen tissues

Tissue	Supplier	Panel name and catalog number
1. brain	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
2. heart	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
3. kidney	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
4. liver	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
5. lung	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
6. trachea	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
7. bone marrow	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
8. colon	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
9. small intestine	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
10. spleen	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
11. stomach	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
12. thymus	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
13. mammary gland	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
14. skeletal muscle	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
15. prostate	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
16. testis	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
17. uterus	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
18. cerebellum	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
19. fetal brain	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
20. fetal liver	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
21. spinal cord	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
22. placenta	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
23. adrenal gland	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
24. pancreas	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
25. salivary gland	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
26. thyroid	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1

Table 2: Blood/lung-screen tissues

Tissue	Supplier	Panel name and catalog number
1. lymph node	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
2. peripheral blood leukocytes	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
3. tonsil	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
4. peripheral blood mononuclear cells	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
5. peripheral blood mononuclear cells - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
6. T-cell (CD8+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
7. T-cell (CD8+) - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
8. T-cell (CD4+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
9. T-cell (CD4+) - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
10. B-cell (CD19+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
11. B-cell (CD19+) - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
12. Monocytes (CD14+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
13. Th1 clone	In-house	
14. Th2 clone	In-house	
15. neutrophil	In-house	
16. neutrophil	In-house	
17. Normal Bronchial/Tracheal Epithelial Cells	In-house	
18. Normal Bronchial/Tracheal smooth muscle cell	In-house	
19. Normal lung fibroblast	In-house	
20. Microvascular Endothelial cell	In-house	
21. U937	In-house	
22. RAMOS	In-house	
23. Jurkat	In-house	
24. HelaS3	In-house	
25. IMR-90	In-house	
26. HEK293	In-house	

EXAMPLE 8

Treatment of a patient with a reagent which specifically binds to an human chemo-kine receptor-like mRNA

5 Synthesis of an antisense oligonucleotide comprising at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO: 1 is performed on a Pharmacia Gene Assembler series synthesizer using the phosphoramidite procedure (Jhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 534-83, 1990). Following assembly and deprotection, the oligonucleotide is twice ethanol-precipitated, dried, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired concentration. Purity of the oligonucleotide is tested by capillary gel electrophoreses and ion exchange HPLC. The endotoxin level in the oligonucleotide preparation is determined using the *Limulus* Amebocyte Assay

10 (Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 105, 361-362, 1953).

15

An aqueous composition containing the antisense oligonucleotides at a concentration of 0.1-100 μ M is administered directly to a patient having by injection. The severity of the patient is decreased.

20

EXAMPLE 9

In vivo testing of compounds/target validation for asthma treatment

25 1. Tests for activity of T cells

Costimulatory molecules-cytokines, cytokine receptors, signalling molecules, any molecule involved in T cell activation

30 Mouse anti-CD3 induced cytokine production model

5 BALB/c mice were injected with a single intravenous injection of 10 µg of 145-2C11 (purified hamster anti-mouse CD3 ε monoclonal antibodies, PHARMINGEN). Compound was administered intraperitoneally 60 min prior to the anti-CD3 mAb injection. Blood was collected 90 min after the antibody injection. Serum was obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. IL-2 and IL-4 levels in the serum was determined by an ELISA.

2. Tests for activity of B cells

10 B cell receptor, signalling molecules, any molecule involved in B cell activation/Ig class switching

Mouse anti-IgD induced IgE production model

15 BALB/c mice were injected intravenously with 0.8 mg of purified goat anti-mouse IgD antibody or PBS (defined as day 0). Compound was administered intraperitoneally from day 0 to day 6. On day 7 blood was collected and serum was obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. Serum total levels of IgE were determined by YAMASA's ELISA kit and their Ig subtypes were 20 done by an Ig ELISA KIT (Rougier Bio-tech's, Montreal, Canada).

3. Tests for activity of monocytes/macrophages, signalling molecules, Transcription factors

25 Mouse LPS-induced TNF-α production model

BALB/c mice were injected intraperitoneally with LPS (200 µg/mouse). Compound was administered intraperitoneally 1 hr before the LPS injection. Blood was collected at 90 min post-LPS injection and plasma was obtained. 30 TNF-α concentration in the sample was determined using an ELISA kit.

4. Tests eosinophil activation

Eotaxin-eotaxin receptor (GPCR)
Signalling molecules, Cytoskeletal molecules, adhesion molecules

5 Mouse eotaxin-induced eosinophilia model

BALB/c mice were injected intradermally with a 2.5 ml of air on days -6 and -3 to prepare airpouch. On day 0 compound was administered intraperitoneally 60 min before eotaxin injection (3 µg/mouse, i.d.). IL-5 (300 ng/mouse) was injected intravenously 30 min before the eotaxin injection. After 4 hr of the eotaxin injection leukocytes in exudate was collected and the number of total cells was counted. The differential cell counts in the exudate were performed by staining with May-Grunwald Gimsa solution.

15

5. Tests activation of Th2 cells

Molecules involved in antigen presentation, costimulatory molecules, signaling molecules, transcription factors

20

Mouse D10 cell transfer model

25 D10.G4.1 cells (1 x 10⁷ cells/mouse) containing 2 mg of conalbumin in saline was administered i.v. to AKR mice. After 6 hr blood was collected and serum was obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10min. IL-4 and IL-5 level in serum were determined by ELISA kits. Compound was administered intraperitoneally at -4 and +1 hr after these cells injection.

6. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in rats

30

6 Weeks old male Wistar rats are sensitized intradermally (i.d.) on their shaved backs with 50 μ l of 0.1 μ g/ml mouse anti-DNP IgE monoclonal antibody (SPE-7) under a light anesthesia. After 24 hours, the rats are challenged intravenously with 1 ml of saline containing 0.6 mg DNP-BSA (30) (LSL CO., LTD) and 0.005 g of Evans blue. Compounds are injected intraperitoneally (i.p.) 0.5 hr prior to antigen injection. Rats without the sensitization, challenge, and compound treatment are used for a blank (control) and rats with sensitization, challenge and vehicle treatment are used to determine a value without inhibition. Thirty min after the challenge, the rats are killed, and the skin of the back is removed. Evans blue dye in the skin is extracted in formamide overnight at 63°C. Then an absorbance at 620 nm is measured to obtain the optical density of the leaked dye.

Percent inhibition of PCA with a compound is calculated as follows:
15 % inhibition = $\{(mean\ vehicle\ value - sample\ value) / (mean\ vehicle\ value - mean\ control\ value)\} \times 100$

7. Anaphylactic bronchoconstriction in rats

20 6 Weeks old male Wistar rats are sensitized intravenously (i.v.) with 10 μ g mouse anti-DNP IgE, SPE-7, and 1 days later, the rats are challenged intravenously with 0.3 ml of saline containing 1.5 mg DNP-BSA (30) under anesthesia with urethan (1000 mg/kg, i.p.) and gallamine (50 mg/kg, i.v.). The trachea is cannulated for artificial respiration (2 ml / stroke, 70 strokes / min).
25 Pulmonary inflation pressure (PIP) is recorded thruogh a side-arm of cannula connected to pressure transducer. Change in PIP reflects change of both resistance and compliance of the lungs. To evaluate the drugs, each drug is given i.v. 5 min before challenge.

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide and being selected from the group consisting of:
 - 5 a) a polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
amino acid sequences which are at least about 26% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
10 amino acid sequences which are at least about 26% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;
15 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7;
amino acid sequences which are at least about 26% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8; and
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8.
 - 20 b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NOS: 1, 4, 5, or
9;
 - 25 c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a
polynucleotide specified in (a) and (b);
 - d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of
the genetic code; and

- e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a to (d)).
- 2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
- 5 3. A host cell containing the expression vector of claim 2.
- 4. A substantially purified chemokine-like receptor polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.
- 10 5. A method for producing a chemokine-like receptor polypeptide, wherein the method comprises the following steps:
 - 15 a) culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the chemokine-like receptor polypeptide; and
 - b) recovering the chemokine-like receptor polypeptide from the host cell culture.
- 20 6. A method for detection of a polynucleotide encoding a chemokine-like receptor polypeptide in a biological sample comprising the following steps:
 - a) hybridizing any polynucleotide of claim 1 to a nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
 - 25 b) detecting said hybridization complex.
- 7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.

