

(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2004-531226
(P2004-531226A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 31/7088
A61K 38/00
A61K 39/395
A61K 45/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 31/7088
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00

Z N A A
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00

テーマコード (参考)
2 G O 4 5
4 B O 2 4
4 B O 6 3
4 B O 6 4
4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 246 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-559589 (P2002-559589)
(86) (22) 出願日 平成14年1月21日 (2002.1.21)
(85) 翻訳文提出日 平成15年7月28日 (2003.7.28)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2002/000540
(87) 國際公開番号 WO2002/059302
(87) 國際公開日 平成14年8月1日 (2002.8.1)
(31) 優先権主張番号 60/264,071
(32) 優先日 平成13年1月26日 (2001.1.26)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/324,054
(32) 優先日 平成13年9月24日 (2001.9.24)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 591063187
バイエル アクチエンゲゼルシャフト
ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン (
番地なし)
D - 5 1 3 6 8 L e v e r k u s e n ,
G e r m a n y
(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】ヒトセロトニン様Gタンパク質共役レセプターの調節

(57) 【要約】

ヒトセロトニン様Gタンパク質共役型レセプター(5-HT様GPCR)を調節する試薬およびヒト5-HT様GPCR遺伝子産物に結合する試薬は、COPD、心疾患、癌、泌尿器系の疾患、肥満症、糖尿病、CNS障害、喘息または血液疾患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】**

以下からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド：

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 27% 同一なアミノ酸配列；および
配列番号 2 に示すアミノ酸配列

からなる群から選択される、セロトニン様 G タンパク質共役型レセプターをコードするポリヌクレオチド；

b) 配列番号 1 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ェ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、セロトニン様 G タンパク質共役型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；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し、セロトニン様 G タンパク質共役型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。

【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、実質上精製されたセロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G タンパク質共役型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) セロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G タンパク質共役型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 に記載のセロトニン様 G タンパク質共役型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 に記載のセロトニン様 G タンパク質共役型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。

【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セロ

10

20

30

40

50

トニン様 G タンパク質共役型レセプターポリペプチドと接触させ；
セロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G タンパク質共役型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 1 1】

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セロトニン様 G タンパク質共役型レセプターポリペプチドと接触させ；そして、

該ポリペプチドのセロトニン様 G タンパク質共役型レセプター活性を検出する工程、 10

を含む、セロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G タンパク質共役型レセプター活性を増大させる被験化合物を、セロトニン様 G タンパク質共役型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セロトニン様 G タンパク質共役型レセプター活性を低下させる被験化合物を、セロトニン様 G タンパク質共役型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 1 2】

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、セロトニン様 G タンパク質共役型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、セロトニン様 G 20

タンパク質共役型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 1 3】

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 に記載の任意のセロトニン様 G タンパク質共役型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、それによりセロトニン様 G タンパク質共役型レセプターの活性を減少させる工程、

を含む、セロトニン様 G タンパク質共役型レセプターの活性を減少させる方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 0 から 1 2 のいずれかに記載の方法によって同定される、セロトニン様 G タンパク質共役型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。 30

【請求項 1 5】

請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 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 1 6】

疾患におけるセロトニン様 G タンパク質共役型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 1 4 に記載の試薬の使用。

【請求項 1 7】

疾患が C O P D 、心疾患、癌、泌尿器系の疾患、肥満症、糖尿病、C N S 障害、喘息または血液疾患である、請求項 1 6 に記載の使用。 40

【請求項 1 8】

配列番号 2 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 1 9】

配列番号 1 を含む請求項 1 8 に記載の c D N A 。

【請求項 2 0】

配列番号 1 より成る請求項 1 8 に記載の c D N A 。

【請求項 2 1】

配列番号 2 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 2 2】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 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 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 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 に示すアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド。

【請求項 2 6】

配列番号 2 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。 10

【請求項 2 7】

配列番号 2 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 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。

【請求項 2 9】

発現ベクターが配列番号 1 を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

配列番号 1 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 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增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 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 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 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。

【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 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 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 27 % 一致するアミノ酸配列、および(2) 配列番号 2 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、セロトニン様 G タンパク質共役型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セロトニン 50

様 G タンパク質共役型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 3 7】

接触させる工程が細胞内においてである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

細胞がインビトロである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

該ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項 3 6 に記載の方法。 10

【請求項 4 1】

被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

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 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 3】

該ポリペプチドが固体支持体に結合している、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 4】

被験化合物が固体支持体に結合している、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 5】

被験化合物を、(1)配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 27% 一致するアミノ酸配列、および(2)配列番号 2 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、ヒトセロトニン様 G タンパク質共役型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、ヒトセロトニン様 G タンパク質共役型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、ヒトセロトニン様 G タンパク質共役型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。 30

【請求項 4 6】

接触させる工程が細胞においてである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

細胞がインビトロである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

被験化合物を、配列番号 1 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、ヒトセロトニン様 G タンパク質共役型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セロトニン様 G タンパク質共役型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。 40

【請求項 5 0】

該産物がポリペプチドである、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

該産物が RNA である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞を、配列番号 1 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 50

いる産物に特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒトセロトニン様Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を減少させる工程、

を含む、ヒトセロトニン様Gタンパク質共役型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RNA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 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；および、製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

20

【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 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 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 を含む、請求項 6 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 8】

COPD、心疾患、癌、泌尿器系の疾患、肥満症、糖尿病、CNS障害、喘息または血液疾患からなる群から選択される、セロトニン様Gタンパク質共役型レセプター機能不全に関連する疾患を処置する方法であって、ヒトセロトニン様Gタンパク質共役型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、それによりセロトニン様Gタンパク質共役型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。

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、Gタンパク質共役型レセプターの分野に関する。より具体的には、本発明はヒトセロトニン様Gタンパク質共役型レセプターおよびその調節に関する。

【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の具体的な例には、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単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。

【0004】

システイン残基の燐酸化および脂質化 (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燐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燐酸化によってレセプターの脱感作が仲介される。

【0005】

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、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。

【0006】

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役立っている (Johndon et al., *Endoc. Rev.* 10, 317 - 331, 1989を参照されたい)。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の細胞質残基の燐酸化は、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。

10

20

30

40

50

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と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。

【0007】

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（不安生、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ゥレット症候群など）を包含する（但しこれら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。

10

【0008】

セロトニン

セロトニンは、1つの、睡眠、欲求、移動、性行為および管の短縮のような種々様々の行動の機能を引き起こし調整することができる。40年以上前のセロトニン(5-セロトニン、5-HT)の発見以来、多くの種々の研究の累積的な結果は、哺乳類の身体の、両方の中権神経系中の、および周辺のシステム中の機能際に、セロトニンが重要な役割を果たすことを示した。中枢神経系に関する形態論的研究は、セロトニン作動性のニューロン(それらは脳幹から起こる)が生ずることを示した、1つの、脳および脊髄(オブライアン、精神の異常1:41, 1978のセロトニン; Steinbusch、「化学の神経解剖学のハンドブック」、部分II、68、1984年(ボリューム3); Andenら、Acta Physiologicaスカンジナビア67、313、1966年)のほとんどのエリアへ突き出るシステムを非常に拡散する。これらの研究は、5-HTの大きな集中を示す、生化学の証拠によって補足された、脳および脊髄(Steinbusch、1984年)に存在する。米国特許第5,698,444号を参照。

20

30

【0009】

そのような拡散したシステムで、中枢神経系から起こる多くの振る舞い、生理学のレスポンスおよび疾病的表現に関係するとともに、5-HTが関係させられたことは驚くべきことはない。これらは、体温、コントロールする血圧、低下、精神分裂病および他の肉体の状態(フラー、セロトニン作動性の送信21、1982の生物学; Boullin、精神の異常1、316、1978年中のセロトニン; Barchasら、SEROTONIN AND BEHAVIOR、1973年)をコントロールして、眠っており食べて、知覚する苦痛のような種々のエリアを含んでいる。

40

【0010】

セロトニンは、周辺のシステムに同様に重要な役割を果たす。例えば、身体のセロトニンのおよそ90%は胃腸のシステムで見つかります。また、セロトニンは、このシステムでの様々な収縮性のある結果、分泌の結果および電気生理学を用いた結果を解決させると分かりました。セロトニンに非常に敏感な周辺のネットワークの別の例は心臓血管系(さらに、それはセロトニン(つまり小板)のそれ自身の源を含んでいる)である。

【0011】

身体内のセロトニンの広い分配を与えられて、セロトニン作動性のシステムに影響する薬へのtremendousな关心が存在することは理解し得ます。レセプターに特有の作動筋および敵は、心配、うつ病、高血圧症、片頭痛、強制的な病気、精神分裂病、自閉症、アルツハイマー病のような神経組織変成の病気、パーキンソン症候群およびハンチントン舞蹈病を含む広範囲の病気および癌の治療に特に興味がある、化学療法に引き起こされた噴出すること(Gershonら、5-セロトニン246、1989のアクション;)Saxena、心血管の薬物学、補

50

足7、990 15のジャーナルら。

【0012】

セロトニンレセプター

セロトニンは、セル表面上の専門のレセプターに拘束することによりセルの生理学に対するその影響を生む。セロトニンを含むすべての神経伝達物質およびホルモンのために多数のタイプのレセプターが存在することは今認識される。多数で、構造上別個のセロトニンレセプターの存在は、サブタイプ選択的な薬理学の薬剤が生産される可能性を提供した。個々のレセプターサブタイプが中央の周辺のセロトニン作動性のシステムの異なる部分の特定のアクションに影響するために機能するかもしれない、そのような合成物の開発は、より少数の副作用を持った新しく、ますます選択的な治療の薬剤に帰着するかもしれません。10

【0013】

そのような特異性の例は、例として脈管系を使用することにより実証することができます。ある血管では、平滑筋セル上の5-HT2レセプターの刺激が血管収縮を生産している一方、5-HT1の刺激はレセプターのようにendo-thelialセル上で血管拡張を生産する。現在、セロトニンレセプター(5-HT1、5つのHT2、5つのHT3、5つのHT4、5つのHT5、5つのHT6および5-HT7)の主なクラスは、それらの薬学構造の違いに基づいて、形式的に分類された、18の別個のレセプターに約14を含んでいる(Glenonら、神経科学、および行動の調査14、35、1990年を参照)。20

【0014】

今まで記述された5-HTレセプターは、イオン・チャンネル(5-HT3レセプター)に関連したレセプターの家族が、あるいはG蛋白質と対話し、それは7つの膜内外の領域を所有するレセプターの家族が所有している。さらに、アミノ酸シーケンスの分析は、G蛋白質と対話する5-HTレセプターが2つの別個のグループへ細分されるかもしれないことを示した:3つのショウジョウバエ5-HTレセプター、およびサブタイプ5-HT2および5つのHT1Cを含む5-HT2レセプターと同様に哺乳類のサブタイプ5-HT1A、5つのHT1Bおよび5-HT1Dを含む5-HT1レセプターも。薬学の研究は、サブタイプ5-HT1(「5-HT1のような」レセプター)と関係するいくつかのレセプターと同様に5-HT4レセプターのような他のサブタイプも明らかにした。更に、追加の分子生物学研究は、サブタイプ5-HT1B/1Dの内の異成分を明らかにした。30

【0015】

5-HT2レセプターはホスホリパーゼCによって作用し、中央と周辺のレベルにセロトニンの多数の生理学的活動の原因である。心血管のレベルでは、それらが、血管の短縮および小板の形態論の変更に関係する;中枢神経系では、それらが、触覚の刺激へのニューロンの増感に、およびdiethylamidelysergicな酸の、および関連するphenylisopropylaminesの幻覚を誘発する影響の仲裁に作用する。多数の研究は、今まで記述された5-HT2レセプターがそれらが起因するすべての特性を説明しないことを示す。周辺の平滑筋に対するセロトニンのある5-HT2型影響は、特に、変則的な結果(結果はそれに未知のレセプターによって解決すると思われる)として分類される。米国特許5,780,245を参照。40

【0016】

セロトニンの広範囲にわたる生物学的效果のために、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】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

発明の要旨

本発明の目的は、ヒトセロトニン様Gタンパク質共役レセプター1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。50

【 0 0 1 8 】

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 27% 同一なアミノ酸配列；

配列番号 2 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セロトニン様 G タンパク質共役レセプターポリペプチドである。

【 0 0 1 9 】

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 27% 同一なアミノ酸配列；

10

配列番号 2 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セロトニン様 G タンパク質共役レセプターポリペプチドと接触させる。

【 0 0 2 0 】

被験化合物とセロトニン様 G タンパク質共役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、セロトニン様 G タンパク質共役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。この物質はセロトニン様 G タンパク質共役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。

【 0 0 2 1 】

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；および

20

配列番号 1 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、セロトニン様 G タンパク質共役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。

【 0 0 2 2 】

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、セロトニン様 G タンパク質共役レセプター m R N A との相互作用を介してセロトニン様 G タンパク質共役レセプターの量を減少させることによって作用し得る。

30

【 0 0 2 3 】

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 27% 同一なアミノ酸配列；

配列番号 2 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セロトニン様 G タンパク質共役レセプターポリペプチドと接触させる。

【 0 0 2 4 】

ポリペプチドのセロトニン様 G タンパク質共役レセプター活性を検出する。ポリペプチドのセロトニン様 G タンパク質共役レセプター活性を、試験化合物不在下でのセロトニン様 G タンパク質共役レセプター活性と比較して増加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。ポリペプチドのセロトニン様 G タンパク質共役レセプター活性を、その試験化合物の不在下でのセロトニン様 G タンパク質共役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。

40

【 0 0 2 5 】

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、

50

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；

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セロトニン様 G タンパク質共役レセプター産物と接触させる。

【 0026 】

このセロトニン様 G タンパク質共役レセプター産物に対する試験化合物の結合を検出する。このセロトニン様 G タンパク質共役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。

【 0027 】

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；

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、セロトニン様 G タンパク質共役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。

【 0028 】

細胞中のセロトニン様 G タンパク質共役レセプター活性は、それにより減少する。

【 0029 】

このように、本発明は、そのレセプターの活性部位でアゴニストまたはアンタゴニスト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セロトニン様 G タンパク質共役レセプターを提供する。ヒトセロトニン様 G タンパク質共役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リガンドの結合を効果的に阻止することができる特異的な抗体を惹起するのに有用でもある。

【 0030 】

(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 27 % 同一なアミノ酸配列；

配列番号 2 に示すアミノ酸配列；

からなる群から選択されるアミノ酸を含むセロトニン様 G タンパク質共役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；

b) 配列番号 1 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ジエントな条件下でハイブリダイズし、セロトニン様 G タンパク質共役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；

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り、セロトニン様 G タンパク質共役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； 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し、セロトニン様 G タンパク質共役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。

【 0031 】

さらに、本発明者によって、新規な 5 - H T 様 G P C R 、特にヒト 5 - H T 様 G P C R は、C O P D 、心臓血管障害、癌、泌尿器系の障害、肥満症、糖尿病、C N S 障害、喘息または血液病を処置するための治療方法に用いることができることが発見された。ヒト 5 - H T 様 G P C R は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む。ヒト 5 - H T 様 G P C R のコードは入れ T は、配列番号 1 に示す。この配列は、配列番号 4 に示すより長い配列の中に含まれる。この配列は、第 2 染色体に存在しており、G e n e s c a n またはG e n e i d を用いて受託番号 A C 0 6 8 0 8 1 0 のゲノム配列から構築された。

【 0032 】

ヒト 5 - H T 様 G P C R は、swiss | P28222 | 5H1B_ヒト 5 - ヒドロキシ TRYPTアミン 1B レセ

10

20

30

40

50

プター (5-HT-1B) (セロトニンレセプター) (配列番号3) (図5)に対して272アミノ酸にわたって同一である。Pfamによって、図10に示す7回貫通膜貫通モチーフが検出された。

【0033】

本発明のヒト5-HT様GPCRは、これまでに同定されたセロトニンレセプターと同じ目的に有用であると考えられる。ヒト5-HT様GPCRは、COPD、心臓血管障害、癌、泌尿器系障害、肥満症、糖尿病、CNS障害、喘息および血液病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5-HT様GPCRはさらに、ヒト5-HT様GPCRアクチベーターまたはインヒビターをスクリーニングするために用いることもできる。

10

【0034】

5-HT様GPCRポリペプチド

本発明の5-HT様GPCR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または以下に定義するその生物学的に活性な変異体から選択される、少なくとも6、810、12、15、18、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、または347個の連続したアミノ酸を含む。したがって、本発明の5-HT様GPCRポリペプチドは、5-HT様GPCRポリペプチドの一部、完全長の5-HT様GPCRタンパク質、または5-HT様GPCRの全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。配列番号2のコード配列は、配列番号1に示される。

20

【0035】

生物学的に活性な変異体

生物学的に活性な、即ちセロトニンまたはセロトニン様リガンドが結合して生物学的效果、例えばAMP形成、細胞内カルシウムの移動、またはホスホイノシチド代謝等、をもたらす能力を保持する5-HT様GPCRポリペプチド変異体もまた、5-HT様GPCR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セロトニン様GPCRポリペプチド変異体は、配列番号2に示すアミノ酸配列またはその断片と少なくとも約27、30、35、40、45、50、55、60、65、70%、好ましくは約75、80、85、90、95、96、97、98、または99%一致するアミノ酸配列を有する。

推定される5-HT様GPCRポリペプチド変異体と配列番号2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に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)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

30

40

50

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, ギャップオーブニングペナルティ=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もできる。ヌ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、その他のパラメータは既定値である。10

【0036】

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。

【0037】

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。5-HT様GPCR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5-HT様GPCRポリペプチドを生成するか否かは、例えば、以下の特定の実施例に記載されているようにリガンドに対する結合をアッセイすることによりまたは機能的アッセイを行うことにより容易に決定できる。20

【0038】

融合タンパク質

融合タンパク質は、5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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プラリーに基づく検定、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。30