8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a chemokine-like receptor polypeptide of claim 4 comprising the steps of:

5 contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide or the chemokine-like receptor polypeptide.

9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claims 6 to 8.

10. 10. A method of screening for agents which decrease the activity of a chemokine-like receptor, comprising the steps of:

contacting a test compound with any chemokine-like receptor polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;

15 detecting binding of the test compound to the chemokine-like receptor polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of a chemokine-like receptor.

20 11. A method of screening for agents which regulate the activity of a chemokine-like receptor, comprising the steps of:

25 contacting a test compound with a chemokine-like receptor polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and

30 detecting a chemokine-like receptor activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the chemokine-like receptor activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the chemokine-like receptor, and wherein a test compound which decreases the chemokine-like receptor activity of the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of the chemokine-like receptor.

12. A method of screening for agents which decrease the activity of a chemokine-like receptor, comprising the steps of:
 - 5 contacting a test compound with any polynucleotide of claim 1 and detecting binding of the test compound to the polynucleotide, wherein a test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of chemokine-like receptor.
- 10 13. A method of reducing the activity of chemokine-like receptor, comprising the steps of:
 - 15 contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 or any chemokine-like receptor polypeptide of claim 4, whereby the activity of chemokine-like receptor is reduced.
- 20 14. A reagent that modulates the activity of a chemokine-like receptor polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.
- 25 15. A pharmaceutical composition, comprising:
 - the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 30 16. Use of the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 in the preparation of a medicament for modulating the activity of a chemokine-like receptor in a disease.
17. Use of claim 16 wherein the disease is HIV infection, a cardiovascular disorder, asthma or COPD.

18. A cDNA encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8.
- 5 19. The cDNA of claim 18 which comprises SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9.
20. The cDNA of claim 18 which consists of SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9.
- 10 21. An expression vector comprising a polynucleotide which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8.
22. The expression vector of claim 21 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9.
- 15 23. A host cell comprising an expression vector which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8.
24. The host cell of claim 23 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9.
- 20 25. A purified polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8.
26. The purified polypeptide of claim 25 which consists of the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8.
- 25 27. A fusion protein comprising a polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8.

28. A method of producing a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8, comprising the steps of:

5 culturing a host cell comprising an expression vector which encodes the polypeptide under conditions whereby the polypeptide is expressed; and

isolating the polypeptide.

29. The method of claim 28 wherein the expression vector comprises SEQ ID 10 NOS: 1, 4, 5 or 9.

30. A method of detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, comprising the steps of:

15 hybridizing a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9 to nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and

detecting the hybridization complex.

20 31. The method of claim 30 further comprising the step of amplifying the nucleic acid material before the step of hybridizing.

32. A kit for detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino 25 acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8, comprising:

a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9; and

30 instructions for the method of claim 30.

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 90 -

33. A method of detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8, comprising the steps of:

5 contacting a biological sample with a reagent that specifically binds to the polypeptide to form a reagent-polypeptide complex; and

detecting the reagent-polypeptide complex.

34. The method of claim 33 wherein the reagent is an antibody.

10

35. A kit for detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8, comprising:

an antibody which specifically binds to the polypeptide; and

15

instructions for the method of claim 33.

36. A method of screening for agents which can modulate the activity of a human chemokine-like receptor, comprising the steps of:

30

contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8; and

detecting binding of the test compound to the polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential agent for regulating activity of the human chemokine-like receptor.

30

37. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell.

38. The method of claim 36 wherein the cell is *in vitro*.

39. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell-free system.

40. The method of claim 36 wherein the polypeptide comprises a detectable label.

41. The method of claim 36 wherein the test compound comprises a detectable label.

42. The method of claim 36 wherein the test compound displaces a labeled ligand which is bound to the polypeptide.

43. The method of claim 36 wherein the polypeptide is bound to a solid support.

44. The method of claim 36 wherein the test compound is bound to a solid support.

45. A method of screening for agents which modulate an activity of a human chemokine-like receptor, comprising the steps of:
contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 26% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8; and
detecting an activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for increasing the activity of the human chemokine-like receptor, and wherein a

test compound which decreases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for decreasing the activity of the human chemokine-like receptor.

- 5 46. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell.
47. The method of claim 45 wherein the cell is *in vitro*.
48. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
- 10 49. A method of screening for agents which modulate an activity of a human chemokine-like receptor, comprising the steps of:
 - 15 contacting a test compound with a product encoded by a polynucleotide which comprises the nucleotide sequence shown in SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9; and
 - detecting binding of the test compound to the product, wherein a test compound which binds to the product is identified as a potential agent for regulating the activity of the human chemokine-like receptor.
- 20 50. The method of claim 49 wherein the product is a polypeptide.
51. The method of claim 49 wherein the product is RNA.
- 25 52. A method of reducing activity of a human chemokine-like receptor, comprising the step of:
 - contacting a cell with a reagent which specifically binds to a product encoded by a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID
- 30

NOS: 1, 4, 5 or 9, whereby the activity of a human chemokine-like receptor is reduced.

53. The method of claim 52 wherein the product is a polypeptide.
- 5 54. The method of claim 53 wherein the reagent is an antibody.
55. The method of claim 52 wherein the product is RNA.
- 10 56. The method of claim 55 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.
57. The method of claim 56 wherein the reagent is a ribozyme.
- 15 58. The method of claim 52 wherein the cell is *in vitro*.
59. The method of claim 52 wherein the cell is *in vivo*.
60. A pharmaceutical composition, comprising:
 - 20 a reagent which specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8; and
 - a pharmaceutically acceptable carrier.
- 25 61. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein the reagent is an antibody.
62. A pharmaceutical composition, comprising:
 - 30 a reagent which specifically binds to a product of a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NOS: 1, 4, 5, or 9; and

a pharmaceutically acceptable carrier.

63. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is a
5 ribozyme.

64. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an
antisense oligonucleotide.

10 65. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an
antibody.

66. A pharmaceutical composition, comprising:
15 an expression vector encoding a polypeptide comprising the amino acid
sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 7 or 8; and
a pharmaceutically acceptable carrier.

20 67. The pharmaceutical composition of claim 66 wherein the expression vector
comprises SEQ ID NOS: 1, 4, 5 or 9.

68. A method of treating a chemokine-like receptor dysfunction related disease,
25 wherein the disease is selected from HIV infection, a cardiovascular disorder,
asthma or COPD comprising the step of:
30 administering to a patient in need thereof a therapeutically effective dose of a
reagent that modulates a function of a human chemokine-like receptor,
whereby symptoms of the chemokine-like receptor dysfunction related disease
are ameliorated.

69. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of
claim 36.

70. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of
5 claim 45.

71. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of
claim 49.

Fig. 1

atggagcacacgcacgcccacactcgccgcaacagctcgctgtcttgggtgc
 ccccggtcgccctcgccgttaccagcaaatatcttgcacgtgatcatcccttcccg
 ctgggtggcaagaagacaaggactcttccatcaactatcttggactcgctgc
 tgccgacatcttgccttcatgtgtttcatgtgttggacttcctgttggaaag
 atttcatcttgcacatgcacatgcctcaggccccgacaagatcataagaatgt
 ctggaaattctcatccatccacacccatcatgttactgttaccgttaccat
 tgacaggatatacgctgttgcaccccgctcaagtaccacacgggttccatacc
 cagcccgacccggaaagtattgttaatgtttacatcacctgttctctgacc
 agcatccccatatactgttggcccaacatctggactgttggactacatcagcac
 ctgtgtgtcatcactgttccatctggatccactgttccatccgttacatgggtc
 cctgtccatcttcttgcacttgcacttgcacatgttgcataagcttggagg
 aagagcaattttcgatccatcttgcacactccacccatctggggaaagaccacc
 gtcacccatccatcttgcacacttgcacccatctggccatccatcatcatgt
 ttcttaccacacttgcacatgttgcacccatctggggccatccatcatcatgt
 atgtccgcattgtccacatgttgcacccatctggggccatccatcatcatgt
 ctgttactgttcatcagcaaggcttgcacccatctggggccatccatcatcatgt
 aggctttttcaagtgcacaaagcaacccatgttgcacccatctggggccatccatcatgt
 ttccatataacaatgttgcacccatctggatccatccatcatcatgt
 gatgttgcacccatctggggccatccatcatcatgt

Fig. 2

MEHTHAHILAANSSLSSWWSPGSACGLGFVPPVYYSLLLCLGLPANIITVIIISQL
 VARRQKSSNYLLALAAADILVLFIVFVDFLLEDFIGLNMQMPQVPDFKIIIEVL
 EFSIHTSIWITVPLTIDRYIAVCHPLKVHTVSYPARTRKVIVSVYITCFLTSI
 PYWWPNIWBDYISTSVWHVLIWIHCFTVYLVPCSIFFILNSIIVYKLRRKSN
 FRLRGYSTGKTTAILTITSIFATLWAPRIIMILYHLYGAPIQNRWLVHIMSDI
 ANMLALLNTAINFFLYCFISKFRTMAATLKAFFKQKQPVQFYTNHNSITS
 SPWISPANSHCIKMLVYQYDKNGKPIKVSP

Fig. 3

MTTSLYTETFGPTSYDDDMGLLCEKADVGALIAQFVPPPLSIVFTVGLLGNV
 VVMMILIKYRLRIMTNIYLLNLAIISDLFLFTLPFWIHYVREHNWVSHGMC
 KVLSGFYHTGLYSEIFFIILLTIDRYLAIIVHAFVAFRARTVTFGVITSIVTWG
 LAVLVALPEFIFYGTEELFPETLCSAIYQPDTVYSWRHFHTLKMTILCLALPL
 LVMAICYTGIIKTLLKCPSKKKYKAIRLIFVIMAVFFIFWTPYNVAILISTYQ
 SILFGLDCERSKHVDLVVLVTEVIAYSHCCVNPVYAFVGERFRKYLRHFFHR
 HVLMHLGRYIPFLPSEKERTSSVSPSTAEPCLCIVF

Fig. 4

ATGTATCTGAGAACTTAGGACCACCCCTGGTCATCAAGATGCTTCAACTCAA
 GAAGTTCATGGAAGTCGCTCTGACTGAGGGACAGATCTCCCATCTCCACGCTC
 CCCAGGGCGTATGCTATTGAGTGGAAATGCAAATATCTTGACAGTGATCATCC
 TCTCCAGCTGGTGGCAAGAACAGAAGCTCCCTACAACATATCTCTGGCA
 CTCGCTGCTGCCGACATCTGGCTCTTTTATAGTGTGACTTCCT
 GTTGAAAGATTTCATCTGAACATGCGAGTCGCTCAGGTCCCCGACAAAGATCA
 TAGAAGTGTGAGAATTCTCATCCATCCAACCTCCATATGGATTACTGTACCG
 TTAACCATGACAGGTATATCGCTGCTGCCACCCGCTCAAGTACACACAGGT
 CTCATACCCAGCCGACCCGAAAGTCATTGTAAGTGTACATCACTGCT
 TCCGACAGCATCCCCATTACTGGTGGCCAAACATCTGGACTGAAGACTAC
 ATCAGCACCTCTGTGCATCACGTCCTCATCTGGATCAGTCGCTCACCGCTCAC
 CTGGTGCCTGCTCCATCTTCATCTGAACATCAATCTGTGATCAAGCT
 CAGGAGGAAGAGCAATTTCGCTCCGTTGCTACTCCACGGGAAGACCCACCG
 CCATTTGTTACCATTCATCTTGCCACACTTGGGCCCGCATC
 ATCATGATTCTTACCACTCTATGGGCCCCATCCAGAACCGCTGGCTGGT
 GCACATCATGICCGACATTGCAACATGCTAGCCCTCTGAACACAGGCATCA
 ACTCTTCCCTACTGCTCATCAGCAAGCGGTTCCGACCATGGCAGCCGCC
 ACGCTCAAGGCTTCTCAAGTGCAGAACGCAACCTGTAAGTTCAACCAA
 TCATAACTTTCCATACAAGTAGCCCTGGATCTGCCGCAAACACTCACACT
 GCATCAAGATGCTGGTGTACCAAGTACACAAAGTGGAAACCTATAAAAGTA
 TCCCCGTGA

Fig. 5

TAGGACCACCTGGTGCATCAAGATGCTTCCACTCAAAGAAGTTCATGGAAGT
CGTCTGACTGAGGGACAGATCTCCCATCTCCCAGGCTCCCCAGGGCTATGCT
CATTGAGTGGAAATGCAAATATCTTGACAGTGATCATCCTCTCCCAGCTGGTGG
CAAGAAGACAGAAGTCCTCCCTACAACATCTCTGGCACTGCGTGCCTGCCGAC
ATCTTGGTCTCTTTTCAATGTTCTGACTCTCTGTTGGAAAGATTTCAT
CTTGAACATGCGATGCCCTCAGGTCCTCCGACAAGATCATAGAAGTGTGGAAT
TCTCATCACTCCACACTCCATATGGATTACTGTACCGTTAACCATTTGACAGG
TATATCGCTCTGCCCCCTCAAGTACCCACACGGTCTCATACCCAGCCCC
CACCCGAAAGTCATTGTAAGTGTTCATCACCTGCTTCTGACACAGCATCC
CCTATTACTGCTGGCCCAACATCTGGACTGAAGACTACATCAGCACCTCTGTC
CATCACGTCTCATCTGATCCACTGCTTCAACCGTCTACCTGGTGCCTGCTC
CATCTTCTTCATCTGAACTCAATCATTTGTAACAAGCTCAGGAGGAAGAGCA
ATTTTCGTCCTCGTGGCTACTCCACGGGAAGACCCACCGCCATCTGTTCACC
ATTACCTCCATCTTGCACACTTGGCCCCCATCCAGAACCGCTGGCTGGTGCACATCATGTC
CCACCTCATGGGGCCCATCCAGAACCGCTGGCTGGTGCACATCATGTC
ACATTGCCAACATGCTAGCCCTCTGAACACAGCCATCAACTTCTCTCTAC
TGCTTCATCAGCAAGCGGTTCCGCACCATGGCAGCCGCAAGCTCAAGGCTTT
CTTCAGTGGCCAGAACGCAACCTCTACAGTTCTACACCAATCATAACTTTCCA
TAACAAGTAGCCCTGGATCTGCCGGCAAACCTCACACTGCATCAAGATGCTG
GTGTACCAAGTATGACAAAAATGGAAAACCTATAAAAGTATCCCCGTGA

Fig. 6

TGGCTCTCATTTAGGGACCATATTGTGTGATTCTAAATGTATCTGAGAACCTAG
GACCACCTGGTGCATCAAGATGCTTCCACTCAAAGAAGGTTCATGGAAAGTCGT
CTGACTGAGGGACAGATCTCCCATCTCCCACGCTCCCCAGGGCGTATGCTCAT
TGAGTGGATGCAAAATCTTGACAGTGTATCTCTCTCCAGCTGGCAA
GAAGACAGAAGTCTCTTACAACATCTTGGCAGTCGCTGCTGGGACATC
TTGGTCTCTTTTCTATGTTGTGACTTCTGTTGAAAGAATTCTATCTT
GAACATGCAAGATGCCCTCAGGTCCCCGAAAGATCATAGAAAGTGTGAAATTCT
CATCCATCCACACCTCCATATGGATTACTGTACCGTTAACCATGACAGGTAT
ATCCTGCTGCTGCCACCCGCTCAAGTACCCACACGGCTCATACCCAGCCGAC
CCGAAAGTCTGGTAACTGTTACATCAGGCTTCCGTGACCCAGCATCCCCCT
ATTACTGGTGTGCCAACATCTGGACTGAAGACTACATCAGCACCTCTGTGCAT
CTGGTCTCATCTGGATCCACTGCTCACCGTCTACACTGGTGCCCTGCTCCAT
CTTCTTCATCTGGAACTCAATCATTTGTGACAAGCTCAGGAGGAAGAGCAATT
TTCGTCTCCGCTGGCTACTCCACGGGAAGGACCAACGGCCATCTGTTACCAATT
ACCTCCATGGGGCCACACTTGGGACCTGGGACATCATGATTTCTTACCA
CTCTATGGGGCCATCCAGAACCGCTGGCTGGCATCATGTCAGGAC
TTGCCAACATGCTAGCCCTCTGAAACACAGCCATCAACTTCTTCCCTACTGC
TTGATCAGGAAGGGTTCCGCACCATGGCAGCCACGGCTCAAGGTTTCTT
CAAGTGCAGAAGCAACCTGACAGTCTACACCAATCATAACTTTCCATAA
CAAGTAGCCCTGGATCTGGCAGCAACTCACACTGCAATCAAGATGCTGGTG
TACCACTATGACAAAATGGAAAACCTATAAAAGTATCCCCGTGATTTCCATAG
GTGTGCAACTGCTCTGCTTAATCCATTCCAGATGGGAAGGTGTCCCA
TCCATATGGCTGAGCAGCTCTCTTAAGAGTGTCTAATCCGATTTCCTGCTCCC
GCAGACTGGGCAATTCTCAGACTGGTAGATGAGAAGAGATGGAAGAGAAA
GGAGAGCAAGACTGTTTACTTATGCAATTATTTCCACAGAGTCGTAAT
GACAGCAAAGCTCTTACAGTTGAAGATGCCATTGGAGCTTGTCTCATCAT
CCTGTGACCACTTAGGACACAAGATGAGAAGTACTCTGTGATTTGCCCTGG
TACCATCAGACTGGGAACCCCTCATTTATGGACTTACCAAGCCCCAG
TAGCACATAGCTGAGCTGCACTCTCTTCCGAGAGCTGAGGTCAATTCTAC
TTCCCTGCTGTTCCAGGAGCTAACATAATGACTATTTCAGGATTTTTT
CAAGCTGCCATTGTCAGAGAGGGTTGTGTCATGAATTGGCTCTGGCACT
CCTAGCTCAGAATGCACTGTGGGAATGAGAAGATATTGGATCCCATCCAAA
CTGTGCGCAGAGCTTCTCAGGAATCTCCAAACCCGATAGCTGTGACCTCA
AACCTGGGTCTAAAGGCAGTTTCTATTATCATTATGTATAGATTTCTC
TATCTCCTCCAAAACAAGACCCCT