【0039】

5-HT様GPCR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から選択される、6、8 10、12、15、18、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、または347の連続アミノ酸を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長5-HT様GPCRタンパク質を含むことができる。40

【0040】

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50

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 c 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、5-HT 様 GPCR ポリペプチドコード配列とヘテロロ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5-HT 様 GPCR ポリペプチドが開裂して、ヘテロロガス部分から精製することができる。

【0041】

10

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。

【0042】

20

種相同意体の同定

5-HT 様 GPCR 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、5-HT 様 GPCR ポリペプチドの相同意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5-HT 様 GPCR ポリペプチドの種相同意体を得ることができる。

【0043】

30

5-HT 様 GPCR ポリヌクレオチド

5-HT 様 GPCR ポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であってよく、5-HT 様 GPCR 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。5-HT 様 GPCR のコード配列は配列番号3に示す。

【0044】

40

ヒト5-HT 様 GPCR 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に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%、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、5-HT 様 GPCR 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、種相同意体および生物学的に活性な5-HT 様 GPCR ポリペプチドをコードしている5-HT 様 GPCR ポリヌクレオチドの変異体もやはり5-HT 様 GPCR ポリヌクレオチドである。配列番号1の少なくとも6、7、8、9、10、12、15、18、20、または25の連続したヌクレオチドまたはその相補物を含むポリヌクレオチドもまた5-HT 様 GPCR ポリヌクレオチドである。そのようなポリヌクレオチドを、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることができる。

【0045】

50

5-HT 様 GPCR ポリヌクレオチドの変異体および相同意体の同定

上記の 5 - HT 様 GPCR ポリヌクレオチドの変異体および相同体もまた 5 - HT 様 GPCR ポリヌクレオチドである。典型的には、5 - HT 様 GPCR 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 5 - HT 様 GPCR 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 - - 2 X SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、0.1% SDS、室温 2 回、各々 30 分間；次いで 2 X SSC、0.1% SDS、50 1 回、30 分間；次いで 2 X SSC、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。

10

【0046】

本明細書に開示する 5 - HT 様 GPCR 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。5 - HT 様 GPCR 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 は相同意が 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 5 - HT 様 GPCR ポリヌクレオチドの変異体または他の種の 5 - HT 様 GPCR ポリヌクレオチドは、推定のホモローガス 5 - HT 様 GPCR 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 5 - HT 様 GPCR 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。

20

【0047】

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 5 - HT 様 GPCR 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 5 - HT 様 GPCR 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。

30

【0048】

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 3 に示すヌクレオチド配列を有する 5 - HT 様 GPCR 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 :

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

40

[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。

【0049】

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。

【0050】

ポリヌクレオチドの調製

天然の 5 - HT 様 GPCR 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

50

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（P C R）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任意の技術を用いて、単離された5 - H T様G P C R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5 - H T様G P C R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。

【0051】

5 - H T様G P C R c D N A分子は、5 - H T様G P C R m R N A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5 - H T様G P C R c D N A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D N Aまたはc D N A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、P C Rのような増幅技術を用いることができる。

10

【0052】

別法として、合成化学技術を用いて5 - H T様G P C R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2に示すアミノ酸配列を有する5 - H T様G P C R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。

20

【0053】

ポリヌクレオチドの伸長

P C R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P C R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, PCR Methods Applic. 2, 318 - 322, 1993)。まず、ゲノムD N A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P C Rに付す。各回のP C Rの産物を適当なR N A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。

30

【0054】

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P C R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G C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、P C R鑄型として使用する。

40

【0055】

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D N A中の既知配列に隣接するD N A断片のP C R増幅を含む、捕捉P C Rである(Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1, 111 - 119, 1991)。この方法では、複数の制限酵素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、P C Rを行う前にそのD N A分子の未知断片中に入れることができる。

【0056】

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、P C R、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D N A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

50

プ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。

【 0 0 5 7 】

完全長 c D N A に対してスクリーニングする場合、より大きな c D N A を含むようサイズ選択したライプ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プラリーが好ましい。無作為プライミングしたライプラリーの使用は、オリゴ d (T) ライプラリーが完全長 c D N A を產生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライプラリーは、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。

【 0 0 5 8 】

市販品が入手可能な毛細管電気泳動系を用いて、 P C R 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ます。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 D N A の小片を配列決定するのに特に好ましい。

【 0 0 5 9 】

5 - H T 様 G P C R ポリペプチドの取得

5 - H T 様 G P C R ポリペプチドは、例えばヒト細胞からの精製によって、 5 - H T 様 G P C R 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。

【 0 0 6 0 】

タンパク質精製

ヒト 5 - H T 様 G P C R ポリペプチドは、 5 - H T 様 G P C R ポリヌクレオチドでトランスフ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 5 - H T 様 G P C R ポリペプチドは、細胞内の 5 - H T 様 G P C R 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。

【 0 0 6 1 】

5 - H T 様 G P C R ポリペプチドは、以下の特定の実施例に記載するように、 G タンパク質が会合した複合体として便利に単離することができる、精製 5 - H T 様 G P C R 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 S D S - 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。

【 0 0 6 2 】

5 - H T 様 G P C R ポリヌクレオチドの発現

5 - H T 様 G P C R 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 5 - H T 様 G P C R ポリヌクレオチドを挿入することができる。 5 - H T 様 G P C R 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 D N A 技術、合成技術、およびインビオ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。

【 0 0 6 3 】

様々な発現ベクター / 宿主系が、 5 - H T 様 G P C R ポリペプチドをコードしている配列

10

20

30

40

50

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包含されるがこれらに限定される訳ではない。

【0064】

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 10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。5-HT様GPCR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。

【0065】

細菌および酵母発現系

細菌系では、5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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。BLUE 30SCRIPTベクターにおいては、5-HT様GPCR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産生される。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。

【0066】

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。

【0067】

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、5-HT様GPCR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、CaM

10

20

30

40

50

V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仲介トランسفエ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、MCRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp191-196,1992)。

10

【0068】

昆虫系もまた5-HT様GPCR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。5-HT様GPCR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。5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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)。

20

【0069】

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5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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E1またはE3領域における挿入を用いて、感染宿主細胞において5-HT様GPCR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。

30

【0070】

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)。

40

【0071】

さらに、5-HT様GPCR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)。5-HT様GPCR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するために、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)。

50

【0072】

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5-HT様GPCR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、グリコシリ化、磷酸化、脂質化、およびアシリ化が含ま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。

【0073】

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5-HT様GPCR 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、常套的トランスフェクション法、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、磷酸カルシウム等によって安定にトランスフェクトされ得る。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5-HT様GPCR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ランは、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。

【0074】

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。

【0075】

これらには、それぞれtk⁻またはapr⁻細胞で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler et al., Cell 11, 223-32, 1977) およびアデニンホスホリボシリトランスフェラーゼ (Lowy et al., Cell 22, 817-23, 1980) 遺伝子が含ま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)。

【0076】

発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在は5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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5-HT様GPCRポリペプチドをコードしている配列とタンデム

10

20

30

40

50

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、5-HT様GPCRポリヌクレオチドの発現を示す。

【0077】

これとは別に、5-HT様GPCRポリヌクレオチドを含み5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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增幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、5-HT様GPCRポリヌクレオチドを含む形質転換体を検出するための、5-HT様GPCR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。10

【0078】

5-HT様GPCR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、酵素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。5-HT様GPCR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。20

【0079】

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。5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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。これらの方法は、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、酵素、および蛍光、化学ルミネセンス、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。30

【0080】

ポリペプチドの発現および精製

5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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5-HT様GPCRポリペプチドの分泌を指令する、または膜結合5-HT様GPCR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。

【0081】

上に論じたように、他の組み立て物を用いて、5-HT様GPCRポリペプチドをコード40

10

20

30

40

50

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5-HT様GPCR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利用できる。このような発現ベクターの1つは、5-HT様GPCR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., Pro. 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5-HT様GPCR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。10

【0082】

化学合成

5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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。20

【0083】

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ィー(例えば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5-HT様GPCR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(例えばエドマン分解法; Creighton、上記を参照されたい)。さらに、直接合成中に5-HT様GPCR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来の配列と合して、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。30

【0084】

改变5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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。例えば、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、例えば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。40

【0085】

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、5-HT様GPCR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。例えば、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、グリコシリ化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調50

製し、突然変異を導入する等を実施できる。

【0086】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、5-HT様GPCR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、例えばFab、Fab'(ab')₂、およびFvを包含し、これらは5-HT様GPCR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、例えば少なくとも15、25、または50のアミノ酸を必要とするかも知れない。

10

【0087】

5-HT様GPCR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、例えば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。

20

【0088】

典型的には、5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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、5-HT様GPCRポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

20

【0089】

ヒト5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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、フ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BCG (bacilli Calmette - Guerin) およびCorynebacterium parvumが特に有用である。

30

【0090】

5-HT様GPCR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)。

40

【0091】

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

50

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。5-HT様GPCR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。

【0092】

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、5-HT様GPCR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)。

10

【0093】

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)。一本鎖抗体は単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。

20

【0094】

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)。

20

【0095】

5-HT様GPCR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)。

30

【0096】

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。

【0097】

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、5-HT様GPCR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。

40

【0098】

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すれかを遮断する。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

50

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5-HT様GPCR遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

【0099】

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'末端と共有結合されることにより、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; Uhmann et al., Chem.Rev. 90, 543 - 583, 1990を参照されたい。10

【0100】

5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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。20

【0101】

アンチセンスオリゴヌクレオチドと5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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。30

【0102】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-HT様GPCR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; Uhmann et al., Chem.Rev. 90, 543 - 584, 1990; Uhmann et al., Tetrahedron.Lett. 215, 3539 - 3542, 1987を参照されたい。40

【0103】

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。

【0104】

10

5-HT様GPCRポリヌクレオチドのコード配列、例えば配列番号3に示したヌクレオチド配列を用いて、5-HT様GPCR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）。

【0105】

20

5-HT様GPCR 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5-HT様GPCR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3に示すヌクレオチド配列およびその相補物は、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、完全に相關している。

30

【0106】

40

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、リボソーム仲介トランスフェクション、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、5-HT様GPCR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望まれる場合は、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。

【0107】

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。

【0108】

区別的に発現される遺伝子

遺伝子産物がヒト5-HT様GPCRポリペプチドと相互作用する遺伝子の同定方法をこ

50

こに記載する。このような遺伝子は、COPD、心臓血管障害、癌、泌尿器系障害、肥満症、糖尿病、CNS障害、喘息および血液病を包含する（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5-HT様GPCR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。

【0109】

10

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。

【0110】

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。

【0111】

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）およびマイクロアレイが含まれる。

【0112】

区別的発現の情報はこれ自体、ヒト5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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。

【0113】

40

スクリーニング方法

本発明は、5-HT様GPCRポリペプチドまたは5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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、5-HT様GPCRが介在するセトロニンまたはセロトニンアナログの効果を、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。

【0114】

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

50

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。10

【0115】

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. Natl. 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。20

【0116】

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、5-HT様GPCR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5-HT様GPCRタンパク質活性もしくは5-HT様GPCR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、ピベット、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。30

【0117】

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。40

【0118】

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ーーゼのための単純な均質酵素検定をアガロースゲルの内部に入れ、その結果ゲル中の酵素がゲル全体に色の変化を惹起するようにさ50

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。酵素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。

【0119】

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、組み合わせライブリリーを、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。

【0120】

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。

【0121】

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5-HT様GPCR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。本発明のポリペプチドに結合する可能性のあるリガンドとしては、既知の5-HT様GPCRの天然のリガンドおよびそのアナログもしくは誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。

【0122】

結合検定では、被験化合物または5-HT様GPCR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）を含むことができる。そこで、5-HT様GPCR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。

【0123】

別法として、5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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）。

【0124】

被験化合物が5-HT様GPCR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。

【0125】

本発明のさらに別の態様では、5-HT様GPCR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Bren

10

20

30

30

40

50

t W094/10300) における「おとりタンパク質」として使用し、5-HT 様 GPCR 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。

【0126】

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、5-HT 様 GPCR 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ボ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、5-HT 様 GPCR 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。

【0127】

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、5-HT 様 GPCR 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5-HT 様 GPCR 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、またはガラスビーズを包含するがこれらに限定されない)のよ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5-HT 様 GPCR 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。5-HT 様 GPCR 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。

【0128】

一つの態様において、5-HT 様 GPCR ポリペプチドは、5-HT 様 GPCR 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5-HT 様 GPCR 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。

【0129】

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、5-HT 様 GPCR 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

10

20

30

40

50

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5-HT様GPCR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-NHS（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、5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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。

【0130】

10

GST-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、5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR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SDSゲル電気泳動がある。

【0131】

5-HT様GPCR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。5-HT様GPCR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。5-HT様GPCR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。5-HT様GPCR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。

20

【0132】

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5-HT様GPCRポリペプチド、細胞膜調製物、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。5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR活性を減少させる可能性ある物質として同定する。5-HT様GPCR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、5-HT様GPCR活性を増大させる可能性ある物質として同定する。

30

【0133】

このようなスクリーニング方法の1つは、5-HT様GPCRポリペプチドを発現するようトランスフェクトしたメラニン保有細胞の使用を含む。係るスクリーニング技術は1992年2月6日公開のW092/01810に記載されている。したがって、例えばこのような検定を使用して、該レセプターを含むメラニン保有細胞を、レセプターリガンド（例えば、セロトニンまたはセロトニンアナログ）と、スクリーニングされる被験化合物の両者に接触させることにより、レセプターポリペプチドの活性化を阻害する化合物を求めるスクリーニングができる。リガンドが生成するシグナルの阻害は、被験化合物がそのレセプターについての可能性あるアンタゴニストであること、即ち該レセプターの活性化を阻害することを示す。このスクリーニングは、係る細胞をスクリーニングすべき化合物と接触させることにより、レセプターを活性化する被験化合物を同定するために、そして各被験化合物がシグナルを生成するかどうか、即ちレセプターを活性化するかどうかを決定するために使用できる。

40

【0134】

他のスクリーニング技術は、レセプター活性化により惹起される細胞外pH変化を測定する系においてヒト5-HT様GPCRポリペプチドを発現する細胞（例えば、トランスフェクトされたCHO細胞）を使用することを包含する（例えばScience 246, 181-296, 1989を参照されたい）。例えば、被験化合物をヒト5-HT様GPCRポリペプチドを発現

50

する細胞に接触させ、二次メッセンジャー反応、例えばシグナル伝達またはpH変化を測定して、被験化合物が該レセプターを活性化するか阻害するかを決定できる。

【0135】

別のことのスクリーニング技術は、ヒト5-HT様GPCRポリペプチドをコードしているRNAをXenopus卵母細胞内に導入し、該レセプターを一過性発現させることを含む。次いでトランスクレオトドを発現させた卵母細胞をレセプターリガンドおよびスクリーニングすべき被験化合物に接触させ、その後、該レセプターの活性化を阻害すると思われる被験化合物についてスクリーニングする場合は、カルシウムシグナルの活性化または阻害の検出を行う。

【0136】

別のスクリーニング技術は、レセプターがホスホリバーゼCまたはDに結合している細胞でヒト5-HT様GPCRポリペプチドを発現させることを含む。このような細胞には、内皮細胞、平滑筋細胞、胚性腎細胞などがある。スクリーニングは上記のように、ホスホリバーゼ活性の変化から該レセプターの活性化程度を定量することにより達成できる。

【0137】

上に記載のような機能検定の詳細は、下記の具体的実施例に記載する。

【0138】

5-HT様GPCR遺伝子発現

別の態様では、5-HT様GPCR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。5-HT様GPCRポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、RNAまたは5-HT様GPCR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。

【0139】

細胞における5-HT様GPCR 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。5-HT様GPCR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、ウエスタンプロテイング、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、5-HT様GPCR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、インピボで、細胞培養で、またはインピトロ翻訳系で決定できる。

【0140】

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。5-HT様GPCR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。5-HT様GPCR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。

【0141】

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5-HT様GPCRポリペプチド、5-HT様GPCRポリヌクレオチド、5-HT様GPCR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5-HT様GPCR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

10

20

30

40

50

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。

【0142】

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當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、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。10

【0143】

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、所望ならば適當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。20

【0144】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適當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、ラッカー溶液、および適當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。30

【0145】

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當な液体、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。

【0146】

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ն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當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。非脂質ポリカチオン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當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當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。4050

【 0 1 4 7 】

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。

10

【 0 1 4 8 】

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。

【 0 1 4 9 】**治療上の適応および方法**

GPCRは、哺乳類宿主の至る所に存在し、多くの病状を含む多くの生物学的機能の原因となっている。したがって、一方では、GPCRを刺激する化合物や薬物を見つけ出しが望ましく、他方ではGPCRを阻害する化合物や薬物を見つけ出しが望ましい。例えば、GPCRを活性化する化合物を、喘息、パーキンソン病、急性心不全、尿閉、および骨粗鬆症等の治療目的で用いることができる。とりわけ、GPCRを活性化する化合物は、例えば肺血流の欠如または高血圧等によって引き起こされるような、様々な心臓血管の病気の処置に有用である。さらに、これらの化合物は、体液や電解液ホメオスタシスの調節異常に関連する様々な生理学的障害や、アンギオテンシン誘発性アルドステロン分泌に伴う疾患の処置に用いることもできる。

20

【 0 1 5 0 】

一般に、GPCRの活性化を阻害する化合物は、様々な治療目的、例えば、低血圧および/または高血圧、狭心症、心筋梗塞、潰瘍、喘息、アレルギー、良性前立腺肥大、および統合失調症、躁病性興奮、鬱、錯乱、痴呆または重度の精神薄弱を含む精神的および神経学的障害、ハンチントン病またはトゥーレット症候群等のジスキネジーの処置に使用することができる。なかでもGPCRを阻害する化合物は、内因性の拒食症の転換、過食症の管理、および過剰な肺血流または低血圧を含む様々な心臓血管の病気の処置にも使用することができる。特に、5-HT様GPCRの調節は、不安、鬱、高血圧、片頭痛、強迫性障害、統合失調症、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソニズム、およびハンチントン舞蹈病等の神経変性障害、および癌化学療法によって引き起こされる嘔吐、並びに睡眠および摂食障害、疼痛管理、体温および血圧の調節が関係する障害の処置に使用することができる。

30

【 0 1 5 1 】**糖尿病**

ヒト5-HT様GPCRを調節して糖尿病を処置することができる。糖尿病 糖尿病は心臓血管系で、血糖中の異常な高台、脂質および異常(併発症)の変更、目、腎臓および神経系によって特徴づけられた共通の代謝異常である。糖尿病は2つの別個の疾病に分類される:タイプ1糖尿病(若年性の発症)(それは、インシュリンを作り分泌する細胞の損失に起因する)およびタイプ2糖尿病(成人性の発症)(インシュリン分泌の欠陥およびインシュリン反応の欠陥によって引き起こされる)。

40

【 0 1 5 2 】

タイプ1糖尿病は、膵臓の小島で細胞(細胞)を分泌するインシュリンを攻撃する、自己免疫の反応によって開始する。細胞の破壊が始まる前にこの反応が生じるのを防ぐか、反応を止める試薬は、この疾病用の潜在的な治療である。ベータ細胞増殖および再生を

50

引き起こす他の試薬はさらに潜在的な治療である。

【0153】

タイプII糖尿病は2つの糖尿病の条件(人口の6%)に共通する。インシュリン分泌の欠陥は糖尿病の条件の重要な原因で、適切に、インシュリン放出を備えた血糖レベルの上昇に検知して応答する 細胞の無力化に起因する。 細胞による反応をグルコースに増加させる治療は、この疾病の重要な新しい治療法を提示するであろう。

【0154】

タイプII糖尿病患者主題のインシュリン応答の欠陥は治療の介在の別の目標である。筋肉、肝臓および脂肪中のインシュリン受容体の活動を増加させる試薬は、血糖の減少および血しょう脂質の正常化を引き起こすでしょう。直接受容体を刺激するか、受容体からの細胞内の信号を増加させる試薬は受容体活動を増加させることができる。他の治療は、インシュリン状の結果を生成するために細胞の終了プロセス(つまりグルコース輸送、様々な酵素システム)を直接活性化することができる、したがって、1つの、有益な結果を重量超過の主題がタイプII糖尿病に対してより大きな感受性を有する体重を減少させるどんな試薬も可能な治療である。

【0155】

Iおよびタイプ糖尿病が扱うことができる両方の型のインシュリン応答を模倣する試薬あるいは血糖レベルの縮小により糖尿病の併発症を扱う。同様に、試薬、それは新しい血容器成長を縮小する、両方の疾患の中で発展する目併発症を扱うために使用することができる。

【0156】

肥満症

肥満症および過体重は、除脂肪体重と比較した体脂肪の過剰として規定される。カロリー摂取の増加またはエネルギー支出の減少、あるいはその両方が、脂肪として貯えられる余剰エネルギーを導く不均衡を生じさせ得る。肥満症は、重大な医療上の罹患率および死亡率の増加と関連している。肥満症の病因は十分に理解されておらず、遺伝的要因、環境要因またはその2つの組み合わせのために、正方向のエネルギーバランスが引き起され得る。対照的に、食欲不振症および悪液質は、エネルギー支出に対するエネルギー取り込みの不均衡によって特徴付けられ、負方向のエネルギーバランスを引き起こし、体重が減少する。エネルギー支出を増大させるか、および/またはエネルギー取り込み、吸収若しくは貯蔵を減少させる物質は、肥満症、過体重、および関連する同時罹患率を処置するのに有用であろう。エネルギー取り込みを増大させる、および/またはエネルギー支出を減少させる、あるいは痩せた組織(lean tissue)の量を増大させる物質は、悪液質、食欲不振症および萎縮病を処置するのに有用であろう。

【0157】

この遺伝子、翻訳されたタンパク質、及びこの遺伝子若しくはその遺伝子の一部又はその産物を調整する物質は、肥満症、過体重、食欲不振症、悪液質、萎縮病、食欲抑制、食欲増進、満腹感の増大若しくは減少、体重の調整、および/または過食症などの他の摂食障害を処置するのに有用である。また、この遺伝子、翻訳されたタンパク質、およびこの遺伝子またはその遺伝子産物若しくはその産物を調整する物質は、肥満症/高血圧症、糖尿病II型、環動脈疾患、高脂血症、脳卒中、胆嚢疾患、痛風、変形関節炎、睡眠時無呼吸および呼吸問題を含む過体重関連同時罹患率、幾つかのタイプの癌(子宮体癌、乳癌、前立腺癌および大腸癌を含む)、塞栓疾患、多囊胞性卵巣症候群、減弱化受胎能、妊娠の合併症、月経不順、多毛症、ストレス尿失禁、及びうつ病、を処置するのに有用である。

【0158】

C N S 障害

処置できるC N S障害には、脳損傷、脳血管疾患及びこれらの予後、パーキンソン病、皮質基底核変性症、運動ニューロン疾患、痴呆(ALS、多発性硬化症、外傷性脳損傷、脳卒中、脳卒中後、外傷後脳損傷および小血管性脳血管疾患を含む)が挙げられる。また、痴呆症、例えばアルツハイマー病、血管性痴呆、レビ小体痴呆、前頭側頭骨痴呆、及び第

10

20

30

40

50

17染色体に関連したパーキンソニズム、前頭側頭骨痴呆症（ピック病、進行性核麻痺（progressive nuclear palsy）、皮質基底核変性症、ハンチントン病、視床退縮（thalamic degeneration）、クロイツフェルト・ヤコブ病、HIV性痴呆症、痴呆症を伴う統合失調症、及びコルサコフ精神病を含む）を処置できる。同様に、認知関連障害、例えば穏和な認知障害、加齢関連性記憶障害、加齢関係性認知減退、血管性認知障害、注意欠陥障害、注意欠陥多動性障害、及び学習障害を患った子供の記憶障害を、ヒト5-HT様GPCRの活性を調節することによって処置できる。

【0159】

CNS障害に関連する疼痛もまた、ヒト膜型セリンプロテアーゼの活性を調節することによって処置できる。処置できる疼痛には、中枢神経系障害と関連するもの、例えば多発性硬化症、脊髄損傷、坐骨神経痛、失敗した腰部手術（failed back surgery）症候群、外傷性脳損傷、癲癇、パーキンソン病、脳卒中後、及び脳や脊髄における血管破壊（例えば、梗塞、出血、血管新生異常）が挙げられる。非中枢神経因性疼痛には、乳房切除術後疼痛、反射性交感神経性ジストロフィー（RDS）、三叉神経痛ラジオキュロパシー（trigeminal neuralgia radio-culopathy）、術後の疼痛、HIV/AIDS関連疼痛、癌疼痛、代謝神経痛（例えば、糖尿病性神経障害、結合組織疾患に対する第2の血管炎神経障害）、例えば肺癌種、白血病、リンパ腫、前立腺、大腸若しくは胃癌種、三叉神経痛及び疱疹後神経痛と関連する腫瘍随伴性多発神経障害が挙げられる。癌及び癌処置と関連する疼痛もまた処置でき、頭痛（例えば前兆を伴う片頭痛、前兆を伴わない片頭痛、および他の片頭痛障害）、偶発性及び慢性緊張性頭痛、緊張型様頭痛、群発性頭痛や慢性発作性片頭痛も処置できる。

【0160】

心疾患には心臓及び血管系における疾患：うっ血性心不全、心筋梗塞、心臓の虚血疾患、全種類の心房性不整脈及び心室性不整脈、高血性血管疾患及び末梢血管疾患が含まれる。

【0161】

心不全は、心機能の異常が新陳代謝組織の要求に見合った割合で血液をポンプする心臓の機能不全が原因の病理学的状態として規定される。これには、ポンプ不全の全ての形態、例えば高拍出及び低拍出、急性及び慢性、右心系又は左心系、収縮期又は拡張期、根本原因とは無関係なものが含まれる。

【0162】

心筋梗塞（MI）は、動脈硬化症により狭くなった冠動脈の血栓性閉塞に続いて、一般的に冠血流量の急激な低下により発症する。MI予防法（1次予防及び二次予防）が含まれ、MIの急性期処置及び合併症の予防が含まれる。

【0163】

虚血疾患は、冠流量が制限され、灌流が心筋の酸素要求量を補うには不十分となる状態を表す。この疾患群には、安定狭心症、不安定狭心症及び無症候性虚血が含まれる。

【0164】

不整脈には、心房性及び心室性頻脈性不整脈（心房頻脈、心房粗動、心房細動、心房・心室興奮回帰性（リエントラント）頻脈、早期興奮症候群、心室頻脈、心室粗動、心室細動）の全形態、並びに除脈性不整脈形態が含まれる。

【0165】

血管疾患は、原発性および全ての種の二次性動脈性高血圧症（腎性、内分泌性、神経性、その他）を包含する。ここに開示する遺伝子およびその産物は、高血圧症の治療および全合併症の防止のための薬物標的として使用できる。

【0166】

末梢血管疾患とは、動脈および/または静脈血流が減少し、その結果、血液供給と組織の酸素要求の間に不均衡が生じている血管疾患として定義する。これには、慢性末梢動脈閉塞疾患（PADD）、急性動脈血栓症および塞栓症、炎症性血管疾患、レイノー現象、および静脈疾患が含まれる。

【0167】

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、連続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。

【0168】

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。

【0169】

20

GPCRとCOPD

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。

30

【0170】

癌

癌は、基本的に発癌性細胞形質転換によって発症する疾患である。形質転換細胞をそれらの正常な対応物から区別し、かつ癌の病態生理に基づく形質転換細胞の特徴は幾つかある。それらには、非制御型細胞性増殖、通常の死誘導シグナルに対する不応答（不死化）、増大した細胞運動性及び侵襲性、新たな血管新生の誘導を通じた血液供給を補充するための増大した能力（血管新生）、遺伝子の不安定性、並びに調節不全遺伝子発現が挙げられる。薬剤耐性の獲得とともに、これらの異常な生理機能の種々の組み合わせにより、最終的に臓器不全および患者の死となる難治性疾患状態に頻繁に陥る。

40

【0171】

最も一般的な癌治療は、細胞増殖を標的とし、形質転換細胞と正常細胞との間の効率に関するその特異な増殖能に基づいている。このアプローチは、幾つかの重要な正常細胞タイプもまた高増殖であり、かつ癌細胞が高頻度にこれらの物質に対して耐性となるという現実により妨げられている。従って、従来の抗癌治療についての治療指数は珍しく2.0を超えていている。

【0172】

50

ゲノミクス誘導性分子の標的同定は、癌患者に安全で、かつより効率的な処置を提供できる治療介入のための新たな癌特異的標的を同定する可能性を開いた。従って、新たに発見される腫瘍関連遺伝子及びその産物を疾患におけるそれらの機能（群）について試験でき、そして革新的な治療を発見し、かつ開発するために道具として用いることができる。以

上に概説した生理学的プロセスの多くに重要な働きがある遺伝子は、癌標的として特徴付けることができる。

【0173】

遺伝子は処置として使用できる。また、ゲノミクスを通じて同定される遺伝子又は遺伝子断片は、すぐに1つ又はそれ以上の非相同（ヘテローガス）発現系において発現させ、機能性組換えタンパク質を産生させ細胞ができる。このタンパク質は、その生物学的機能についてインビトロで特徴付けられ、その後その生化学活性の化学修飾因子（モジュレーター）を同定するため、ハイスクーループット分子スクリーニングプログラムにおける道具として用いられる。標的タンパク質活性のアゴニスト及び／又はアンタゴニストをこの様式で同定し、次いで、細胞およびインビボ疾患モデルにて抗癌活性について試験する。生物学的モデルにおける反復試験や、詳細な薬物動態力学的分析及び中毒学的分析を用いたリード化合物の最適化により、薬物開発及び次のヒトでの試験についての基礎を形成する。

【0174】

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ラシーが含まれる。

【0175】

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。

【0176】

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 アゴニストは、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

10

20

30

40

50

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として処置の有効性が低減することである。

【0177】

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Sharom, 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'y alov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。10
20

【0178】

気道平滑筋の収縮と炎症細胞の化学的誘引に関する仲介物質の多くは、GPCR結合を介してそれらの効果を発揮する。平滑筋収縮の仲介物質には、ロイコトリエン、血小板活性化因子、エンドセリン - 1、アデノシン、およびトロンボキサンA₂がある。これら仲介物質の幾つかによるGPCRの活性化を遮断するレセプターアンタゴニストが喘息の治療薬として成功裏に使用してきた。炎症細胞の化学的誘引物質には、ケモカイン、例えばエオタキシン、MCP - 4、RANTES、およびIL - 8がある。同様にケモカインレセプターアンタゴニストが喘息の治療薬として開発されている。Sarau et al., Mol. Pharmacol. 56, 657 - 63, 1999; Kitaura et al., J. Biol. Chem. 271, 7725 - 30, 1996; Ligget et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152, 394 - 402, 1995; Panettieri et al., J. Immunol. 154, 2358 - 65, 1995; Noveral et al., Am. J. Physiol. 263, L317 - 24, 1992; Honda et al., Nature 349, 342 - 46, 1991.30

【0179】

幾つかのGPCRの活性化は逆に喘息において有益な効果を持っている。例えば、1 - および2 - アドレナリン作動性GPCRを活性化するレセプターアゴニストは、喘息発作の治療の際、収縮した気道平滑筋を弛緩させるために治療的に使用される。このように、正または負のやり方でのGPCRの調節が、喘息治療において重要な役割を果たし得る。40

【0180】

血液疾患

グアニン - ヌクレオチド - 結合 (G-) タンパク質共役レセプター (GPCR) は、様々な造血過程、例えば前駆体細胞の、増殖、分化、生存、造血およびリンパ組織への移動および定着 (homing)、に関与している。GPCRの機能不全は、血液細胞の不十分な産生につながり得、貧血、白血球減少、血小板減少または種々の様態の白血病をもたらす。

【0181】

GPCRは、循環する白血球細胞の様々な機能、例えば、リンパ球における免疫応答の活性化、単球によるサイトカイン産生、および顆粒球の走化性、において役割を担っている。GPCR機能の調節不良は、免疫機能の低下、アレルギーおよび宿主の防御システムの50

他の病的状態の原因となり得る。

【 0 1 8 2 】

循環血小板 G P C R は、血小板凝集および止血につながるメディエーターの分泌を引き起こす活性化を媒介する。薬理学的または分子遺伝子学的方法による、血小板における G P C R 機能の調節は血栓性疾患および出血性疾患における重要な役割を担っており、G P C R は適当な治療薬物の標的となる。

【 0 1 8 3 】

GPCRは、小さな分子様セロトニンから高分子のペプチド様ケモカインまで、様々なクラスのリガンドと結合することにより活性化される。いくつかのGPCRは、タンパク質加水分かいによる切断、例えばトロンビンにより活性化される。リガンドが結合すると、GPCRからのシグナルが、さらなる経路のシグナル伝達を決定するサブユニットのクラスのヘテロ三量体のGタンパク質により媒介される。

【 0 1 8 4 】

同定されていないリガンドまたは未知の細胞内シグナル伝達経路（例えば新規なG-タンパク質）を伴う、「標準的でない」G P C Rをコードする遺伝子、またはこれまで造血または止血系と関連付けられていなかったクラスに属するG P C Rが同定されることは考えられる。したがって、造血前駆体または循環血液細胞において特異的に発現するG P C Rが、造血または止血の機能不全に治療滴介入の優れた標的であると予想することは無理もない。Yang M., Srikiatkhachorn A, Antony M., Chong B.H.; Blood Coagul. Fibrinolysis 1996, 127-33; Arai H., Tsou C.L., Charo I.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14495-14499, 1997; Aragay A.M., Quick M.W.; J. Biol. Chem. 274, 4807-4815, 1999; Davignon I., Catalina M.D., Smith D., Montgomery J., Croy J., Siegelman M., Wilkie T.M.; Mol. Cell. Biol. 20, 797-804, 2000; Wiesmann A., Spangrude G.J.; Exp. Hematol. 27, 946-955, 1999; Van Brocklyn J.R., Graler M.H., Bernhardt G., Hobson J.P., Lipp M., Spiegel S.; Blood 95, 2624-2629, 2000; Brass L.F.; J. Clin. Invest. 104, 1663-1665, 1999; Coughlin S.R.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11023-11027, 1999を参照。

【 0 1 8 5 】

泌尿器系の疾患

尿失禁

尿失禁は、不随意性の尿の排出である。ストレス尿失禁(SUI)(それは、尿道の閉鎖メカニズムの欠陥によって通常引き起こされる)とともに、尿失禁(UUI)が最も一般的なタイプのUIのうちの1つである。さらに、それは、そのような障害を持たない個人に生じるが、UUIは、痴呆、パーキンソン病、多発性硬化症、卒中および糖尿病のようなニューロンの損害を引き起こす神経学的障害あるいは疾病にしばしば関係している。UUIの通常の原因のうちの1つは、膀胱(OAB)の活動過剰(それは、排尿筋の収縮異常および不安定からくる頻繁で緊急の症状をいう病状である)である。