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 5/14 -

Fig. 7

MYLRTLGLPPWCIKMLPLKEVHGSRLTEGOISHLPRSPGRMLIEWNANILTVII
LSQLVARROKSSSYNYLLALAAADILVLFFIVFVDFLLEDFTILNMQMPQVPDKI
IEVLEFSSIHTSIWITVPLTIDRYIAVCHPLKYHTVSYPARTRKVIVSVYITC
FLTSIPYYWWPNIWEDYIESTSVHHVLIWIHCFTVYLVPCSIFFILNSIIVYK
LRRKSNFRLRGYSTGKTAILFTITSIFATLWAPRIIMILYHLYGAPIQNRWL
VHIMSDIANMLALLNTAINFFLYCFISKRFRTMAAATLKAFFKCQKQPVQFYT
HNHFSITSSPWIS PANSHCIKMLVYQYDKNGKPIKVSP

PIKVSP

Fig. 8

MLPLKEVHGSRLTEGOISHLPRSPGRMLIEWNANILTVIILSQLVARROKSSY
NYLLALAAADILVLFFIVFVDFLLEDFTILNMQMPQVPDKIIEVLEFSSIHTSI
WITVPLTIDRYIAVCHPLKYHTVSYPARTRKVIVSVYITCFLTSIPYYWWPNI
WEDYIESTSVHHVLIWIHCFTVYLVPCSIFFILNSIIVYKLRKSNFRLRGYS
TGKTTAILFTITSIFATLWAPRIIMILYHLYGAPIQNRWLVHIMSDIANMLAL
LNATINFPLYCFISKRFRTMAAATLKAFFKCQKQPVQFYTNHNFISITSSPWIS
PANSHCIKMLVYQYDKNGKPIKVSP

Fig. 9

Atggagcacacgcacgcccacccgcagccaacagctcgctgtctgggtgc
ccccggctcggtctgcggcttgggttcgtgcccgtgtctactacagctct
tgctgtgcctcggttaccagcaaatatcttgcacgtgatcatccctcccaag
ctggtgccaaqaagacagaaggctctctacaactatctctggcactcgctgc
tgcggacatcttgcgttcatgtgttttttttttttttttttttttttttttt
atttcatcttgcacatgcacatgcctcaaggcccaacaqatcatqaaqgtq
ctggaaatcttgcattccatccatccatccatccatccatccatccatcc
tgacaggatatacgctgtgtgcaccacccgcgtcaagttaccacacgggtctcatacc
cagccgcacccatattacttgcgttgcaccacatctggactgaqactacatcagc
accccttgcggggaaagtcatgttaagtgttacatcacctgttgcctgtgaccag
catctgcacatcgcctcatctgatccactgttccatccatccatccatcc
cctgtccatcttcttcatcttgcactcaatcattgttacaaggctcaggagg
aagagcaatttcgtctccgtgtactccacccatccagaaccggctgggttgcacatc
tttttaccacccatctatggggcgcccatccagaaccggctgggttgcacatc
atgttgcacattgcacatgttagcccttccatccatccatccatccatcc
ccctactgttgcacatgttagcccttccatccatccatccatccatccatcc
aggcttctcaagtgcagaaggcaaccctgtacagttttacaccaatcataac
ttttccataacaaggtagccctgatctgcggccaaactcacactgcataaa
gatgtgtgttaccatgtacaaaatggaaaacctataaaagtatccccgt
ga

- 7/14 -

Fig. 10
FASTA - alignment of 263 against swiss|P56492|CKR3_CERAE
 C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 (C-C CCR-3) (CC-CCR-3) (CCR-3) (CCR3)
 (CKR3).//:trembl|Y13775|CAY13775_1 gene: "CCR-3"; product: "C-C chemokine receptor-3";
 Cercopithecus aethiops CCR3_1 gene: "CCR-3"; product: "C-C chemokine receptor-3";
 Cercopithecus aethiops CCR-3 gene: "CCR-3"; product: "C-C chemokine receptor-3";
 Cercopithecus aethiops CCR-3 gene: "CCR-3"; product: "C-C chemokine receptor-3";

This hit is scoring at : 4.5e-10 (expectation value)

Alignment length (Overlap) : 331

Identities : 25.7 %

Scoring matrix : BLOSUM50 (used to infer consensus pattern)

Database searched : nrdb

Q: 27 FVPPVYSSILICLGLPANILTYVILSQVVARQKSSYN-YLLAAADILVLFIFIVE-VD
 FVP : Y SLL: :GL :N: :V: :L: : RR : N YLL: :D: :L: :F: :P: :
 H: 36 FVPPVYSSILICLGLPANILTYVILSQVVARQKSSYN-YLLAAADILVLFIFIVE-VD
 FVP : Y SLL: :GL :N: :V: :L: : RR : N YLL: :D: :L: :F: :P: :
 :: E :::: M :::: K :::: I :::: L :::: T :::: D :::: R :::: A :::: H :::: L :::: T :::: V :::
 YVRBNWVFSHGMG- ---KVLSGFYHTQLYSEIFFILLTIDRYAHLAVHAFALPARTVT
 YPARTRKVTVSYVITGFLTSIYVWPNIWEYDYSTSYHH- -VLIWIHCPTVYL-YFPCS
 :: I :: T :: V :::: L :::: I :::: Y :::: E :::: S :::: V :::: W :::: H :::: T :::: C :::
 PGVITSITVGLAVLVALPEFLYGTIELFPEELCSAIVPQDTVYSWRHFFPLKMTLCL
 IEFILNSITYKLRIKSFRGYSITGTTAILETISIFATLWAPRLIML--YW-L
 :: I: L :: T: Y: K: :: I: F: T: :: K: :: W: P: :: I: L :: Y: L
 ALPLIVMAICYGIIKTLIKCPSKKYKAIRLIVVIMAVERFWPYNVALLISTYSSIL

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 8/14 -

Fig. 10 (continued)