【 0 1 8 6 】

主としてUUIの扱いを支援するために今日市場に出ている尿失禁のためのいくつかの薬物治療がある。OABのための治療は、抗コリン作用剤の開発に対する主な強調を含む、周辺の神経の管理機構に影響する薬、あるいは膀胱排尿平滑筋収縮に直接作用するもの焦点が当てられている。これらの薬剤は副交感神経(それらは膀胱をことをコントロールする)を阻害することができるか、あるいは膀胱の排尿筋に対する直接の鎮撫性の影響を働かせることができる。これは、膀胱内圧の減少、キャパシティーの増加、および膀胱短縮の周波数の縮小に帰着する。プロパンテリン(ProBanthine)、トルテロジン酒石酸塩(Detrol)およびオキシブチニン(Ditropan)のような経口で活性のある抗コリン作用性薬は、最も一般に処方される薬である。しかしながら、それらの最も重大な欠点は乾燥口、視覚異常、便秘および中枢神経系妨害のような絶えがたい副作用である。これらの副作用は貧弱な従順に結びつく。乾燥口の徵候だけは、オキシブチニンを備えた70%の非従順割合の原因である。現在の治療の不適当な点は、より少数の副作用を持っている斬新で特効があり、安

全て、口頭で利用可能な薬の必要がある。

【0187】

セロトニンレセプター

無効にしている間、尿道の括約筋の正確に統合排尿弛緩および短縮は正常な膀胱充填物のために必要になる、反対を要する。この調和させられた調整は、脊髄、橋および前脳部にある頻尿センターの中で、刺激性の活動、抑制する活動および知覚神経活動の統合によって達成される。5-HT(5-HT)、アミノ酪酸、グリシン、ドーパミン、アセチルコリンおよびエンケファリンのようないくつかの神経伝達物質は、脊柱でsupraspinalなサイト(de Groatら、泌尿生殖器のシステムの神経質なコントロール、227-290、1993年)の頻尿反射道で識別される。

10

【0188】

中枢と末梢のメカニズム(Espey & Downie、Eur J Pharmacol 287: 173-177、1995年)によって頻尿に5-HTが効果があることが認識される。

【0189】

ほとんどのよく特徴づけられた5-HTレセプターはG-蛋白質共役レセプター(レイモンドらおよびNaunyn SchmiedebergsアーチPharmacol 346: 127-137、1992年)である。5-HT1ファミリーは、酵素を禁じる特性を共有する5つのレセプター(5-HT1A、1B、1D、1Eおよび1F)から成る、セロトニンによって刺激された時シクラーゼをアデニル化する。5-HT1Eレセプター(それはCNSに制限されたように見える)を例外として、これらのレセプターはCNSおよび周囲の両方で見つかる。

20

【0190】

頻尿のコントロールにおける5-HT1Aの生理学的役割は解明された、5-HT1Aレセプターの使用、選択的な敵WAY100635、意識的なネズミ(Lecciら、J Pharmacol Exp Therap 262:)中の一貫して害する膀胱収縮性のない膀胱キャパシティーの麻酔をかけられたネズミおよび増加中のisovolumetricな膀胱短縮の印のあるプロックを示した。181-189、1992年.WAY100635の鞘内管理による脊柱の5-HT1Aレセプターの封鎖は、脳橋の頻尿センターの電気的な刺激によって誘発された、それが、昇順の道に対する影響を示さなかった膀胱短縮によっても膀胱膨張によっても引き起こされた頻尿反射を阻害した。WAY100635の有効な鞘内の管理は、L6-S1脊髄レベル障壁&Eglen(FASEB J 10)に制限された:1398-1407、1996年。さらに、それは、選択的な作動筋8-OH-DPATが促進した、5-HT1Aレセプターのその鞘内の管理を示した、正常なネズミ中の頻尿反射および8-OH-DPATのその静脈内の管理は、慢性的に脊柱になったネズミ(カーンらおよび世界J Urol 17:255-260,1999)中の膀胱膨張によって引き起こされた反射の膀胱の短縮の振幅を増加させた。腰仙の脊髄レベルにこれらの結果5-HT1Aレセプターと一緒に得られて、頻尿反射道の強壮剤管理における重要な役割を持っている。5-HT1A敵には、活動し過ぎる膀胱を扱い、かつ尿失禁を促すために治療の長所があり得る。

30

【0191】

5-HT2ファミリーは、細胞内のphosphoinositide新陳代謝を増加させることによって作用する3つのレセプター(5-HT2A、2Bおよび2C)から成ります。5-HT4レセプターは、両方のCNSの中に、および周囲(ここでシクラーゼをアデニル化するためにそれは確かに連結される)の様々な組織についてある。シクラーゼをアデニル化する5-HT5レセプターの否定のカップリングがあるように見えます。5つのHT6および5-HT7レセプターは両方ともシクラーゼをアデニル化するために確かに連結される。5-HT7レセプターが中央と周辺の組織に位置している一方、5-HT6レセプターはCNSでのみ見つかります。配位子にゲート制御されたイオン・チャンネル上科のメンバーであるただ一つのセロトニンレセプターは、5-HT3レセプターである。セロトニンによって刺激された時、このレセプターはセルへ偏りをなくす陽イオン流れを導く。

40

【0192】

5-HT3あるいは5-HT4レセプターの活性化はアセチルコリン・リリース(TestaらおよびJ Pharmacol Exp Ther 290: 1258-1269、1999年。5-HTレセプターは妨害(柿崎らはJ Physiol

50

である、規定する、集合成的、Physiol 280の伴奏をする:R1407-1413、2001年。したがって、5つのHT3敵あるいは5-HT4敵は活動し過ぎる膀胱の処理において有益かもしれない)に続く膀胱の中でupregulatedされる)を促進する。

【0193】

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5-HT様G P C R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。

【0194】

5-HT様G P C R活性に影響を及ぼす試薬を、5-HT様G P C R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5-HT様G P C R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。

【0195】

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(例えばヒト)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、例えば肺、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。

【0196】

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 1.6nmol 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 1.6nmol 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 1.6nmol 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 $100\sim 500\text{nm}$ であり、より好ましくは約 $150\sim 450\text{nm}$ であり、さらにより好ましくは約 $200\sim 400\text{nm}$ である。

【0197】

本発明に用いるに適したリポソームは、例えば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ギ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、例えばリポソームの外側表面に曝される腫瘍細胞リガンドのような、リポソームを癌細胞に標的化することが可能な化合物、を包含する。

【0198】

リポソームを、試薬、例えば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化することは、当分野で標準的な方法(例えば、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 $0.1\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}$ 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 $0.5\mu\text{g}\sim 5\mu\text{g}$ 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

10

20

30

40

50

オチド約 $10\text{ }\mu\text{g}$ をリポソーム約 8 nmol と組み合わせる。

【0199】

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、例えば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。

【0200】

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5-HT様GPCR活性に比較して5-HT様GPCR活性を増大させ、または低下させる活性成分の量を指す。

【0201】

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。

【0202】

治療的有効性および毒性、例えば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数であり、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。

【0203】

大きな治療指数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。

【0204】

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。

【0205】

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る。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。

【0206】

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被覆ラテックスピーズの細胞内輸送、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D

10

20

30

40

50

E A E - 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。

【 0 2 0 7 】

抗体の有効なインビボ用量は、約 5 μg から約 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 50 μg から約 5 mg/kg 、約 100 μg から約 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （患者の体重）、および約 200 から約 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （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 100 ngから約 200 ng、500 ngから約 50 mg、約 1 μg から約 2 mg、約 5 μg から約 500 μg 、および約 20 μg から約 100 μg の DNA の範囲である。

10

【 0 2 0 8 】

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。

【 0 2 0 9 】

好ましくは、試薬は、5-HT 様 GPCR 遺伝子の発現または 5-HT 様 GPCR 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。5-HT 様 GPCR 遺伝子の発現レベルまたは 5-HT 様 GPCR 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 5-HT 様 GPCR 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、5-HT 様 GPCR ポリペプチドの免疫学的検出、または 5-HT 様 GPCR 活性の測定を用いて評価できる。

20

【 0 2 1 0 】

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。

30

【 0 2 1 1 】

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。

【 0 2 1 2 】

診断方法

PCR は、PCR をコードする核酸配列における突然変異の存在に疾病および異常、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。そのような疾患は、例えば、腫瘍および癌のような細胞の形質転換、高血圧および低血圧を含む様々な心疾患、並びに血流異常、アンギオテンシン誘発性のアルドステロンから起こる疾患、および体液および電解液ホメオスタシスの他の調節異常に関連する。

40

【 0 2 1 3 】

疾病に罹患している個体と正常な個体とにおける PCR 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患の原因であると思われる。

【 0 2 1 4 】

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

50

調製された一本鎖鑄型分子と共に、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。

【0215】

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改変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することができます（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。

【0216】

PCR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。

【0217】

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考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。

【実施例】

【0218】

実施例1

5-HT様GPCR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pCEV4-5-HT様GPCRポリペプチドをヒト胚の腎臓293細胞にトランسفクトする。培養フラスコから剥がした細胞を5mLのTris HCl, 5mM EDTA, pH 7.5に加え、音波処理により溶解する。細胞リゼートを1000rpmで5分間4にて遠心する。上清を30,000×g、4で20分間遠心分離する。そのペレットを、50mM Tris HCl、5mM MgSO₄、1mM EDTA、100mM NaClを含み、0.1% BSA、2μg/mlアプロチニン、0.5mg/mlロイペプチドおよび10μg/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¹²⁵I標識セロトニンの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250μLとする。

【0219】

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(0.1nM~4nM)の存在下でインキュベートする。

【0220】

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

10

20

30

40

50

非線形回帰プログラムによって分析する。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 のアミノ酸配列を含む 5-HT 標 GPCR ポリペプチドが示される。

【0221】

実施例 2

放射性リガンド結合アッセイ

ヒト 5-HT 標 GPCR を発現するポリヌクレオチドでトランスフェクトしたヒト胚腎臓 293 細胞を培養フラスコから剥がし、トリス HCl 15 ml、5 mM EDTA、pH 7.5 中で超音波処理して溶菌させる。細胞可溶化液を 4 にて 1000 rpm で 5 分間遠心分離する。その上清を 4 にて 30,000 rpm × 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、pH 7.5 に 0.1% BSA、2 μg/ml アプロチニン、0.5 mg/ml ロイペプチドと 10 μg/ml ホスホラミドンを補助した結合バッファー中に懸濁する。添加した放射性リガンドの 10 % 未満と結合するのに必要とされるタンパク質濃度として規定される最適膜懸濁希釈液を、¹²⁵I - 標識化リガンド又は被験化合物、非標識化ペプチド及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、最終量が 250 μl となるまで加える。

【0222】

平衡飽和結合検定においては、膜調製物を増大濃度 (0.1 nM ~ 4 nM) ¹²⁵I - 標識化リガンド又は被験化合物 (比放射能 2200 Ci/mmol) の存在下にてインキュベートする。種々の被験化合物の結合親和度は、各被験化合物の 12 の異なる濃度の存在下で 0.1 nM ¹²⁵I - ペプチドを用いる平衡的競合作用において決定する。

【0223】

結合反応混合液を 30 で 1 時間インキュベートする。この反応は、細胞回収機を用い、0.5 % ポリエチレンイミンで処理した GF/B フィルターを通じて濾過することにより停止させる。放射活性は、シンチレーション計数により測定し、データをコンピューター処理非線型回帰プログラムにより分析する。

【0224】

非特異的結合は、100 nM 非標識化ペプチドの存在下で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量として規定される。タンパク質濃度は標準物としてウシ血清アルブミンを含む Bio-Rad Reagent を用いる Bradford 法により測定する。膜タンパク質の放射能を、試験化合物とインキュベーションしていない膜タンパク質の放射能に対して少なくとも 15 % 増加させる化合物をヒト 5-HT 標 GPCR ポリペプチドに結合する化合物と同定する。

【0225】

実施例 3

cAMP 形成媒介型サイクリック AMP 形成における被験化合物の効果

cAMP 形成の受容体媒介型阻害は、ヒト 5-HT 標 GPCR を発現する宿主細胞において検定することができる。細胞を 96 ウェル プレートに移し、10 mM HEPES、5 mM テオフィリン、2 μg/ml アプロチニン、0.5 mg/ml ロイペプチド、及び 10 μg/ml ホスホラミドンを補助したダルベッコホスフェート緩衝生理食塩水 (PBS) 中、5 % CO₂ 下にて 37 で 20 分間インキュベートする。被験化合物を加え、37 でさらに 10 分間インキュベートする。培地を吸引し、100 mM HCl を加えてこの反応を停止させる。そのプレートを 4 で 15 分間保存する。停止させた溶液中の内容物 cAMP を放射免疫測定により測定する。

【0226】

放射活性は、データ換算ソフトウェアを備えたガンマ計数を用いて定量化する。被験化合物が存在しないウェル内容物中の放射活性と比較してウェル内容物中の放射活性を低下

10

20

30

40

50

させる被験化合物を、cAMP形成を阻害する可能性のある物質（インヒビター）として同定する。被験化合物が存在しないウェル内容物中の放射活性と比較してウェル内容物中の放射活性を増大させる被験化合物を、cAMP形成を促進する可能性のある物質（エンハンサー）として同定する。

【0227】

実施例4

細胞内カルシウム流動化における被験化合物の効果

細胞内の遊離カルシウム濃度は、蛍光指示薬Fura-2/AM染色を用いる顕微分光蛍光分析により測定できる(Bushら、J. Neurochem. 57, 562-74, 1991)。安定にトランスフェクトされた細胞を、ガラスカバースリップインサートを含む35mm培養皿に蒔く。細胞をHBSで洗浄し、被験化合物と共にインキュベートし、20～40分間Fura-2/AM溶液100μlを充填する。HBSで洗浄した後にFura-2/AM溶液を取り除き、細胞を10～20分間HBSで平衡化する。その後、細胞をLeitz Fluovert FSマクロスコープの対物レンズ40×の下で可視化する。

【0228】

励起波長を340nm～380nmの間で変更して、蛍光発光を510nmで決定する。生蛍光データを、標準カルシウム濃度曲線と分析技術ソフトウェアとを用いてカルシウム濃度に変換する。被験化合物存在下の蛍光と比較して蛍光を15%増大させる被験化合物を、細胞内カルシウムを流動化させる化合物と同定する。

【0229】

実施例5

ホスホイノシチド代謝における被験化合物の効果

ヒト5-HT様GPCR cDNAを安定して発現する細胞を96ウェルプレートにプレーティングし、増殖させて密集させる。検定の前日に、増殖培地を1%血清及び0.5μCi³H-マイイノシトール(myoinositol)を含む培地100μlに交換する。このプレートをCO₂インキュベーター(37℃で5%CO₂)中で一晩中インキュベートする。検定の直前に培地を除去し、10mM LiClを含むPBS200μlに置き換え、そして細胞を新しい培地を用いて20分間平衡化する。この間隔の間に、PBS中の20倍濃縮の一部10μlとして加えるアンタゴニストを用いて、細胞をさらに平衡化する。

【0230】

イノシトールリン脂質代謝由来の³H-イノシトールホスフェート蓄積は、被験化合物を含む溶液10μlを加えることで始まる。最初のウェルに10μlを加え、基礎蓄積を測定する。被験化合物の11種の濃度を、その次の各プレート列の11ウェルにて検定する。全ての検定は、2つの連続プレート列に等量を添加するして繰り返すことにより2回行なう。

【0231】

このプレートをCO₂インキュベーターにて1時間インキュベートする。この反応は、50%トリクロロ酢酸(TCA)15μlを加え、次いで4℃で40分間インキュベートして停止させる。1Mトリス40μlを用いてTCAを中和した後、ウェル中の内容物をDowex AG1-X8(200～400メッシュ、磷酸塩形態)を含むマルチスクリーン(Multiscreen)HVフィルタープレート(Millipore)に移す。このフィルタープレートは、各ウェルに対してDowex AG1-X8懸濁液(50%v/v、水：樹脂)200μlを加えて調製する。そのフィルタープレートを真空多岐管(vacuum manifold)に置き、樹脂床を洗うか、又は溶出する。それぞれのウェルを水200μlで2回洗い、5mMテトラホウ酸ナトリウム/60mMギ酸アンモニウム200μlで2回洗う。

【0232】

³H-IPを1.2Mギ酸アンモニウム/0.1Mギ酸200μlを用いて空の96-ウェルプレート中を溶出する。ウェル中の内容物をシンチレーションカクテル3mlに加え、放射活性を液体シンチレーション計数により決定する。

【0233】

10

20

30

40

50

実施例 6

受容体結合法

標準的結合検定。結合検定は、50 mM HEPES、pH 7.4、0.5% BSA 及び 5 mM MgCl₂を含む結合バッファー中にて行なう。5-HT 標 GPCR を含む膜断片と結合している放射性リガンドに対する標準検定を、96 ウェルマイクロタイプレート(例えば、Dynatech Immulon II リムーバウェル(Removawe)IIプレート)において以下のように行なう。放射性リガンドを結合バッファー + PMSF/Baci 中に所望の cpm / 50 μl となるように希釈した後、一部 50 μl をこのウェルに加える。非特異的結合試料について、40 μM 冷リガンド 5 μl をさらにウェルに加える。結合は、結合バッファー + PMSF/Baci 中に所望の濃度(膜タンパク質 10 ~ 30 μg / ウェル)に希釈した膜をウェル当たり 150 μl 添加して開始させる。その後、プレートを Linnb
10 ro マイラー プレートシーラー(Flow Labs)で覆い、Dynatech Microshaker II に置く。結合は、室温で 1 ~ 2 時間進行させ、そのプレートを 2,000 × g で 15 分間遠心分離することによって停止させる。その上清を棄て、膜ペレットを一度冷却結合バッファー 200 μl を加えて洗浄し、手短に攪拌し、再び遠心分離する。個々のウェルを 12 × 75 mm チューブに置き、LKB ガンママスター計数にて計数する(効率 78%)。この方法による特異的結合は、素早く(3 ~ 5 秒)ろ過すること、及びポリエチレンイミンコートインググラスファイバーフィルターで洗浄することにより取り除いた場合に測定したものと一致する。

【0234】

さらに、この標準結合検定の変法も用いる。

1. 冷リガンド対、¹²⁵I - 標識化リガンドの濃度範囲を用いる競合放射性リガンド結合検定は、上記のように改良を用いて実施する。検定するリガンドの全希釈物は、検定における最終濃度の 40 倍濃度になるように 40 × PMSF/Baci にて作製する。その後、ペプチド試料(各々 5 μl)をマクロタイラーウェルごとに加える。膜及び放射性リガンドを、プロテアーゼ阻害物質を含まない結合緩衝液にて希釈する。放射性リガンドを加え、冷リガンドと混合し、次いでその結合は膜を添加することで開始する。

【0235】

2. 受容体と放射性リガンドとの化学架橋結合は、標準検定と同一の結合工程の後に行なう。しかしながら、洗浄過程は、BSA と放射性リガンドとの非特異的架橋結合の可能性を低減させるため、BSA を抜いた結合バッファーを用いて行なわれる。架橋結合工程は、以下の記載のように行なわれる。

【0236】

3. 受容体：リガンド複合体の可溶化研究用及び受容体精製用の膜ペレットを得るために、大量結合検定もさらに行なう。これらは、(a) 結合を 1 ~ 250 m1 量のポリプロピレンチューブにて行なうこと、(b) 膜タンパク質濃度を常に 0.5 mg/m1 にすること、及び(c) 受容体精製において、結合バッファー中の BSA 濃度を 0.25% にまで低下させ、かつ洗浄工程は BSA 不含結合バッファーを用いて行なうことで、精製受容体における BSA 混入を低減させることを除けば、標準法と同一である。

【0237】

実施例 7

受容体に対する放射性リガンドの化学架橋結合

上記のように放射性リガンド結合の後に、膜ペレットをマイクロタイラープレート当たり BSA 不含冷却結合バッファー 200 μl 中に再懸濁する。その後、ウェル当たり 4 mM N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド(ANB-NOS, Pierce) 5 μl を添加混合する。試料を氷上で維持し、距離 5 ~ 10 cm でミネラライト R-52 G ランプ(UVP Inc., San Gabriel, Calif.) を用いて 10 分間 UV 照射する。その後、試料をエッペンドルフチューブに移し、膜を遠心分離してペレット化し、上清を棄て、そして膜を、

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)用の Laemmli SDS サンプルバッファー中

10

20

30

40

50

に溶解させる。以下のように PAGE を行なう。放射標識化タンパク質を、コダック X AR フィルム及びDuPontイメージ増強スクリーンを用いて乾燥ゲルのオートラジオグラフィーにより可視化する。

【0238】

実施例 8

膜可溶化

膜可溶化は、25 mM トリス、pH 8、10% グリセロール (w/v) 及び 0.2 mM CaCl₂を含む緩衝液（可溶化バッファー）において行なう。トリトンX-100、デオキシコレート、デオキシコレート：リゾレシチン、CHAPS 及び zwittergent を含む高溶解界面活性剤は、可溶化バッファー中、10% 濃度にて用いられ、凍結部分として保存される。リゾレシチンは、凍結融解の際に不用化するため新たに作製し、ジギトニンはそのさらに限定された可溶性のため低濃度で新たに作製する。

膜を可溶化するため、結合工程後の洗浄ペレットを粒子が見えなくなるまで可溶化バッファー中にピペッティング及びボルテックスして再懸濁し、100,000 × g で 30 分間遠心分離する。その上清を取り出し、氷上にて維持し、ペレットを廃棄する。

【0239】

実施例 9

可溶化受容体の検定

¹²⁵I - リガンドを結合させ、界面活性剤を用いて膜を可溶化した後に、無傷の R : L 複合体を 4 つの異なる方法で検定することができる。全ての方法は、氷上又は 4 ~ 10 の低温室にて行なう。

【0240】

1. カラムクロマトグラフィー (Knuhtsenら、Biochem. J 254, 641-647, 1988)。Sephadex G-50 カラム (8 × 250 mm) を、膜を可溶化するのに用いる濃度の界面活性剤及び 1 mg/ml ウシ血清アルブミンを含む可溶化バッファーを用いて平衡化する。可溶化膜の試料 (0.2 ~ 0.5 ml) をカラムに充填し、流速約 0.7 ml/min で溶出する。試料 (0.18 ml) を回収する。放射活性をガンマカウンターにて決定する。カラムの空隙容量はブルーデキストランの溶出量により決定される。空隙容量に溶出する放射活性を、タンパク質に対する結合とみなす。遊離¹²⁵I リガンドと同量の溶出後の放射活性を、非結合とみなす。

【0241】

2. ポリエチレングリコール沈殿 (Cuatrecasas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 318-322, 1972)。12 × 75 mm ポリプロピレンチューブ中の可溶化膜試料 100 μl に対して、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液中の 1% (w/v) ウシガンマグロブリン (シグマ) 0.5 ml を加え、次いで 25% (w/v) ポリエチレングリコール (シグマ) 0.5 ml を加えて混合する。この混合物を氷上にて 15 分間維持する。その後、0.1 M リン酸ナトリウム pH 7.4 を試料当たり 3 ml 加える。この試料を素早く (1 ~ 3 秒) Whatman GF/B ガラスファイバーフィルターによりろ過し、ホスフェート緩衝液 4 ml を用いて洗浄する。PEG 沈殿受容体：¹²⁵I - リガンド複合体をフィルターのガンマ計数により決定する。

【0242】

3. GF B / PEI フィルター結合 (Brunsら、Analytical Biochem. 132, 74-81, 1983)。Whatman GF/B ガラス繊維フィルターを 0.3% ポリエチレンイミン (PEI, Sigma) 中に 3 時間浸す。可溶化膜の試料 (25 ~ 100 μl) を 12 × 75 mm ポリプロピレンチューブに移す。その後、界面活性剤不含可溶化バッファーを試料当たり 4 ml 加え、その試料を素早く (1 ~ 3 秒) GF B / PEI フィルターに通じて、ろ過し、可溶化バッファー 4 ml で洗浄する。フィルターに吸着している受容体：¹²⁵I - リガンド複合体の CPM をガンマ計数により決定する。

【0243】

4. チャコール / デキストラン (Paul 及び Said, Peptides 7 [Suppl. 1], 147-149, 1986)

10

20

30

40

50

。デキストラン T 7 0 (0.5 g、Pharmacia)を水 1 L 中に溶解し、次いで活性化チャコール (Norit A, alkaline; Fisher Scientific) 5 g を加える。その懸濁液を 10 分間室温にて攪拌した後、使用するまで 4 ℃ で維持する。R : L 複合体を測定するため、チャコール/デキストラン懸濁液 4 部容量を可溶化膜 1 部容量に加える。この試料を混合し、氷上で 2 分間維持した後、ベックマン微量遠心管にて $11,000 \times g$ で 2 分間遠心分離する。遊離放射性リガンドをチャコール/デキストランに吸着させ、ペレットを破棄する。上清中に受容体： ^{125}I -リガンド複合体が残留しており、ガンマ計数により決定する。

【0244】

実施例 1 1

受容体精製

10

$\text{G H}_4\text{C 1}$ 膜に対するビオチン化受容体の結合は、上記のように行なう。室温で 1 時間インキュベートする。標準的な精製プロトコルでは、結合インキュベーションには 10 nM Bio-S 2 9 が含まれる。 ^{125}I リガンドを、標的として 5,000 ~ 100,000 cpm/膜タンパク質 mg レベルで加える。コントロール(対照)インキュベーションは、非ビオチン化受容体を用いて受容体を飽和させるための 10 μM 冷リガンドが含まれる。

【0245】

さらに上記のように、0.2 mM MgCl₂を含む可溶化バッファー中の 0.15% デオキシコール酸塩：リゾレクチンを用いて受容体：リガンド複合体の可溶化を行ない、可溶化 R : L 複合体を含む $100,000 \times g$ 上清を得る。

20

【0246】

固定化ストレプトアビジン (6% ビーズアガロースに対するストレプトアビジン架橋結合、Pierce Chemical Co.; 「SAアガロース」) を可溶化バッファー中にて洗浄し、最終量の 30 分の 1 の可溶化膜を加える。この混合物を、終始回転させて定常攪拌しながら、4 ~ 10 ℃ で 4 ~ 5 時間インキュベートする。次いで、その混合物をカラムに充填し、非結合物質を洗い出す。SAアガロースに対する放射性リガンドの結合を、 $100,000 \times g$ 上清中の cpm と SAアガロースに対する吸着後のカラム溶出中の cpm とを比較することで決定する。最終的にカラムを、0.15% デオキシコール酸塩：リゾレシチンと 1/500 (vol/vol) 100×4 パセ(pase) を含む可溶化バッファー 12 ~ 15 カラム容量を用いて洗浄する。

30

【0247】

ストレプトアビジンカラムを、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、0.1 mM GTP-ガンマ-S (シグマ)、0.15% (wt/vol) デオキシコール酸塩：リゾレシチン、1/1000 (vol/vol) 100×4 パセを含む可溶化バッファーを用いて溶出する。初め、カラムに溶出バッファー 1 カラム容量を通じ、流出を 20 ~ 30 分間で止める。その後、さらに溶出バッファー 3 ~ 4 カラム容量を通じる。全ての溶出物を集める。

40

【0248】

ストレプトアビジンカラム由来の溶出物を、固定化コムギ胚芽凝集素 (WGAアガロース、Vector Labs)と共に一晩中インキュベートし、WGAレクチンと共有結合炭化水素との相互作用を介して、この受容体を吸着させる。ストレプトアビジンカラム溶出物に対する WGA - アガロースの割合(vol/vol)は一般に 1:400 である。また 1:1000 ~ 1:200 の割合も用いることができる。結合工程の後、樹脂を遠心分離してペレット化し、その上清を取り出して保存し、その樹脂を 50 mM HEPES、pH 8、5 mM MgCl₂ 及び 0.15% デオキシコール酸塩：リゾレシチンを含む緩衝液中で 3 回(各約 2 分)洗浄する。WGA結合受容体を溶出するため、樹脂を洗浄するのに用いたのと同じ HEPES 緩衝液中の 10 mM N-N'-N''-トリアセチルシトリオースの 3 樹脂カラム容量を毎回用い、氷上にて 15 ~ 30 分間かけて繰り返し混合(低速ボルテックス混合)することを 3 回行なって樹脂を抽出する。各溶出工程の後に、樹脂を遠心分離して、WGAアガロースペレットを含まないよう慎重に上清を取り出す。3 回分の集めた溶出物には最終的な精製受容体が含まれる。WGA に非結合的な物質には、ストレプトアビジンカラム

50

から特異的に溶出されるGタンパクサブユニット及び非特異的混入物が含まれる。これら全てのフラクションを-90で凍結保存する。

【0249】

実施例11

5-HT様GPCR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ウェルマイクロタイヤ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5-HT様GPCRポリペプチドを、生理緩衝溶液pH7.0の小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触させる。5-HT様GPCRポリペプチドは、配列番号2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。

10

【0250】

被験化合物を含む緩衝液を、ウェルから洗い出す。5-HT様GPCR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%ウェル中の蛍光を増大させる被験化合物を、5-HT様GPCRポリペプチドと結合する化合物と同定する。

【0251】

実施例12

5-HT様GPCR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、ヒト胃細胞培養に投与し、37で10～45分間インキュベートする。同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず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。

20

【0252】

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RNA20～30μg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5-HT様GPCR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個の連續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5-HT様GPCR特異的シグナルを低下させる被験化合物を、5-HT様GPCR遺伝子発現の阻害物質として同定する。

30

【0253】

実施例13

組換えヒト5-HT様GPCR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5-HT様GPCRポリペプチドを酵母中に生産させる。ヒト5-HT様GPCRコード化DNA配列は配列番号1に示されるDNA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。

40

【0254】

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、pH3.5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

50

り行なう。精製ヒト5-HT様GPCRポリペプチドを得る。

【0255】

実施例14

5-HT様GPCRの組織特異的発現

種々の組織および組織における5-HT様GPCRの定量的な発現パターンを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって測定した(RT-PCR)

【0256】

5-HT様GPCRがCNS障害に関与することを実証するために、以下の組織をスクリーニングする：胎児および成人脳、筋肉、心臓、肺、腎臓、肝臓、胸腺、睾丸、結腸、胎盤、気管、脾臓、腎臓、胃粘膜、結腸、肝臓、小脳、皮膚、皮質（アルツハイマー病のおよび正常な）、視床下部、皮質、扁桃、小脳、海馬、脈絡膜、神経叢、視床、および脊髄。
10

【0257】

5-HT様GPCRが肥満症の疾患過程に関与することを実証するために、以下の組織において発現を測定する：皮下脂肪組織、腸間膜脂肪組織、副腎、骨髓、脳（小脳、脊髓、大脳皮質、尾状核、髓質、黒質、および被殻）、結腸、胎児脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、脾臓、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋 小腸、脾臓、胃、testes、胸腺、甲状腺 気管、および子宮。神経芽細胞腫細胞系 SK-Nr-Be(2)、Hr、SK-N-A s、HTB-10、IMR-32、SNSY-5Y、T3、SK-N-D2、D283、DAOY、CHP-2、U87MG、BE(2)C、T986、KANTs、MO59K、CHP
20 234、C6(rat)、SK-N-F1、SK-PU-DW、PFSK-1、BE(2)M 17、およびMCIXCを5-HT様GPCR発現について試験する。最後のステップとして、正常人の細胞における5-HT様GPCRの発現を、肥満症の人から得られた細胞の発現と比較する。

【0258】

5-HT様GPCR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（C1ara様）、新たに単離された好中球及び单球、並びに培養された单球（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、骨髓、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。
30

【0259】

5-HT様GPCRが癌に関与していることを実証するために、以下の組織における発現を測定する：副腎、骨髓、脳、小脳、結腸、胎児脳、胎児肝臓、心臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、脾臓、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、小腸、脊髓、脾臓、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、気管、子宮、および末梢血液リンパ球。以下の癌細胞における発現も測定する：DU-145（前立腺）、NCI-H125（肺）、HT-29（結腸）、COLO-205（結腸）、A-549（肺）、NCI-H460（肺）、HT-116（結腸）、DLD-1（結腸）、MDA-MD-231（乳房）、LS174T（結腸）、ZF-75（乳房）、MDA-MN-435（乳房）、HT-1080、MCF-7（乳房）、およびU87。さらに、同一の患者から採取した癌組織と正常組織の対を調べる。
40

【0260】

5-HT様GPCRが糖尿病に関与していることを実証するために、以下の全身パネルをスクリーニングして高いまたは比較的高い発現を示す：皮下および腸間膜脂肪組織、副腎、骨髓、脳、結腸、胎児脳、心臓、視床下部、腎臓、肝臓、肺、乳腺、脾臓、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、小腸、脾臓、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、気管、および子宮。さらに、ヒト島細胞および島細胞ライブラリーを試験する。最後のステップとして、正常人の細胞における5-HT様GPCRの発現を、糖尿病の人から得られた細胞の発現と比較する。
50

【0261】

5-HT様GPCRが喘息の疾患過程に関与していることを実証するために、以下の全身パネルをスクリーニングして肺または免疫組織における高いまたは比較的高い発現を示す：脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、気管、骨髄、結腸、小腸、脾臓、胃、胸腺、乳腺、骨格筋、前立腺、睾丸、子宮、小脳、胎児脳、胎児肝臓、脊髄、胎盤、副腎、胰臓、唾液腺、甲状腺、末梢血白血球、リンパ節、および扁桃腺。このことが一旦確立されれば、以下の肺および免疫系細胞をスクリーニングして、特定の細胞集団に発現を特定する：肺微小血管内皮細胞、気管支/気管上皮細胞、気管支/気管平滑筋細胞、肺線維芽細胞、T細胞(Th1、Th2、NK T細胞、および細胞傷害性Tリンパ球)、B細胞、単核細胞(単球およびマクロファージ)、肥満細胞、好酸球、好中球、および樹状細胞。最後のステップとして、正常な人の細胞における5-HT様GPCRの発現を、喘息の人から得られた細胞の発現と比較する。

10

【0262】

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、産物の量が最初の鋳型のコピー数に比例するというものである。

【0263】

増幅を、標的配列に相補的な、クエンチングを内部に有する(*internally quenched*)蛍光オリゴスクレオチド(TaqManプローブ)の存在下で行なうと、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、最初の鋳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)。

20

【0264】

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。異なる染料で標識した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。

30

【0265】

蛍光のリアルタイムPCR測定はすべて、ABI Prism 7700で行う。

【0266】

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。

【0267】

各RNA 50 μgを、以下の反応混合物中、DNase Iで37℃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。

40

【0268】

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。

【0269】

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

50

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 mg / μLである。逆転写は2.5 μMのランダムヘキサープライマーを用いて行う。

【0270】

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。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)プローブを用いる。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。

【0271】

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。

【0272】

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Mix (2×ストック溶液から) (PE Applied Biosystems, CA)；1×PDARコントロール-18S RNA (2×ストック溶液から)；300 nM フォワードプライマー；900 nM リバースプライマー；200 nM プローブ；10 ng cDNA；及び水を加えて25 mLにする。

【0273】

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。

【0274】

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。

【0275】

実施例15

化合物 / 標的確証のインビボ試験

1. 疼痛：

急性痛

急性痛は、主にラットについてはホットプレート(熱板)で測定される。ホットプレート試験の2つの変法を用いる：典型的な変法は、動物を熱表面(52～56)に置き、動物が侵害防御機構行動、例えば、ステップ又は足舐めを見せるまでの潜伏時間を測定する。もう1つの変法は、実験動物を自然温度表面に置く温度上昇ホットプレートである。次いで、この表面を、動物が後足を舐め始めるまで連続的ではあるがゆっくり熱する。後足を舐め始めた時に達している温度を、疼痛の閾値の尺度とする。

【0276】

化合物を媒体处置コントロール群に対して試験する。物質適用は、疼痛試験前に、異なる適用経路(静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的)を介して異なる時点で行なう。