WO 02/48358

PCT/EP91/14571

- 9/14 -

Fig. 11
HMMPFAM - alignment of 263 against pfam|human|7tm_1

Fig. 12

hC-C Rec.	(1)	1	---MYLRLGPPICTKMTIKEYVIGSRRLTEQIISHLPRSPGMEIETWENNTILV ((1))	60
TRR	((1))		-----MENETISELNOCTOLOPANVALYQYVNTLVLNIGGSGTGNNTIIVVIV ((1))	
CCR1	((1))		MEPNNTTEDYDTT-----FEDYGAATPCOONERAAQOLEPYSWVYVIVVIV ((1))	
CXCR4	((1))		-----MGESEDDSKWEPFRENANINKFEEFTHYSWVYVIVVIV ((1))	
CCR3	((1))		MTISLDIVETFGTTSYDDGELCERADTRALMAQFPEIYTSVIVVIV ((1))	
61				
hC-C Rec.	(56)	OLYARBOKSSYYVNTAALLAANDLVEPEVWDFLLEDYLLNMOMQVDPDKEWV ((52))	EVPESSWV ((52))	120
TRR	((61))	REYR-DEYR-DEYR-DEYR-DEYR-DEYR-DEYR-DEYR-DEYR-DEYR- ((61))	WAGKVGCGCTTYEMLC ((61))	
CCR1	((50))	QYRRL-K-NATSIYNTAISLILFUPRDIYKLKD- ((50))	WVGDAMCCTISGFV ((50))	
CXCR4	((61))	YQYRRL-SWIDKRYRHLISVAOLEVWNPWYADAVAN-- ((61))	WVTCNFICRCKMVIVV ((61))	
CCR3		KYRRL-1WNTVNTAISLILFUPRDIYKLKD- ((116))	WVAGHGMCRISGPFV ((116))	
121				
hC-C Rec.	(116)	HTSMLVWLTIDRYTAVCEPIKHTTYSYPARTRVMNSWVTCITSEIYWPNTWIE ((110))	WVTCITSEIYWPNTWIE ((110))	180
TRR	((118))	YASCSCTIPLTIDRYTAICIIKAQFICISPKKUWVWAFSTYCMWELLDINTS ((118))	WVTCITSEIYWPNTWIE ((118))	
CCR1	((106))	YSEELTIAWLTIDRYTAIMEFNSOPWPKLLEKXVYVWV ((106))	WVTCITSEIYWPNTWIE ((106))	
CXCR4		YSEELTIAWLTIDRYTAIMEFNSOPWPKLLEKXVYVWV ((118))	WVTCITSEIYWPNTWIE ((118))	
CCR3				

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 11/14 -

Fig. 12 (continued)

181	hC-C Rec. TRHR CCR1 CXCR4 CCR3	(176) (170) (178) (166) (178)	DYTSVHVLWTH-- TYKDAVITSCGGYKSRNNSYIYI ETHTCSHHEPESREKQLQAFALKNDG DDRYCPEYEND-- PEELICSALEEEVYSSRHHIE --	VVIMPSCPELNSTVVKRPSNSN VMDGFGVYEMIADLYGTRILFPLIPS LWVQVYVTCGIVLWVYVTCGIVL FOHIVGGLVPGIVLWVYVTCGIVL VTCGIVLWVYVTCGIVLWVYVTC --	240
241	hC-C Rec. TRHR CCR1 CXCR4 CCR3	(229) (230) (237) (222) (237)	-- NSKTKWNDSTHONTNLNVNTENR -- -- -- --	-- -- -- -- --	300
301	hC-C Rec. TRHR CCR1 CXCR4 CCR3	(255) (290) (263) (248) (263)	LYGAPTONRW-- SISLSPDEN-- SHDPEEDE-- SILLIEIKOGC SICQHIL--	-- -- -- -- --	360

Fig. 12 (continued)

361 418
hC-C Rec. (309) COQPOVYTNHDFITSSPMWISPAWSHCINLVIYOYDKNGKPIKVSP-
TRHR (341) PPEKPKPANSVATNSVTEKESSHFSSTEADDIVNTDTLSATKVSSDDTCLASEVSFSQS
CCR1 (321) -FVHLVXKIDPFTSYDRLERYSTSPTEGHEHESAGE
CXCR4 (304) -SNSRCSSESKIKTSICKRKGGHSSVSTSESSSHSS
CCR3 (321) -LAHIGRSEPPFLPSEKELRTSVCPSDAPPEPESIVE

Sample	Cell Name	Age, y	Num. #
Sample 1	Brain-1	23.59	23
Sample 2	Heart-3	9.573	27
Sample 3	Kidney	20.17	43
Sample 4	Liver	15.52	51
Sample 5	Lung	8.86	81
Sample 6	Trachea	14.74	31
Sample 7	Bone Marrow-1	8.633	4
Sample 8	Colon	9.711	8
Sample 9	Small intestine	24.23	37
Sample 10	Stomach-1	4.087	2
Sample 11	Stomach	6.772	9
Sample 12	Thymus-1	14.17	16
Sample 13	Hammar gland	14	24
Sample 14	Frostbite-1	9.578	10
Sample 15	Skeletal muscle-1	20.66	14
Sample 16	Testis	4.267	14
Sample 17	Uterus	31.4	40
Sample 18	Cerebellum	6.686	7
Sample 19	Fetal Brain	9.523	884
Sample 20	Fetal Liver-1	4.658	3
Sample 21	Spinal cord	26.25	32
Sample 22	Placenta-1	20.71	29
Sample 23	Adrenal gland	12.24	15
Sample 24	Fauches-1	11.35	112
Sample 25	Salivary gland	16.43	30
Sample 26	Thyroid	47.47	11

Fig. 13

Sample	Cell Name	Ans. #	Norm.
Sample 1	Lymph node	527	0
Sample 2	PBL	0.616	0
Sample 3	Tonsil	4.44	2
Sample 4	PBAN	28.1	0
Sample 5	PBNK stimulated	0.6515	0
Sample 6	T-cell(CD8+)	2.865	0
Sample 7	T-cell(CD8+) activated	207.8	413
Sample 8	T-cell(CD4+)	63.1	0
Sample 9	T-cell(CD4+) activated	376	0
Sample 10	B-cell(CD19+)	3.371	1
Sample 11	B-cell(CD19+ activated	0.0136	0
Sample 12	Neutrophes(CD14+)	1.234	0
Sample 13	T11 clone	2.613	0
Sample 14	T12 clone	35.8	0
Sample 15	HeLa229	0.33	0
Sample 16	HeLa229	10.4	0
Sample 17	Normal Bronchotracheal Epithelial Cells	3.615	1
Sample 18	Normal Bronchotracheal smooth muscle cell	0.0503	0
Sample 19	Normal lung fibroblast	24.4	0
Sample 20	Normal subcutaneous fibroblast	2.135	1
Sample 21	HeLa cell	21.6	1
Sample 22	HEK293	13.4	0
Sample 23	Jurat	79.2	2
Sample 24	HeLaS3	75.8	0
Sample 25	NR-90	215.3	271
Sample 26	HEK293	70.1	0

Fig. 14

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN CHEMOKINE-LIKE RECEPTOR

<130> LIO316 Foreign Countries

<150> US 60/254,923

<151> 2000-12-14

<150> US 60/280,110

<151> 2001-04-02

<150> US 60/299,474

<151> 2001-06-21

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1059

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1						
atggaggaca	cgcacgcca	cctcgccagcc	aacagctcg	tgtcttggtg	gtccccggc	60
tcggcctcg	gcttgggttt	cgtgcccgtg	gtctactaca	gcctcttgct	gtgcctcggt	120
ttaccagcaa	atatcttgac	agtgtatc	ctctccca	tggtgcaag	aagacagaag	180

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 2 -

tcttcctaca	actatcttt	ggcactcgct	gctggccgaca	tcttggct	ctttttcata	240
gtgtttgtgg	acttcctgtt	ggaagatttc	atcttgaaca	tgccatgtcc	tcagggtccc	300
gacaagatca	tagaagtgt	ggaattctca	tccatccaca	cctccatatg	gattactgt	360
cgcgttacca	ttgacaggta	tatcgctgtc	tgccacccgc	tcaagtacca	cacggctcata	420
tacccagccc	gcacccggaa	agtcatgtt	agtgtttaca	tccatgttgc	cctgaccaggc	480
atccccattt	actgggtggcc	caacatctgg	actgaagact	acatcagcac	ctctgtgt	540
cacgttccatca	tctggatcca	ctgttccacc	gtcttactgg	tgccctgtcc	catttttcc	600
atcttgaact	caatcattgt	gtacaagctc	aggaggaga	gcaattttcg	tctccgtggc	660
tactccacgg	ggaagaccac	cgccatcttg	tccacattta	cctccatctt	tgccacactt	720
tggggccccc	gcatcatcat	gattttttac	caccctctatg	gggcgcctat	ccagaaccgc	780
tggctggtag	acatcatgtc	cgacatttgc	aacatgttag	ccctttgaa	cacagccatc	840
aacttcttcc	tctactgttt	catcagcaag	cggttccgca	ccatggcage	cgccacgc	900
aaggcttctt	tcaagtgc	gaagcaacct	gtacagtct	acaccaatca	taacttttac	960
ataacaagta	gccccctggat	ctcgccggca	aactcacact	gcatcaagat	gctgggtgtac	1020
cagtagatgaca	aaaatggaaa	acctataaaa	gtatccccg			1059