【0277】

持続痛は、主にラットについてはホルマリン試験又はカプサイシン試験を用いて測定する。1～5%ホルマリン又は10～100 μgカプサイシン溶液を、実験動物の片方の後ろ足に注射する。ホルマリン又はカプサイシンを適用した後、その動物は、たじろぎ、患部の足を舐めたり、噛んだりして侵害防御応答を見せる。90分までの期間内の侵害防御応答の数が、疼痛強度の尺度である。

【0278】

10

20

30

40

50

化合物を媒体処置コントロール群に対して試験する。物質適用は、ホルマリン投与又はカプサイシン投与の前に、異なる適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）を介して異なる時点で行なう。

【0279】

神経因性疼痛は、主にラットにおいては片側坐骨神経損傷の種々の変法により誘導される。操作は感覚消失下で行なわれる。坐骨神経損傷の第一の変法は、共通の坐骨神経周辺を紐でゆるく締め付けることによって行なわれる。第二の変法は、共通の座骨神経の直径が約半分になるまできつく縛ることである。次の変法は、モデル群を用いて、L5とL6脊髄神経又はL5脊髄神経のみ、のいずれかをきつく縛ったもの又は切除したものを作製する。第四の変法は、坐骨神経の3つの末端分枝の2つ（脛骨神経及び共通腓骨神経）を軸索切除し、腓腹神経を無傷で残すことを包含するのに対し、最後の変法は、脛骨分枝のみを軸索切除し、腓腹神経及び共通神経を傷付けずに残すことを含む。コントロール動物は偽手術を用いて処置する。

【0280】

操作後に、神経損傷動物は、慢性機械的異痛症（アロディニア）、冷アロディニア及び温熱性痛覚過敏症を発症する。機械的アロディニアは、圧力変換法（electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA; Electronic von Frey System, Somedic Sales AB, Hourby, Sweden）により測定する。温熱性痛覚過敏症は、患部の後足の侵害防御応答を疼痛強度の尺度として計数する放射熱源法（Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy）又は冷却プレート（5～10）により測定する。冷却誘導型疼痛の更なる試験は、患部の後肢にアセトンを足裏投与した後の侵害防御応答をカウントすること、又は侵害防御応答の期間である。一般に慢性痛は、活性のサークルアンリズムを記録すること（Surjo及びArndt, Universit t zu Koulm, Cologne, Germany）、及び進行の差をスコアリングすること（フットプリントパターン；FOOT PRINTSプログラム, Klapdorら、1997. フットプリントパターン分析の低コスト法、J. Neurosci. Methods 75, 49-54）により評価する。

【0281】

化合物を、偽手術コントロール群及び媒体処置コントロール群に対して試験する。物質適用は、疼痛試験前に、異なる適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）を介して異なる時点で行なう。

【0282】

炎症痛

炎症痛は、主にラットにおいては一方の後足にカラゲナン0.75mg又は完全フロインドアジュバンドを注射することによって引き起こす。動物は、機械的アロディニア及び温熱性痛覚過敏症を伴う浮腫を発症する。機械的アロディニアは、圧力変換器法（electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA）により測定する。温熱性痛覚過敏症は、放射熱源法（Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy, Paw thermal stimulator, G. Ozaki, University of California, USA）により測定する。浮腫測定については、2つの方法を用いる。第一の方法は、動物を屠殺して、患部の後足を細分し、重量を測ることである。第二の方法は、プレチスマーメーター（Ugo Basile, Comerio, Italy）における水の押しのけ容積を測定することによる足のボリューム（量）の差を含む。

【0283】

化合物を、非炎症コントロール群及び媒体処置コントロール群に対して試験する。物質適用は、疼痛試験前に、異なる適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）を介して異なる時点で行なう。

【0284】

ストレプトゾトシン50～80mg/kgを単回腹腔内注射して処置したラットは、1～3週間に内に超高血糖及び機械的アロディニアを発症する。機械的アロディニアは圧力変換器法（electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments,

10

20

30

40

50

Woodland Hills, CA, USA) により測定する。

【0285】

化合物を、糖尿病及び非糖尿病媒体コントロール群に対して試験する。物質適用は、疼痛試験前に、異なる適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）を介して異なる時点で行なう。

【0286】

2. パーキンソン病

6 - ヒドロキシドバミン (6 - OH - DA) 病変

ドーバミン作動性黒質線条体及び線条体淡蒼球経路の変性は、パーキンソン病における中心的な病理現象である。この疾患は、ラットにおいて 6 - OH - DA を内側前脳束 (MF B) 中に単回 / 逐次片側定位 (sequential unilateral stereotaxic) 注射して実験的に模倣した。

【0287】

実験開始時の体重が 200 ± 250 g の雄ウイスターラット (Harlan Winkelmann, Germany) を用いる。実験セッションがない場合、ラットは食料及び水を自由に得ることができ、昼夜 12 時間のサイクルのもと温度や湿度が制御された環境下で飼育する。以下のインビオプロトコールは、政府の権限により認可されている。苦しむ動物を最小限にし、用いる動物の数を減らし、及びインビオ技術の代替案を利用するあらゆる努力をする。

【0288】

動物に、モノアミンオキシダーゼによる 6 - OHDA の代謝を阻害するためパージリン (Sigma, St. Louis, MO, USA; 腹腔内へ 50 mg / kg) と、ノルアドレナリン作動性ターミナルによる 6 - OHDA の取り込みを防止するためであるメチルイミプラミン HC 1 (Sigma; 腹腔内へ 25 mg / kg) とを、外科手術の日に投与する。30 分後、そのラットをペントバービタルナトリウム (50 mg / kg) を用いて麻酔し、定位固定フレームに移す。DA 黒質線条体経路を損傷させるため、6 - OHDA HBr (Sigma) 8 μg を含む 0.01% アスコルビン酸塩 4 μl を、左内側前脳側 (十字縫合(プレグマ)及び頭蓋骨表面に対して 2.4 mm 前側、1.49 mm 側方、-2.7 mm 腹側) に 1 μl / 分の割合で注射する。ニードル (針) は拡散させるために更に 5 分間、所定の位置に置く。

【0289】

ステッピング試験

前肢無動症 (アキネジア) は、損傷設置後の 3 週間、改変ステッピング試験プロトコルを用いて評価する。簡単には、実験者が片手でこの動物の後肢を固定し、表面から一方の後足をわずかに持ち上げて、その動物を維持する。一方の足をはテーブルについており、初めはフォアハンド方向、その次はバックハンド方向へゆっくり側方移動させる (5 秒で 1 m)。調整ステップの数を、両足について移動のバックハンド方向及びフォアハンド方向においてカウントする。試験の順序は、右足フォアハンド及びバックハンド調整ステップ、その次に左足フォアハンド及びバックハンド方向である。この試験は、第 1 回目の試験に先立ち 3 日間の最初のトレーニングの後、連続して 3 日間で 3 回繰り返す。フォアハンド調整ステップは、損傷動物と健康なコントロール動物の間に一致した差がないことは明らかである。従って、分析はバックハンド調整ステップに限定される。

【0290】

バランス試験

ステッピング試験セッションの間に、姿勢検証後のバランス調整も測定する。ラットはステッピング試験に記載のように同じ位置で維持し、側方移動に変えて、実験者がテーブルについた足を前方向へ傾ける。この演習はバランスの喪失の結果となり、前肢移動でバランスを回復するラットの能力を 0 ~ 3 の範囲スケールであるコアーする。スコア -0 は正常な足設置に与えられる。前肢運動は遅れるが、姿勢バランスの回復が検出される場合は、スコア -1 を与える。スコア -2 は、バランス回復は成功していないが、筋肉収縮により証明されるように十分とは言えないが明らかな前肢反応を表し、スコア -3 は行動の反応のないものに与える。この試験は、第 1 回目の試験に先立ち 3 日間の最初のトレーニン

10

20

30

40

50

グの後、3日間連続してそれぞれの側（足）で1日に3回繰り返す。

【0291】

階段試験（足到達）

初期又は第二の損傷設置後の3週間の足到達（リーチング）行動を評価するのに、階段試験の改良法を使用する。中心に台と両端に取り外し可能な階段のあるプレキシガラス試験ボックスを用いる。この器具は、それぞれの階段で同じ側の足のみを用い、独立して足の使用を測定できるように設計することができる。それぞれの試験において、動物を15分間この試験ボックスに置く。各々の側のダブル階段を、7×3飼料の粒（Precision food pellets, formula : P, purified rodent diet, サイズ45mg；Sandown Scientific）で満たす。それぞれの試験の後、各々の足について食べた粒（上手く回収した粒）の数と取得した粒（触ったが、落とした）の数、及びその成功率（食べた粒／取得した粒）を別々に計数する。3日間の食料不足（1日当たり12g／動物）後の動物を11日間試験する。全ての分析は最後の5日間のみで行なう。10

【0292】

MPTP処置

神経毒である1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロ-ピリジン（MPTP）は、げっ歯類、ヒト以外の霊長類及びヒトにおいて中脳ドーパミン作動性（DAergic）ニューロン変性を引き起すことで、多くのパーキンソン病症状を再現する。MPTPは、ドーパミンレベル及びその代謝物レベル、並びに線条体におけるドーパミン作動性ターミナル数の顕著な減少を引き起こし、同様に黒質、パルス緻密質におけるチロシンヒドロキシラーゼ（TH）-免疫応答細胞体の著しい喪失を引き起こす。20

【0293】

重篤で、長期に及ぶ損傷を与え、かつ死亡率を減少させるために、MPTPを動物に単回注射し、その後重症度について損傷の7～10日後に試験する。MPTPの連続注射は、1、2及び3日目に投与する。1日に1度食塩水中のMPTPヒドロクロライド（シグマ）4mg/kgを、動物に適用する。注射は全て腹腔内（i.p.）で行ない、MPTPストック溶液は、注射と注射との間凍結しておく。動物を11日目に断頭する。

【0294】

免疫組織化学

行動実験が終了した時点で、全ての動物をチオペンタール（腹腔内へ1g/40ml、Tyrol Parma）3mlで麻酔する。マウスは、0.01M PBS（pH 7.4）で2分間、次いでPBS中の4%パラホルムアルデヒド（Merck）で15分間、経肛門的に還流する。その脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド中に、4にて24時間置く。その後、脱水のために、それを4の0.1M PBS中の20%スクロース（Merck）溶液に移し、それらを染み込ませる。その脳を-20のメチルブタン内で2分間凍結させ、-70で保存する。スレッジマイクロトーム（mod. 3800-Frigocut, Leica）を用いて、25μmの切片を、脳梁（AP 1.7mm）の膝部から海馬（AP 21.8mm）まで、及びAP 24.16からAP 26.72から得る。46の切片をカットし、0.25Mトリスバッファー（pH 7.4）中に免疫組織化学について分類して保存する。30

【0295】

一連の切片を、遊離-浮動性チロシンデヒドロキシラーゼ（TH）免疫組織化学についての処理する。0.1M PBS中で3回すすいだ後、内因性のペルオキシダーゼ活性を、0.3% H₂O₂±PBS中で10分間クエンチする。PBS中であるすいだ後、切片を、ブロッキング物質として10%正常ウシ血清（シグマ）中で5分間予めインキュベートし、一次抗ラットTHラビット抗血清（希釈率1:2000）のいずれかに移す。40

【0296】

一晩中室温でインキュベートした後、TH免疫応答に対する切片をPBS中であるすぎ（2×10分）、ヤギで產生させたビオチン標識化抗ラビット免疫グロブリンG（希釈率1:200）（Vector）中で90分間インキュベートし、繰り返しすぎ、そしてVectastain ABC（Vector）溶液中に移し1時間置く。0.005% H₂O₂を加えた0.1M P50

B S 中の 3 , . 3 ' - ジアミノベンジジン テトラヒドロクロリド (D A B ; Sigma) は、続
く可視化反応における色素原として働く。切片を、ゼラチンコーティングスライドに盛り
、乾燥させるために一晩中置き、上方 (ascending) アルコール濃度中で脱水化し、かつ
ブチルアセテート中で透明になるヘマトキシリンを用いて対比染色 (counter-stained) す
る。

【 0 2 9 7 】

ローターロッド試験

我々は、 I B M 互換パソコン、 C I O - 2 4 データ取得カード、コントロールユニット、
及び 4 線ローターロッドユニットを含む C R - 1 Rotamex システム (Columbus Instruments, Columbus, OH) を用いる Rozas および Labandeira-Garcia (1997) が記載した手順
の改良法を使用する。このローターロッドユニットは、回転軸 (半径 7.3 cm) と、それ
ぞれのマウスに対する個別のコンピューターとから成る。このシステムソフトウェアは
、回転スピードを変えるように (0 ~ 80 rpm) セッションプロトコールを予めプログラ
ムすることができる。赤外線ビームは、マウスがローターロッドの真下の底辺鉄柵 (base
grid) に落ちた時を検出するために用いる。このシステムでは、落下をマウスについて
の実験の終了として記録し、ローターロッドにおける全時間、並びに落下時間及び全組み
立て (set-up) パラメーターを記録する。また、このシステムでは、トレーニングを目的と
して、微弱電流を底辺鉄柵を通じて流すことができる。

10

【 0 2 9 8 】

3 . 痴呆

20

物体認識課題

物体認識課題は、げっ歯類の認識性能における実験操作の効果を評価するために設計した
。ラットを、同一の物体が 2 個ある開けた空間に置く。ラットは、最初の対物認識課題試
行の間中、両方の物体を調べる。2 度目の試行では、例えば 24 時間の保持間隔の後、最
初の試行で用いた 2 個の物体の内の 1 個「知っている」物体と新しい物体とを、その開け
た空間に置く。この物体それぞれを調べる時間を記録する。OR 課題における基礎的な基
準は、ラットが 2 度目の試行で 2 個の物体を探索するのにかけた時間である。保持の良さ
は、「知っている」物体よりも新たな物体に対する探索時間が長いことに反映される。

30

【 0 2 9 9 】

最初の試行の前に推定される認識エンハンサーを投与することで、習得及び最終的な固定
プロセスにおける効果を評価することができる。最初の試行後の被験化合物の投与は、固定
プロセスにおける効果を評価できるのに対して、2 度目の試行前の投与では、想起プロ
セスにおける効果を測定できる。

30

【 0 3 0 0 】

受動的回避課題

40

受動的回避課題により、ラット及びマウスにおける記憶性能を評価する。抑制的回避機器
は、明区画と暗区画との 2 つの区画を持つ箱から成る。この 2 つの区画は、実験者が操作
できるギロチンドアによって分けられている。ギロチンドアを上げた場合、 2 cm の敷居
で 2 つの区画は分けられている。ドアを開けた場合の暗区画の照度は約 2 lux である。明
区画の中央の床の明度は約 500 lux である。

【 0 3 0 1 】

24 時間のセッション間隔で分けられた 2 つの習慣セッション、 1 つのショックセッショ
ン及び保持セッションが与えられる。ラットは、習慣セッションと保持セッションにおいて
300 秒間器具内を探索することができる。ラットをギロチンドアの反対の壁に頭を
向けた状態で、明区画に置く。 15 秒の適応時間の後、ギロチンドアを器具内の全領域を
自由に動き回れるよう開ける。通常、ラットはまぶしい明領域を避け、数秒の内に暗区
画に入るであろう。

【 0 3 0 2 】

ショックセッションにおいては、ラットが 4 本の足で暗区画に入るやいなや区画間のギロ
チンドアを下ろし、すぐさま 1 mA のフットショックを 2 秒間与える。ラットを器具から

50

取り出し、ホーム籠に戻す。保持セッション中の手順は、習慣セッションの手順と同じである。

【0303】

ステップ通過潜伏、すなわち保持セッション中に暗区画に入る最初の潜伏(秒)は、動物の記憶性能の指標である；暗区画に入る潜伏が長ければ長いほど、保持はよりよい。ショックセッションの30分前に、スコポラミン $1\text{ mg}^* \text{kg}^{-1}$ と一緒に被験化合物を与える。スコポラミンは、24時間後の保持セッション中の記憶性能を損なわせる。被験化合物が、スコポラミン処置コントロールと比較して侵入潜伏を増大させる場合、認識増進させる可能性があり得る。

【0304】

モーリス水脱出課題

モーリス水脱出課題により、げっ歯類における空間方向学習を測定する。ラット及びマウスの認知機能において推定される治療効果を調査するのに広く用いられている試験系である。動物のこの性能は、水面下約1cmのところに沈んでいる避難用台のある円形水タンクにおいて評価する。避難用台は、水タンク中を泳いでいる動物には見えない。机、コンピューター設備、第二の水課題を備え、実験者が居る室内の備品及び優しく響く柵上のラジオにより、膨大な迷路外合図を与える。

【0305】

動物は、日々の獲得セッション5日の間に4回の試行を受ける。試行は、動物をプール中に置き、タンクの壁に頭を向けることによって始める。四分区画、北、西、南及び東の4つの開始位置のそれぞれは一連の4回の試行で1度は用いる(それらの順序は無作為である)。その避難用台はいつも同じ場所にある。試行は、初めにどんな出来事があっても、動物が避難用台に上った時か又は90秒経過した時に終了する。その動物はその台上に30秒間留まることができる。その後台から下し、次の試行を始める。動物が90秒以内に台を見つけられなかった場合でも、実験者がその動物を台の上に置き、30秒間そこに留まらせる。5日目の日々のセッションの第4回目の試行後に、探知試行として更なる試行を行なう：それは、台を取りだし、動物が4つの4分円内で過ごす時間を30秒又は60秒間測定する。この探知試行において、動物は全て、獲得セッションの間に避難用台が置いてあった4分円の反対側の同じ開始位置から始める。

【0306】

動物の性能を評価するため、獲得トレーニングの間に4つの異なる基準：避難潜伏、移動距離、台への距離及び水泳速度を得る。探知試行については以下の基準：4分円内における時間(秒)及び4つの4分円内での移動距離(cm)を評価する。この探知試行は、動物が避難用台の位置をどれくらい良く学習したかについての情報をさらに与える。動物が、獲得セッション中に台のあった4分円内で、その他の4分円における時間および距離よりも、より多くの時間を費やし、より多くの距離を泳いだ場合、これは結論として、台の位置をよく学習したこと示す。

【0307】

推定される認知増進化合物の効果を評価するために、認知機能を損なわせる特定の脳損傷を持つラット若しくはマウス、又は正常な学習を妨げるスコポラミン若しくはMK-801などの化合物で処置した動物、又は認知欠損を患っている高齢動物を用いる。

【0308】

T迷路自発的択一課題

T迷路自発的択一課題(TeMCA T)により、マウスの空間認知性能を評価する。T迷路のスタートアームと2つのゴールアームは、実験者が手動で操作できるギロチンドアを備えている。トレーニングの開始時、マウスをスタートアーム置く。ギロチンドアは閉めてある。最初の試行、「強制試行」では、左又は右のいずれかのゴールアームはギロチンドアを下げてブロックする。マウスがスタートアームから離れた後、迷路を乗り越え、最終的に開いているゴールアームに入り、そしてスタート地点にもどり、そこでギロチンドアを下げることによって5秒間閉じ込められる。次に動物は、14回の「自由選択」試行

10

20

30

40

50

の間に左と右のゴールアームを自由に選ぶことができる（全てのギロチンドアは開いている）。マウスが一方のゴールアームに入るとすぐに、もう一方のゴールアームを閉じる。マウスは最終的にスタートアームに戻り、マウスはスタートアームに5秒間閉じ込められた後、望むいずれのゴールアームにも自由に向かうことができる。1回のセッション中14回の自由選択試行が完了した後、動物を迷路から取り出す。トレーニングの間には、マウスに決して手を触れない。

【0309】

14回後の試行の択一パーセントを計算する。このパーセントと最初の強制試行及び連続14回の選択試行を完了するのに要した時間（秒）とを分析する。認知欠損は、通常、トレーニングセッションの開始30分前にスコポラミンを注射することによって誘導する。スコポラミンは、択一パーセントレベルを偶然レベルか又はそれより低いレベルにまで下げる。通常トレーニング試行の前に投与される認知エンハンサーは、少なくとも部分的には偶発的択一率のスコポラミン誘導型低下を拮抗し得る。10

【0310】

実施例16

糖尿病：化合物／標的検証の *in vivo* 試験

1. グルコース産生

糖新生の速度の増大に起因する、肝臓によるグルコースの過剰産生は、糖尿病における空腹時の高血糖の主要な原因である。一晩絶食した正常なラットまたはマウスは、自由飲食させたストレプトゾトシン誘発性の糖尿病ラットまたはマウスと同様に糖新生の速度が増大した。ラットを40mg/kgのストレプトゾトシンの1回の静脈内注射により糖尿病にし、C57BL/KsJマウスには60mg/kgを5日間連続してi.p.投与する。血糖値を、尾先端の血液から測定し、化合物を異なる経路で投与する（p.o., i.p., i.v., s.c.）。種々の時間で血液を採取した後、グルコースを測定する。あるいは、化合物を数日間投与した後、動物を一晩絶食させる、血液を採取し、血漿グルコースを測定する。グルコース産生を阻害する化合物は、ビーグル処置した対照群と比較して、血漿グルコースレベルを減少させるであろう。20

【0311】

2. インスリン感受性

o b / o b および d b / d b マウスならびに糖尿病Zuckerラットは高血糖、高インスリンおよびインスリン耐性である。動物を予め出血させ、それらのグルコースレベルを測定し、次いでこれらをグループ分けして、平均のグルコースレベルを各群で同じにする。q.dまたはb.i.d.のいずれか、異なる経路（p.o., i.p., s.c.）で7～28日間、化合物を毎日投与する。血液を種々の時間で採取し、血漿グルコースおよびインスリンレベルを測定する。これらのモデルにおいてインスリン感受性を改善する化合物は、ビーグル処置した対照群と比較して、血漿グルコースおよびインスリンレベルの両方を減少させるであろう。30

【0312】

3. インスリン分泌

臍臓からのインスリン分泌を増大させる化合物は、血漿インスリンレベルを増加させ、グルコースを導入する投与後、血漿グルコースの消失を改善するであろう。インスリンレベルを測定するとき、化合物を異なる経路（p.o., i.p., s.c.またはi.v.）で投与して、ラットまたはマウスを一晩絶食させる。適当な時点で静脈内にグルコースを投与し（0.4g/kg）、血液を1分間後に採取する。血漿インスリンレベルを測定する。インスリン分泌を増加させる化合物は、グルコースのみを投与した動物と比較して、血漿インスリンレベルを増大させる。グルコース消失を測定したとき、化合物の投与後、動物を適当な時間で採血した後、グルコースを経口または腹腔内投与（1g/kg）し、15、30、60および90分後に再び採血して、血漿グルコースレベルを測定する。インスリンレベルを増加させる化合物は、ビーグル処置した対照群と比較して、グルコースレベルおよびグルコース曲線下の面積を減少させるであろう。40

【 0 3 1 3 】

臍臓からのインスリン分泌を増大する化合物は、グルコースの投与後、血漿インスリンレベルを増大させ、血漿グルコースの消失を改善するであろう。インスリンレベルを測定するとき、5-HT様GPCRを調節する試験化合物を異なる経路で投与する(p.o., i.p., s.c.またはi.v.)で投与して、ラットまたはマウスを一晩絶食させる。適当な時点で静脈内にグルコースを投与し(0.4 g / kg)、血液を1分間後に採取する。血漿インスリンレベルを測定する。インスリン分泌を増加させる化合物は、グルコースのみを投与した動物と比較して、血漿インスリンレベルを増大させる。グルコース消失を測定したとき、化合物の投与後、動物を適当な時間で採血した後、グルコースを経口または腹腔内投与(1 g / kg)し、15、30、60および90分後に再び採血して、血漿グルコースレベルを測定する。インスリンレベルを増加させる化合物は、ピークル処置した対照群と比較して、グルコースレベルおよびグルコース曲線下の面積を減少させるであろう。10

【 0 3 1 4 】**4 . グルコース産生**

糖新生の速度の増大に起因する、肝臓によるグルコースの過剰産生は、糖尿病における空腹持の高血糖の主要な原因である。一晩絶食した正常なラットまたはマウスは、自由飲食させたストレプトゾトシン誘発性の糖尿病ラットまたはマウスと同様に糖新生の速度が増大した。ラットを40 mg / kgのストレプトゾトシンの1回の静脈内注射により糖尿病にし、C57BL/KsJマウスには60 mg / kgを5日間連続してi.p.投与する。血糖値を、尾先端の血液から測定し、化合物を異なる経路で投与する(p.o., i.p., i.v., s.c.)。種々の時間で血液を採取した後、グルコースを測定する。あるいは、化合物を数日間投与した後、動物を一晩絶食させる、血液を採取し、血漿グルコースを測定する。グルコース産生を阻害する化合物は、ピークル処置した対照群と比較して、血漿グルコースレベルを減少させるであろう。20

【 0 3 1 5 】**5 . インスリン感受性**

ob / obおよびdb / dbマウスならびに糖尿病Zuckerラットは高血糖、高インスリンおよびインスリン耐性である。動物を予め出血させ、それらのグルコースレベルを測定し、次いでこれらをグループ分けして、平均のグルコースレベルを各群で同じにする。q.dまたはb.i.d.のいずれか、異なる経路(p.o., i.p., s.c.)で7~28日間、化合物を毎日投与する。血液を種々の時間で採取し、血漿グルコースおよびインスリンレベルを測定する。これらのモデルにおいてインスリン感受性を改善する化合物は、ピークル処置した対照群と比較して、血漿グルコースおよびインスリンレベルの両方を減少させるであろう。30

【 0 3 1 6 】**6 . インスリン分泌**

臍臓からのインスリン分泌を増大させる化合物は、血漿インスリンレベルを増加させ、グルコースを導入する投与後、血漿グルコースの消失を改善するであろう。インスリンレベルを測定するとき、化合物を異なる経路(p.o., i.p., s.c.またはi.v.)で投与して、ラットまたはマウスを一晩絶食させる。適当な時点で静脈内にグルコースを投与し(0.4 g / kg)、血液を1分間後に採取する。血漿インスリンレベルを測定する。インスリン分泌を増加させる化合物は、グルコースのみを投与した動物と比較して、血漿インスリンレベルを増大させる。グルコース消失を測定したとき、化合物の投与後、動物を適当な時間で採血した後、グルコースを経口または腹腔内投与(1 g / kg)し、15、30、60および90分後に再び採血して、血漿グルコースレベルを測定する。インスリンレベルを増加させる化合物は、ピークル処置した対照群と比較して、グルコースレベルおよびグルコース曲線下の面積を減少させるであろう。40

【 0 3 1 7 】**実施例 1 7**

増殖阻害検定：アンチセンスオリゴヌクレオチドは癌細胞系の増殖を抑制する

試験に用いられる細胞系はヒト大腸癌細胞系 H C T 1 1 6 である。細胞は、10 ~ 15 % 胎児ウシ血清を含む P R M I - 1 6 4 0 中、濃度 1 0 , 0 0 0 細胞 / m l 0 . 5 m l 量にて 3 7 、95 % 空気 / 5 % C O₂ 霧囲気下で培養する。

【 0 3 1 8 】

ホスホロチオネートオリゴリボヌクレオチドは、ホスホロアミディト(phosphoroamidite)ケミストリーを用いる応用バイオシステム モデル 3 8 0 B D N A シンセサイザーにおいて合成する。配列番号 1 の 1 ~ 2 4 位置のヌクレオチドと相補的な 2 4 塩基の配列を、被験オリゴヌクレオチドとして用いる。コントロールとして、他の(ランダム)配列: 5' - T C A A C T G A C T A G A T G T A C A T G G A C - 3' を用いる。アセンブリーと脱保護に次いで、オリゴヌクレオチドを、エタノール沈殿 2 回、乾燥、そしてリン酸緩衝液中に所望の濃度に懸濁する。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 H P L C によって試験する。精製オリゴヌクレオを、培養培地に 7 日間、1 日ごとに 1 度 1 0 μM 濃度を加える。10

【 0 3 1 9 】

7 日間の被験オリゴヌクレオチド添加により、ヒト 5 - H T 様 G P C R の発現は、ウェスタンブロッティングにより決定されるように有意に低下する。この効果は、コントロールオリゴヌクレオチドでは観察されない。3 ~ 7 日の後、培養中の細胞の数を、自動細胞カウンターを用いて計数する。被験オリゴヌクレオチドで処理した培養中の細胞の数を、コントロールオリゴヌクレオチドで処理した培養中の細胞の数(100 % と表す)と比較する。被験オリゴヌクレオチドで処理した培養中の細胞の数は、コントロールの 30 % を超えない、このことはヒト 5 - H T 様 G P C R の阻害が、癌細胞において抗増殖効果を有することを示している。20

【 0 3 2 0 】

化合物 / 標的確証のインビオ試験

1. 急性機械的検定

1.1. 分裂促進血漿ホルモンレベルの低下

この非腫瘍検定では、内因性の循環ホルモンレベル又は生物学的刺激に応答して生産されるホルモンレベルのいずれかを低下させる化合物の能力を測定する。げっ歯類に被験化合物を投与(経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与)する。被験化合物投与後の所定時間に、血漿を採取する。目的のホルモンレベルについて、血漿を検定する。ホルモンの標準循環レベルが低すぎる、及び/又は可変過ぎて一致した結果が得られない場合は、生物学的刺激で前処理してホルモンレベルを亢進することができる(即ち、L H R H 3 0 n g / マウス用量をマウスに筋肉内注射して、テストステロン合成を群発させることができる)。血漿採取の時期を調整して、誘導したホルモン応答のピークを一致させることができよう。化合物効果を、媒体处置コントロール群と比較する。F 試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデント t 試験を行なう。媒体コントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である。30

【 0 3 2 1 】

1.2. 活性検定の中空纖維メカニズム

中空纖維は、所望の細胞系(群)を用いて調製し、げっ歯類に腹腔内及び/又は皮下移植する。化合物は、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。纖維を、特定のげっ歯類検定プロトコル(遺伝子発現(d D N A、P C R 又は T a q m a n)、特定の生化学活性(例えば、c A M P レベル)についての検定を含み得る)に基づいて回収する。結果は、群間の分散を F 試験によって比較し(媒体コントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である)、スチューデント t 試験又は順位和試験によって分析する。40

【 0 3 2 2 】

2. 亜急性機能インビオ検定

2.1. ホルモン依存的組織量の低下

これは、ホルモン依存性組織(即ち、雄の精嚢及び雌の子宮)の質量を低下させる化合物の能力を測定する別の非腫瘍検定である。げっ歯類に、被験化合物を所定のスケジュール50

に基づき、所定の期間（即ち、1週間）投与（経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下）する。この実験の最後に、動物の体重を測り、標的器官を切除し、全ての体液を搾り出し、その器官の重量を記録する。また、血漿も回収できる。血漿は、目的のホルモンレベル又は被験物質レベルについて検定することができる。器官重量を直接比較するか、それらを動物の体重について標準化することができる。化合物の効果を、媒体処置コントロール群と比較する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデントt試験を行なう。媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である。

【0323】

2.2. 中空纖維増殖検定

中空纖維は、所望の細胞系（群）を用いて調製し、げっ歯類に腹腔内及び／又は皮下移植する。化合物は、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。纖維を、特定のげっ歯類検定プロトコルに基づいて回収する。細胞増殖は、細胞数マーカー（即ち、MTT又はLDH）を測定することによって決定する。細胞数と出発接種材料からの細胞数の変化を、群間の分散をF試験（媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である）によって比較した後、スチューデントt試験又は順位和試験によって分析する。

【0324】

2.3. 抗血管新生モデル

2.3.1. 角膜血管新生

成長因子を伴う若しくは伴わないヒドロンペレット又は細胞を、げっ歯類の角膜に外科的に作ったマイクロポケット中に移植する。化合物（ヒドロンペレット中に成長因子と混合した化合物）を、全身又は局所投与することができる。移植の7日後にコロイド性カーボンを心臓内注入した後すぐに、角膜を回収し、そして10%ホルマリン中に固定する。読み取りは、定性的スコアリング及び／又はイメージ分析で行なう。定性的スコアを順位和試験により比較する。イメージ分析データは、血管新生領域（ピクセル内）を測定することによって評価し、群平均をスチューデントt試験（2テイル）によって比較する。成長因子又は細胞のみの群と比較して、有意性はp値0.05以下である。

【0325】

2.3.2. マトリゲル(Matrigel)血管新生

細胞又は成長因子を含有するマトリゲルを、皮下注射する。化合物を、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。マトリゲルプラグを、所定の時点（群）で回収し、読み取りのために調製する。読み取りは、ヘモグロビン濃度及び／又は組織学試験についてのELISAを基礎とする検定である（即ち、容器カウント、内皮表面マーカーの特殊染色：CD31、因子-8）。読み取りは、群間の分散をF試験によって比較した後（媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である）、スチューデントt試験によって分析する。

【0326】

3. 原発性抗腫瘍効果

3.1. 初期治療モデル

3.1.1. 皮下腫瘍

腫瘍細胞又は破碎物（フラグメント）を、0日目に皮下移植する。媒体及び／又は化合物を、ある時、通常1日目に開始する所定のスケジュールに基づいて経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与し、次いでその能力について腫瘍重量(burden)を測定する。体重及び腫瘍測定を週に2、3回記録する。正味の体重及び腫瘍重量の平均を、それぞれのデータ収集日ごとに計算する。抗腫瘍効果は、既定の日に処置腫瘍のサイズ(T)及びコントロール腫瘍のサイズ(C)を、群間の分散をF試験により比較した後（有意性はp0.05以下で決められる）、スチューデントt試験により比較することで最初に決定することができる。また、この実験は、腫瘍成長遅延をモニターし記録して腫瘍測定を継続する場合には、投与の終了後にも継続できる。腫瘍成長遅延は、予め定めたサイズに達したコントロール群の中央時間で、該サイズに達した処置群とコントロール群の中央時間を割った

10

20

30

40

50

ものの差として表される。成長遅延は、評価サイズに達した個々の腫瘍についての時間からカプラン - マイヤー曲線を作成することによって比較する。有意性は p 0 . 0 5 以下である。

【 0 3 2 7 】

3 . 1 . 2 . 腹腔内 / 頭蓋内腫瘍モデル

腫瘍細胞を、0日目に腹腔内又は頭蓋内注射する。化合物を、1日目に開始する所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。羅患率及び / 又は死亡率の観察を、1日に2回記録する。体重は1週間に2回測定し記録する。羅患率 / 死亡率のデータを、生存中央値の期間で表し、長期生存数は分けて示す。生存時間を使って、カプラン - マイヤー曲線を作成する。この実験のコントロール群と比較した対数範囲試験による有意性は p 0 . 0 5 以下である。10

【 0 3 2 8 】

3 . 2 . 疾患モデルの確立

腫瘍細胞又は破碎物を、皮下的に移植し、処置を開始するのに所望のサイズにまで成長させる。所定のサイズ範囲に達する、マウスを処置群に無作為に分ける。化合物を、所定のスケジュールに従い、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。腫瘍重量及び体重を、1週間に2~3回測定し記録する。インキュベート後の幾日かに渡って全群の腫瘍重量の平均値を、比較のためにグラフにする。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデント t 試験を処置終了時点の処置群及びコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である。腫瘍測定は、投与を止め腫瘍成長遅延をモニターした後に、記録することができる。腫瘍成長遅延は、所定のサイズに達したコントロール群の中央時間で、所定のサイズに達した処置群とコントロール群の中央時間を割ったのものの差として表される。成長遅延は、評価サイズに達した個々の腫瘍についての時間からカプラン - マイヤー曲線を作成することによって比較する。媒体コントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である。20