<210> 2

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Glu	His	Thr	His	Ala	His	Leu	Ala	Ala	Asn	Ser	Ser	Leu	Ser	Trp
1							5		10					15	

Trp	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Cys	Gly	Leu	Gly	Phe	Val	Pro	Val	Val	Tyr
							20		25				30		

Tyr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ile	Leu	Thr	Val
							35		40			45			

Ile	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Val	Ala	Arg	Arg	Gln	Lys	Ser	Ser	Tyr	Asn
							50		55		60				

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 3 -

Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ile Leu Val Leu Phe Phe Ile
 65 70 75 80

Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Asn Met Gln Met
 85 90 95

Pro Gin Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val Leu Glu Phe Ser Ser Ile
 100 105 110

His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Ile
 115 120 125

Ala Val Cys His Pro Leu Lys Tyr His Thr Val Ser Tyr Pro Ala Arg
 130 135 140

Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile Thr Cys Phe Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Ile Pro Tyr Tyr Trp Trp Pro Asn Ile Trp Thr Glu Asp Tyr Ile Ser
 165 170 175

Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile His Cys Phe Thr Val Tyr
 180 185 190

Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu Asn Ser Ile Ile Val Tyr
 195 200 205

Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu Arg Gly Tyr Ser Thr Gly
 210 215 220

Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr Ser Ile Phe Ala Thr Leu
 225 230 235 240

Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr His Leu Tyr Gly Ala Pro
 245 250 255

Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met Ser Asp Ile Ala Asn Met
 260 265 270

Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe Phe Leu Tyr Cys Phe Ile
 275 280 285

Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala Thr Leu Lys Ala Phe Phe
 290 295 300

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 4 -

Lys Cys Gln Lys Gln Pro Val Gln Phe Tyr Thr Asn His Asn Phe Ser
 305 310 315 320

Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala Asn Ser His Cys Ile Lys
 325 330 335

Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly Lys Pro Ile Lys Val Ser
 340 345 350

Pro

<210> 3

<211> 355

<212> PRT

<213> Cercopithecus aethiops

<400> 3

Met Thr Thr Ser Leu Tyr Thr Val Glu Thr Phe Gly Pro Thr Ser Tyr
 1 5 10 15

Asp Asp Asp Met Gly Leu Leu Cys Glu Lys Ala Asp Val Gly Ala Leu
 20 25 30

Ile Ala Gln Phe Val Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Thr Val Gly
 35 40 45

Leu Leu Gly Asn Val Val Val Met Ile Leu Ile Lys Tyr Arg Arg
 50 55 60

Leu Arg Ile Met Thr Asn Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
 65 70 75 80

Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Glu
 85 90 95

His Asn Trp Val Phe Ser His Gly Met Cys Lys Val Leu Ser Gly Phe
 100 105 110

Tyr His Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
 115 120 125

Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
130 135 140

Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly Leu
145 150 155 160

Ala Val Leu Val Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Gly Thr Glu Glu
165 170 175

Leu Phe Pro Glu Thr Leu Cys Ser Ala Ile Tyr Pro Gln Asp Thr Val
180 185 190

Tyr Ser Trp Arg His Phe His Thr Leu Lys Met Thr Ile Leu Cys Leu
195 200 205

Ala Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys
210 215 220

Thr Leu Leu Lys Cys Pro Ser Lys Lys Tyr Lys Ala Ile Arg Leu
225 230 235 240

Ile Phe Val Ile Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
245 250 255

Val Ala Ile Leu Ile Ser Thr Tyr Gln Ser Ile Leu Phe Gly Leu Asp
260 265 270

Cys Glu Arg Ser Lys His Val Asp Leu Val Val Leu Val Thr Glu Val
275 280 285

Ile Ala Tyr Ser His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
290 295 300

Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg His Phe Phe His Arg His Val
305 310 315 320

Leu Met His Leu Gly Arg Tyr Ile Pro Phe Leu Pro Ser Glu Lys Leu
325 330 335

Glu Arg Thr Ser Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Glu Pro Glu Leu Cys
340 345 350

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 6 -

Ile Val Phe
355

<210> 4

<211> 1070

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4	
atgtatctga gaaccttagga ccaccctgggt gcatcaagat gcttccactc aaagaaggta	60
atggasgtcg tctgacttag gggacagatct cccatctccc acgctccccc ggggtatgc	120
tcattggatg gaatgcaaat atcttgacag tgatcatctt ctccccagctg gtggcaagaa	180
gacagaagtc ctcttacaac tatcttctgg cactcgtgtc tgccgacatc ttggctctt	240
ttttcatatgt gtttggtggac ttccctgttgg aagattttcat ctggacatg cagatgcctc	300
aggccccccga caagatcata gaaatgtgtgg aattttcatc catccacacc tccatatgg	360
ttactgttacc gtttaaccatt gacaggtata tcgctgtctg ccacecgctc aagtaccaca	420
cggttctatca cccagccccgc accccggaaag tcattgttaag tgtttacatc acctgtttcc	480
tgaccagcat ccccttattac tgggtggccca acatctggac tgaagactac atcagcacct	540
ctgtgcatac cgttcttcatc tggatccact gcttcaccgt ctacccgttg ccctgttcca	600
tctttttcat ctggactca atcattgtgt acaagctcag gaggaagagc aattttcgta	660
tccgtggctta ctccacgggg aagaccacccg ccatcttggt caccattacc tccatctttg	720
ccacactttg ggccccccgc atcatcatga ttctttatcca cctctatgg gggcccatcc	780
agaaccgtcg gctgggtgcac atcatgttccg acattggccaa catgttagcc ctgttgcaca	840
cagccatcaa ttctttcttc tactgtttca tcagcaagcg gttccgcacc atggcagccg	900
ccacgctca ggctttcttc aagtggccaga acaacccgt acagtttac accaatcata	960
acttttcat aacaaggatgc ccctggatct cgcggccaa ctcacactgc atcaagatgc	1020
tgggttacca gtagtacaaa aatggaaaac ctataaaaat atccccgtga	1070

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 7 -

<210> 5
<211> 1032
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
atgcttccac tcaaagaagt tcatggaaat cgctgactg agggacagat ctcccatctc 60
ccacgcgtcc cagggcgtat gctcatttag tgaaatgaa atatcttgc agtgcgtatc 120
ctctcccaagc tggggcaag aagacagaag tccctctaca actatctttt ggcactcgct 180
gctgccaca tcttggctt ctttttcata tggtttgtgg acttccctgtt ggaagatttc 240
atcttgaaca tgcagatgoc tcagggtcccc gacaagatca tagaagtgtt ggaattctca 300
tccatccaca cctccatatg gattactgtt ccgttaacca ttgacaggta tatacgctgtc 360
tgccaccccg tcaagttacca cacgttgcata taccggccg gacccggaa agtcatgtt 420
agtgtttaca tcaacctgtttt cctgaccgc atccccattt actgggtggcc caacatctgg 480
actgaagact acatcagcac ctctgtgtcat cacgttgcata tctggatcca ctgttccacc 540
gtctacatgg tgcctgtgtc catcttcttc atcttgcactt caatcattgtt gtacaagctc 600
aggaggaa gcaattttcg ttcctcggttcc tactccacgg ggaagacccat cgccatcttg 660
ttcaccatata cctccatattt tggccacactt tggggcccccc gcatcatcat gttttttac 720
cacctctatg gggcgcccat ccagaacccgc tgggtgggtgc acatcatgtc cgacattggcc 780
aacatgttag cccttctgaa cacagccatc aacttcttcc tctactgtttt catcagcaag 840
cggttccgc ccatggcagc cgccacgcgtc aaggctttctt tcaagtgcca gaagcaact 900
gtacagttctt acaccaatca taactttcc ataacaatgtt gcccctggat ctgcggcc 960
aactcacact gcatcaagat gctgggtgtac cagttatgaca aaaatggaaa acctataaaa 1020
gtatccccgt ga 1032

<210> 6
<211> 1826
<212> DNA
<213> Homo sapiens

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 80 -

```

<400> 6
tggctctat tttagggacca tatttgttga ttctaatgtt tctgagaact taggaccacc 60
ctggctcata aagatgttcc cactcaaga agttcatggg agtctgtca ctgaggggaca 120
gatctccat ctccccacgt ccccaagggg tatgtcttatt gagtggaaatg caaatatctt 180
gacagtgtac atctcttcc agctgggtggc aagaagacag aagtctccctt acsactatctt 240
cttggcactt gctgtgtcccg acatcttggt cctctttttt atatgtgtttt tggtacttctt 300
gttggaaatg ttcatcttga acatgcagat gcttcaggta coegacaaga tcatagaagt 360
gctggaaatc ttatccatcc acacatccat atggattactt gtaccgtttaa ccattgtacag 420
gtatatacgct gtctggccacc cgtctcaaga ccacacggc tcatacccg cccggcaccgg 480
gaaagtccattt gtaagtgtttt acatcacctg cttccctgtacc agcatccctt attactgtgt 540
gccaacatc ttggactgttggg actacatccatc cacccttgcgtt catcacgttcc tcatctggat 600
ccactgttcc accgttccatc ttgggtccctg ctccatcttcc ttcatcttgcgtt actcaatctt 660
tgtgttacaaatg ctcaggaggaa agagcaatttt tctgttccgtt ggctacttccaa cggggaaagac 720
caccggccatc ttgttccatcc ttacatccatc ttgttccaca ttgttccatcc ttgttccatcc 780
catgattttt taccacccatc atggggccgc catccagaac cgttgggttgc tgacatcat 840
gttccgacattt gccaacatgc tagcccttgc ttacacacggc atcaacttctt tcttctactgt 900
cttccatccgc aagccgttcc gcaaccatggc agccggccacg ctcaaggctt tcttcaagtg 960
ccagaacaa cctgttacatgtt tcttacacccaa ttcaactttt tccataacaaatg ttagccccctg 1020
gatctggccgc gcaaaacttcc acgttccatcc gatgtgttgcgtt tccactgttgc acaaaaatgg 1080
aaaacccatataaaatgttcc cgttccatcc taggtgttgc aactacttgc tctgttcaat 1140
ccatccatccgc atggggaaatgtt gtcaccatctt atggctgttgc agtctcttcc ttttccatcc 1200
atccgttccatcc ctgttccatcc cagactggc aatttccatcc ctggatgttgc agaagatgtt 1260
gaagagaaaga aaggagacaa tgaatgttgc ttttccatcc ttttccatcc ccaacagatgtt 1320
gtatgttccatcc cccaaatgttcc taccatgttgc aatgttccatcc tggatgttgc ttttccatcc 1380
tgtgttccatcc tggatgttgc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc 1440
cagtctacttgc gaaacccttca ttatgttgc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc 1500
ctgttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc 1560
taacaatataatgttcc gatgttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc 1620
ggatgttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc 1680
tttggatgttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc ttttccatcc 1740

```

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 9 -

gtgacctcaa acetggggtc taaaaggcag ttttctattt atcattatgt atagatttc 1800
 tctatctctt ccaaaacaaa gaccct 1826

<210> 7
<211> 356
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Tyr Leu Arg Thr Leu Gly Pro Pro Trp Cys Ile Lys Met Leu Pro
 1 5 10 15

Leu Lys Glu Val His Gly Ser Arg Leu Thr Glu Gly Gln Ile Ser His
 20 25 30

Leu Pro Arg Ser Pro Gly Arg Met Leu Ile Glu Trp Asn Ala Asn Ile
 35 40 45

Leu Thr Val Ile Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Arg Arg Gln Lys Ser
 50 55 60

Ser Tyr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Asp Ile Leu Val Leu
 65 70 75 80

Phe Phe Ile Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Asn
 85 90 95

Met Gln Met Pro Gln Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val Leu Glu Phe
 100 105 110

Ser Ser Ile His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu Thr Ile Asp
 115 120 125

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

Pro Ala Arg Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile Thr Cys Phe
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Ile Pro Tyr Tyr Trp Pro Asn Ile Trp Thr Glu Asp
 165 170 175

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 10 -

Tyr Ile Ser Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile His Cys Phe
 180 185 190

Thr Val Tyr Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu Asn Ser Ile
 195 200 205

Ile Val Tyr Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu Arg Gly Tyr
 210 215 220

Ser Thr Gly Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr Ser Ile Phe
 225 230 235 240

Ala Thr Leu Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr His Leu Tyr
 245 250 255

Gly Ala Pro Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met Ser Asp Ile
 260 265 270

Ala Asn Met Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe Phe Leu Tyr
 275 280 285

Cys Phe Ile Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala Thr Leu Lys
 290 295 300

Ala Phe Phe Lys Cys Gln Lys Gln Pro Val Gln Phe Tyr Thr Asn His
 305 310 315 320

Asn Phe Ser Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala Asn Ser His
 325 330 335

Cys Ile Lys Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly Lys Pro Ile
 340 345 350

Lys Val Ser Pro
 355

<210> 8

<211> 343

<212> PRT

<213> Homo sapiens

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 11 -

<400> 8

Met Leu Pro Leu Lys Glu Val His Gly Ser Arg Leu Thr Glu Gly Gln
 1 5 10 15

Ile Ser His Leu Pro Arg Ser Pro Gly Arg Met Leu Ile Glu Trp Asn
 20 25 30

Ala Asn Ile Leu Thr Val Ile Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Arg Arg
 35 40 45

Gln Lys Ser Ser Tyr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Asp Ile
 50 55 60

Leu Val Leu Phe Phe Ile Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe
 65 70 75 80

Ile Leu Asn Met Gln Met Pro Gln Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val
 85 90 95

Leu Glu Phe Ser Ser Ile His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu
 100 105 110

Thr Ile Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Leu Lys Tyr His Thr
 115 120 125

Val Ser Tyr Pro Ala Arg Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile
 130 135 140

Thr Cys Phe Leu Thr Ser Ile Pro Tyr Tyr Trp Trp Pro Asn Ile Trp
 145 150 155 160

Thr Glu Asp Tyr Ile Ser Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile
 165 170 175

His Cys Phe Thr Val Tyr Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu
 180 185 190

Asn Ser Ile Ile Val Tyr Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu
 195 200 205

Arg Gly Tyr Ser Thr Gly Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr
 210 215 220

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 12 -

Ser Ile Phe Ala Thr Leu Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr
 225 230 235 240

His Leu Tyr Gly Ala Pro Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met
 245 250 255

Ser Asp Ile Ala Asn Met Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe
 260 265 270

Phe Leu Tyr Cys Phe Ile Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala
 275 280 285

Thr Leu Lys Ala Phe Phe Lys Cys Gln Lys Glu Pro Val Gln Phe Tyr
 290 295 300

Thr Asn His Asn Phe Ser Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala
 305 310 315 320

Asn Ser His Cys Ile Lys Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly
 325 330 335

Lys Pro Ile Lys Val Ser Pro
 340

<210> 9

<211> 1062

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9
 atggaggaca cgcacgcccc cctcgcaagcc aacagctcgcc tgcctttgtg gtcccccggc 60
 tcggccctcgcc gcttgggttt cgtgccccgtg gtctactaca gccttgcgt gtgcctcggt 120
 ttaccagcaa atatcttgac agtgatcata ctatcccaagc tggggcaag aagacagaag 180
 tccctctaca actatctttt ggcactcgct gctgccccaca tcttgggtctt cttttccata 240
 gtgtttgtgg acttcttgcgtt ggaagatttc atcttgcaca tgcagatgc tcaggcccc 300
 gacaagatca tagaagtgtt gaaattctca tccatccaca cctccatatgtt gattactgtt 360
 ccgttaacca ttgacaggta tatacgctgtc tgccacccgc tcaagtttca cacggcttca 420
 taccctggcc gcaccttata ctgggtggcc aacatcttgc ctggaaactt catcggacc 480

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 13 -

tctgccccga aagtatttgt aagtgtttac atcacctgtc tctgaccag catctgtcat	540
cacgctctca tctggatcca ctgttttacc gtctacctgg tgccctgtc catcttttc	600
atcttgaact caatatttgt gtacaagctc aggaggaaga gcaattttcg tctccgtggc	660
tactccacgg ggaagaccac cgccatcttg ttccacatata cctccatctt tgccacactt	720
tggggccccc gcacatcatat gattttttac caccctttatg gggcgcccat ccagaaccgg	780
tggctggtaa acatcatgtc cgacattggcc aacatgttag cccttctgaa cacagccatc	840
aacttttcc tctactgtttt catcagcaag cggtecgca ccatggcagc cgccacgttc	900
aaggctttct tcaagtgcga gaagcaacctt gtacagttttctt acaccaatcc taacttttcc	960
ataacaatgtt gccccctggat ctcggggca aactcacactt gcatcaagat gctgggtgtac	1020
cagttatgaca aaaatggaaa acctataaaaa gtatccccgtt ga	1062

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Primer: LBRI_263_DNA-L1

<400> 10	
ctgctgccga catcttggtc ctct	24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 02/48358

PCT/EP01/14571

- 14 -

<220>

<221> misc_feature

<223> Primer: LBRI_263_DNA-R2

<400> 11
ggtacttgag cgggtggcag acag

24

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/048358 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/715, C12Q 1/68, C12N 15/62, G01N 33/68,
A61K 39/395, 31/7088, A61P 37/00, C12N 1/19, A61P
9/00(74) Common Representative: BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/14571

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EL, ES, H, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, H, IN, IS, JP, KU, KG, KP, KR, KZ, L, C,
L, K, I, R, T, S, IT, U, I, V, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PT, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, T, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(22) International Filing Date:
12 December 2001 (12.12.2001)(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, H, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BR, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(25) Filing Language: English

(88) Date of publication of the international search report:
27 March 2003

(26) Publication Language: English

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(30) Priority Data:
60/255,150 14 December 2000 (14.12.2000) US
60/280,110 2 April 2001 (02.04.2001) US
60/259,474 21 June 2001 (21.06.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).(85) Inventors:
with international search report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SMOLYAR, Alex
[US/US]; 734 Boylston Street, Brookline, MA 02467
(US); ZHU, Zhimin [CN/US]; 45 Hinckley Road, Waban,
MA 02468 (US); ENCINAS, Jeffrey [US/JP]; 3-17-15,
Ayamicke-ku, Nara 631-0032 (JP); WATANABE,
Shinichi [JP/JP]; 6-3-1-504 Jingu-cho, Nara-shi, Nara
631-0804 (JP); OKIGAMI, Hironi [JP/JP]; 7-1-1-8-204

WO 02/048358 A3

(54) Title: REGULATION OF HUMAN CTHIMOKINE-LIKE RECEPTOR

(57) Abstract: Reagents which regulate human chemokine-like receptor and reagents which bind to human chemokine-like receptor gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, HIV infection, cardiovascular disorders, asthma and COPD.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national Application No ruT/EP 01/14571									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/715 C1201/68 C12N15/62 G01N33/68 A61K39/395 A61K31/7088 A61P37/00 C12N1/19 A61P9/00											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBASE, EMBL											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 96 39434 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; LI YI (US); ROSEN CRAIG A (US); RUBEN S 12 December 1996 (1996-12-12) claims ---</td> <td>1-13, 15-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DATABASE EMBL 'Online! DB: JOINT GENOME INSTITUTE: "Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2264D9, complete sequence" retrieved from EBI Database accession no. AC021089 XP002221808 abstract --- -/-</td> <td>1-3, 21, 23</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 96 39434 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; LI YI (US); ROSEN CRAIG A (US); RUBEN S 12 December 1996 (1996-12-12) claims ---	1-13, 15-17	X	DATABASE EMBL 'Online! DB: JOINT GENOME INSTITUTE: "Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2264D9, complete sequence" retrieved from EBI Database accession no. AC021089 XP002221808 abstract --- -/-	1-3, 21, 23
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 96 39434 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; LI YI (US); ROSEN CRAIG A (US); RUBEN S 12 December 1996 (1996-12-12) claims ---	1-13, 15-17									
X	DATABASE EMBL 'Online! DB: JOINT GENOME INSTITUTE: "Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2264D9, complete sequence" retrieved from EBI Database accession no. AC021089 XP002221808 abstract --- -/-	1-3, 21, 23									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.									
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on novelty, claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) *O* document pertaining to an oral disclosure, use, exhibition or other manner *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
T later document published after the international filing date or priority date and in a different field of technology which may be used to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 21 November 2002		Date of mailing of the international search report 05/12/2002									
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5610 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommer, B									

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 01/14571

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LARHAMMAR D ET AL: "The receptor revolution - multiplicity of G protein-coupled receptors" DRUG DESIGN AND DISCOVERY, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, XX, vol. 9, no. 3/4, 1993, pages 179-188, XP000996559 ISSN: 1055-9612 the whole document	1-13, 15-67
Y	LEE N H ET AL: "Molecular biology of G protein-coupled receptors" DRUG NEWS AND PERSPECTIVES, XX, XX, vol. 6, no. 7, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 488-497, XP000677175 ISSN: 0214-0934 the whole document	1-13, 15-67
E	WO 01 94582 A (MATSUI HIDEKI ;TERAO YASUKO (JP); SHINTANI YASUSHI (JP); TAKEDA CH) 13 December 2001 (2001-12-13) abstract & DATABASE EMBL 'Online' Database accession no. BD103851, AAU76416 abstract	1-13, 15-67
P,X	WO 01 70978 A (SPADERNA STEVEN K ;VERNET CORINE A M (US); MEZES PETER S (US); CUR) 27 September 2001 (2001-09-27) claims & DATABASE EMBL 'Online' Database accession no. AX254975, AX254977, AX254978, AX255016 abstract	1-13, 15-67
E	WO 02 10387 A (HAFALIA APRIL J A ;INCYTE GENOMICS INC (US); KALLICK DEBORAH A (US) 7 February 2002 (2002-02-07) claims & DATABASE EMBL 'Online' Database accession no. AX375235, AX375216 abstract	1-13, 15-67

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

International Application No. PCT/EP 01 A4571

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 14, 68-71

Present claims 14 and 68-71 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the ability to modulate the activity of a chemokine-like receptor. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for none of such compounds rendering a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. The same applies also to parts of other claims referring to claim 14. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/14571
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 14, 68-71 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 		
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/14571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9639434	A 12-12-1996	CA 2221274 A1 US 5776729 A WO 9639434 A1 AU 2766395 A EP 0832125 A1 JP 11507501 T US 2002019026 A1	12-12-1996 07-07-1998 12-12-1996 24-12-1996 01-04-1998 06-07-1999 14-02-2002
WO 0194582	A 13-12-2001	AU 6069101 A WO 0194582 A1	17-12-2001 13-12-2001
WO 0170978	A 27-09-2001	AU 4592001 A EP 1232266 A2 WO 0170978 A2	03-10-2001 21-08-2002 27-09-2001
WO 0210387	A 07-02-2002	AU 8078501 A WO 0210387 A2 AU 8693501 A WO 0218581 A2	13-02-2002 07-02-2002 13-03-2002 07-03-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/04	A 6 1 K 48/00		4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/06	A 6 1 P 9/04		4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/06		
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10		
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 9/12		
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/14		
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/02		
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 31/18		
C 0 7 K 14/715	A 6 1 P 37/08		
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 14/715		
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00		
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19		
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 P 21/02	C	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/02		
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	A	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D	
	G 0 1 N 33/53	M	
	G 0 1 N 33/566		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アレックス・スマリヤー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州ブラックライン、ボイルストン・ストリート 734 番

(72)発明者 ジュ・ジミン

アメリカ合衆国 0 2 4 6 8 マサチューセッツ州ワバン、ヒンクリー・ロード 45 番

(72)発明者 ジェフリー・エンシナス

奈良県奈良市あやめ池北 3 - 17 - 15

(72)発明者 渡辺 信一

奈良県奈良市神功 6 - 3 - 1 - 504

(72)発明者 沖上 裕美

京都府相楽郡木津町相楽台 7 - 1 - 1 - 8 - 204

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA07 CA12 DA02 DA05 DA06 DA11
DA12 EA04 GA11 HA12

4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34
QX02 QX07
4B064 AG20 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA16 NA14 ZA341 ZA361 ZA381 ZA401 ZA421 ZA591 ZA891
ZB131 ZB331 ZC551
4C085 AA13 AA14 CC23
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA66 NA14 ZC80
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA34 ZA36 ZA38 ZA40 ZA42 ZA59
ZA89 ZB13 ZB33 ZC55
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA51 EA23 EA50 FA74