【 0 3 2 9 】

3 . 3 . 同所性疾患モデル

3 . 3 . 1 . 哺乳類脂肪体検定

哺乳動物の腺癌起源の腫瘍細胞又は破碎物を、外科的に露出させて表出させ、げっ歯類の乳腺脂肪体(fat pad)に直接移植する。その脂肪体を元あった場所に戻し、外科部分を閉じる。また、ホルモンを、腫瘍の成長を補助するためにげっ歯類に投与することもできる。化合物を所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。腫瘍重量及び体重を、1週間に2~3回測定し記録する。接種後の幾日かに渡って全群の腫瘍重量の平均値を、比較のためにグラフにする。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデント t 試験を処置終了時の処置群及びコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である。30

【 0 3 3 0 】

腫瘍測定は、投与を止め腫瘍成長遅延をモニターした後に、記録することができる。腫瘍成長遅延は、所定のサイズに達したコントロール群の中央時間で、所定のサイズに達した処置群とコントロール群の中央時間を割ったのものの差として表される。成長遅延は、評価サイズに達した個々の腫瘍の中央時間からカプラン - マイヤー曲線を作成することによって比較する。媒体コントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である。さらに、このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を提供する。転移反応は、標的器官当たりの目視できる病巣(フォーカス)の数を計数すること、又は標的器官重量を測定することによって、この研究の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後(この実験のコントロール群と比較して有意性は p 値 0 . 0 5 以下である)、スチューデント t 試験によって比較する。40

【 0 3 3 1 】

3.2.2. 前立腺内検定

前立腺癌器官の腫瘍細胞又は破碎物を、外科的に露出させたげっ歯類の前立腺の背葉に直接移植する。移植組織が精囊に侵入しないことを検証しながら、腫瘍を特に背葉に移植することができるので、腹部切除して前立腺を外面化する。上手く接種した前立腺を腹部に移し、腹部に沿った切開部及び皮膚を閉じる。また、ホルモンを、腫瘍の成長を助けるためにげっ歯類に投与することもできる。化合物を、所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。体重を1週間に2~3回測定し記録する。所定の時点で実験を終了し、動物を解剖する。原発性腫瘍サイズを、解剖範囲に装着させるキャリパーやマイクロメーターのいずれかを用いて三次元測定する。

F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデントt試験を処置終了時の処置群及びコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である。このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を与える。転移反応は、標的器官(即ち、肺)当たりの目視できる病巣の数を計数すること、又は標的器官(即ち、局所的リンパ節)重量を測定することによって、この研究の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後(この実験のコントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である)、スチューデントt試験によって比較する。

【0332】

3.3.3. 気管支内検定

肺器官の腫瘍細胞を、皮膚を切開し、気管を曝すことによって、気管支内に移植することができる。気管支は、斜端の25ゲージニードルを用いて穴を開け、腫瘍細胞を、主要な気管支に屈曲90°の平滑端の27ゲージニードルを用いて接種する。化合物を、所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。体重を1週間に2~3回測定し記録する。所定の時点で実験を終了し、動物を解剖する。原発性腫瘍サイズを、解剖範囲に装着させるキャリパーやマイクロメーターのいずれかを用いて三次元測定する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデントt試験を処置終了時の処置群及びコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である。このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を与える。転移反応は、標的器官(即ち、反対側の肺)当たりの目視できる病巣の数を計数すること、又は標的器官重量を測定することによって、この研究の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後(この実験のコントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である)、スチューデントt試験によって比較する。

【0333】

3.3.4. 盲腸内検定

胃腸器官の腫瘍細胞を、腹部の皮膚を切開し、腸を外面化することで盲腸内移植することができる。腫瘍細胞を、27又は30ゲージニードルを用いて、腸の管腔を貫通することなく、盲腸壁に接種することができる。化合物を、所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。体重を1週間に2~3回測定し記録する。所定の時点で実験を終了し、動物を解剖する。原発性腫瘍サイズを、解剖範囲に装着させるキャリパーやマイクロメーターのいずれかを用いて三次元測定する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いであるチューデントt試験を処置終了時の処置群及びコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である。このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を与える。転移反応は、標的器官(即ち、肝臓)当たりの目視できる病巣の数を計数すること、又は標的器官重量を測定することによって、この研究の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後(エンドポイント両方の実験におけるコントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である)、スチューデントt試験によって比較する。

【0334】

10

20

30

40

50

4. 繰発性(転移性)抗腫瘍効果

4.1. 自発転移

腫瘍細胞を皮下接種させ、腫瘍を肺又は肝臓への自発的転移研究のため予め定めた範囲にまで成長させる。次いで、この原発性腫瘍を切除する。腫瘍転移の初期段階を阻害することを目的とした治療を評価するために原発性腫瘍を切除するまでの期間を含むことある所定のスケジュールに従い、化合物を、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。罹患率及び/又は死亡率の観察を毎日記録する。1週間に2回、体重を測定し記録する。可能な指標(エンドポイント)には、生存時間、標的器官当たりの目視できる病巣の数、又は標的器官重量が挙げられる。生存時間をエンドポイントとして用いた場合、他の値は定まらない。生存データは、カプラン-マイヤー曲線を作成するのに用いる。この実験のコントロール群と比較して対数範囲試験による有意性はp 0.05以下である。解剖マイクロスコープの下で決定されるような目視できる腫瘍の病巣数の平均と、標的器官重量の平均値は、F試験を行なった後(エンドポイント両方の実験におけるコントロール群と比較して有意性はp 値0.05以下である)、スチューデントt試験によって比較する。10

【0335】

4.2. 強制的転移

腫瘍細胞を、尾静脈、門脈、又は心臓の左心室、実験用(強制的)肺、肝臓及び骨転移研究それぞれにおいて注射する。化合物を、所定のスケジュールに基づいて、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内又は皮下投与する。罹患率及び/又は死亡率の観察を毎日記録する。1週間に2回、体重を測定し記録する。可能な指標には、生存時間、標的器官当たりの目視できる病巣の数、又は標的器官重量が挙げられる。生存時間をエンドポイントとして用いた場合、他の値は決定されない。生存データは、カプラン-マイヤー曲線を作成するのに用いる。この実験のコントロール群と比較して対数範囲試験による有意性はp 0.05以下である。解剖マイクロスコープの下で決定される目視できる腫瘍の病巣数の平均と、標的器官重量の平均値は、F試験を行なった後(両方エンドポイントの実験における媒体コントロール群と比較して有意性はp 値0.05以下である)、スチューデントt試験によつて比較する。20

【0336】

実施例19

G_i-、G_s-およびG_q-共役レセプターのスクリーニング

G_i-共役レセプター

細胞(C H O細胞または一次細胞など)は適切なレセプターおよび誘発可能なC R E--ルシフェラーゼ構築物で安定にトランスフェクトされる。細胞は、50%D u l b e c c oの修飾イーグル培地/10%F B Sで補足された50%F 1 2(D M E M / F 1 2)(37、10%のC O₂を含む加湿大気中)中で成長させ、2または3日ごとに定期的に1:10に比で分割する。試験培養は、D M E M / F 1 2とF B S中で適切な濃度(例えば35μlの細胞培養培地中1ウェルあたりの2000個の細胞)で384-ウェルプレート中にシードされ、48時間(細胞系によって~24から60時間の範囲)成長させる。成長培地を次に、0, 1%B S Aを含む無血清培地(S F M; 例えば超C H O)に対して交換する。40

【0337】

D M S O中に溶解された試験化合物をS F Mで希釈し、試験培地(最大最終濃度10μモル)へ移し、つづいて10分後にS F M + 0, 1%B S A中フォルスコリン(~1μモル、最終濃度)を添加する。両方をスクリーニングするアンタゴニストの場合、適当な濃度の作用物質、およびフォルスコリンを添加する。プレートを10%C O₂中、37で3時間インキュベートする。次に、上清を除去し、細胞を溶解試薬(25ミリモルのリン酸塩緩衝液、p H 7.8、2ミリモルのD D T、10%グリセロールおよび3%のT r i t o n X 1 0 0を含む)で溶解させる。

【0338】

ルシフェラーゼ反応は基質-緩衝液(例えばルシフェラーゼ分析試薬、P r o m e g a)50

の添加によって開始され、発光をすぐに定量する（例えば Berthold 照度計または Hamamatsu カメラシステム）。

【0339】

G_s結合レセプター

細胞（CHO 細胞または一次細胞など）は適切なレセプターおよび誘発可能なCRE--ルシフェラーゼ構築物で安定にトランスフェクトされる。細胞は、50% Dulbecco の修飾イーグル培地 / 10% FBS で補足された 50% F12 (D MEM / F12) (37、10% の CO₂ を含む加湿大気中) 中で成長させ、2 または 3 日ごとに定期的に 1 : 10 に比で分割する。試験培養は、D MEM / F12 と FBS 中で適切な濃度（例えば 35 μl の細胞培養培地中 1 ウェルあたりの 1000 または 2000 個の細胞）で 38 4 - ウェルプレート中にシードされ、48 時間（細胞系によって ~24 から 60 時間の範囲）成長させる。0, 1% BSA を含む無血清培地 (SFM；例えば超 CHO) に試験化合物を添加することにより分析を開始する。10

【0340】

試験化合物を DMSO 中に溶解させ、SFM で希釈し、試験培地（最大最終濃度 10 μモル、DMSO 濃度 < 0.6%）へ移す。プレートを 10% CO₂ 中、37 度で 3 時間インキュベートする。次に、1 ウェルあたり 10 μl の試薬（25 ミリモルのリン酸塩緩衝液、pH 7.8、2 ミリモルの DDT、10% グリセロールおよび 3% の Triton X 100 を含む）で溶解させる。20

【0341】

ルシフェラーゼ反応は 1 ウェルあたり 20 μl 基質 - 緩衝液（例えばルシフェラーゼ分析試薬、Promega）の添加によって開始される。発光の定量をすぐに開始する（例えば Berthold 照度計または Hamamatsu カメラシステム）。

【0342】

G_q結合レセプター

細胞（CHO 細胞または一次細胞など）は適切なレセプターで安定にトランスフェクトされる。細胞は、50% Dulbecco の修飾イーグル培地 / 10% FBS で補足された 50% F12 (D MEM / F12) (37、5% の CO₂ を含む加湿大気中) 中で成長させ、3 または 4 日ごとに定期的に 1 : 10 に比で分割する。試験培養は、D MEM / F12 と FBS 中で適切な濃度（例えば 35 μl の細胞培養培地中 1 ウェルあたりの 200 個の細胞）で 38 4 - ウェルプレート中にシードされ、48 時間（細胞系によって ~24 から 60 時間の範囲）成長させる。成長培地を次に生理学的塩溶液（例えば、Tyrode 液）に対して交換する。30

【0343】

DMSO 中に溶解させた試験化合物を、0.1% BSA を含む Tyrode 液で希釈し、試験培地（最大最終濃度 10 μモル）へ移す。レセプター特異性作用物質の添加後、結果後して得られる G_q により媒介される細胞内カルシウム増加を、適当な読みとりシステム（例えば、カルシウム感受性色素）を用いて測定する。

【0344】

実施例 20

プロモーター分析

プロモーター分析は、興味のある（例えば、甲状腺ホルモン）調節プロモーターの制御かで、ルシフェラーゼで安定にトランスフェクトされたヒト肝細胞ガン細胞 HepG2 で開始された。トランスフェクションのために使用されたベクター 2 × IRO1uc は、tk 最小プロモーターとルシフェラーゼの遺伝子の前に 8 bp のスペーサーで分離された 2 つの 12 bp 逆パリンドローム配列の甲状腺ホルモン反応性エレメント (TRE) を有する。

【0345】

試験培養物を、グルタミン、トリシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、インシュリン、セレン、トランスフェリンで補足された無血清イーグル最小基本培地中、96 - 40

50

ウェルプレート中に接種し、10%CO₂、37で加湿された大気中、培養した。48時間インキュベーションした後、試験化合物または参照化合物（例えば、LT3、L-T4）および適当ならば共同刺激因子（最終濃度1nM）の連続希釈を細胞培養物に添加し、最適時間（例えばさらに4-72時間）インキュベーションを続けた。細胞を次に、Trition X 100およびルシフェリンを含む緩衝液の添加により溶解させ、T3によって誘発されたルシフェラーゼまたは他の化合物の発光は照度計で測定した。試験化合物のそれぞれの濃度について、4回の反復試験を行った。各試験化合物についてのEC₅₀値をGraph Pad Prism Scientificソフトウェアの使用により計算した。

【0346】

10

発現プロファイリング

定量的PCR法による遺伝子発現の詳細な分析のために、興味のあるゲノム領域に隣接するプライマーおよび中間をハイブリダイズする蛍光標識されたプローブを利用する。PE Applied Biosystems (PerkinElmer、フォスター・シティー、CA、USA) の PRISM 7700 配列検出システムと蛍光リポーター色素およびクエンチャー色素の両方で標識されたオリゴヌクレオチドからなる蛍光原プローブの技術を用いて、このような発現測定を行なうことができる。プローブ特異的生成物の増幅はプローブの開裂を引き起こし、リポーター蛍光の増加を生み出す。プライマーおよびプローブは、プライマーエクスプレスソフトウェアを使って選択されて、Affymetrix HG_U95A-EまたはHG-U133ABDNAチップの構築のために用いられるプローブ配列の相対的位置に従ってコーディング配列の3'領域または3'未翻訳領域（プライマーと調査連続のために表5参照）にほとんど局在化していた。すべてのプライマー対は慣用のPCR反応により特異性についてチェックされた。サンプルRNAの量を標準化するために、GAPDHは分析されたサンプルにおいて差次的に調節されていないので、GAPDHを基準として選択した。TaqMan確認実験が行われ、標的および対照増幅の効率はほぼ等しいことが示され、このことは当業者に公知の比較のCT法による遺伝子発現の相対的定量化のために必須条件である。

PerkinElmerにより提供される技術と同様に、Roche Inc. から得られるLightcyclerまたはStratagene Inc. から得られるiCyclerのような他の器具を用いることができる。

30

【0347】

30

発現プロファイリングは、Affymetrix Array Technologyを用いて行なうことができる。mRNAのこのようなDNAアレイまたはDNAチップとのハイブリダイゼーションによって、アレイのある特定の位置でのシグナルの強さによりそれぞれの転写物の発現値を同定することが可能である。通常、これらのDNAアレイはcDNA、オリゴヌクレオチドまたはサブクローンされたDNA断片のスポットティングにより得られる。Affymetrix技術の場合、約400,000の個々のオリゴヌクレオチド配列が別個の位置においてシリコンウエハーの表面で合成された。オリゴマーの最小の長さは12ヌクレオチド、好ましくは25ヌクレオチド、または問題となる転写物の完全長である。発現のプロファイリングは、ナイロンまたはニトロセルロース膜に結合したDNAまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより行なうことができる。ハイブリダイゼーションから得られるシグナルの検出は、比色、蛍光、電気化学的、電子、光学または放射性読出装置のいずれかにより得ることができる。アレイ構築の詳細な説明はすでに記載され、また引用された他の特許において記載されている。分析するために染色体領域における量的および質的な変化を決定するために、このようなゲノム改変を含んでいると思われる腫瘍組織から得られるRNAを、全トランスクリプトム(transcriptome)の発現プロファイリングに基づいて、良性組織（例えば上皮乳房組織、または顕微解剖された管組織）から抽出されたRNAと比較しなければならない。わずかに改変して、サンプル調製プロトコルは、Affymetrix GeneChip発現分析マニュアル（サンタクララ、CA）に従った。良性組織、生検、細胞単離物または

40

50

細胞を含む体液からの全RNA抽出および単離は、TRIzol (Life Technologie、ロックビル、MD) およびOligotex mRNA Midikit (Qiagen、Hilden、ドイツ) を使って行うことができ、濃度を1mg/mlにするためにエタノール沈降工程を行なうべきである。第一のストランドcDNA合成はT7-(dT24)オリゴヌクレオチドを用いてプライムされた。cDNAはフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させて、最終濃度1mg/mlにすることができる。生成したcDNAから、Enzo (Enzo Diagnostics Inc.、Farmingdale、NY) インビトロ転写キットを使ってcRNAを合成することができる。同じ工程の中で、cRNAはビオチンヌクレオチドBio-11-CTPおよびBio-16-UTP (Enzo Diagnostics Inc.、Farmingdale、NY) で標識することができる。標識およびクリーンアップ (Qiagen、Hilden (ドイツ)) 後、cRNAを次に適当な細分緩衝液 (例えば、40ミリのTris-酢酸塩、pH 8.1、100mM KOAc、30mMのMgOAc、94で35分間) 中で細分化する。Affymetrixプロトコルにより、細分化されたcRNAを、それぞれ約40,000のプローブされた転写物を含むHG_U133アレイ上で、24時間、60rpmで、45のハイブリダイゼーションオープン中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション工程後、チップ表面を洗浄し、Affymetrixフルイディクスステーションにおいてストレプトアビジンフィコエリトリン (SAPE; Molecular Probes、Eugene、OR) で染色しなければならない。染色を増幅するために、第二の標識工程を導入することができ、これはされていないが、強制ではない。抗ストレプトアビジンビオチニル化抗体をSAPE溶液に2回添加する。プローブアレイへのハイブリダイゼーションは、蛍光分析スキャニング (Hewlett Packard遺伝子アレイスキャナー; Hewlett Packard Corporation、パロアルト、CA) により検出できる。

【0348】

ハイブリダイゼーションとスキャニングの後に、ミクロアレイ像は、ハイブリダイゼーションシグナルにおける主要なチップ欠陥または異常を探して、品質管理のために解析することができる。そのためにAffymetrix GeneChip MAS 5.0ソフトウェアまたは他のミクロアレイ画像解析ソフトウェアを利用することができる。基本データ分析は製造業者により提供されたソフトウェアによって実行されるべきである。

遺伝子分析の場合、本発明の1つの具体例において、基本データは別の生物情報手段ツールおよび追加のフィルター基準によって分析された。生物情報分析は以下に詳細に記述される。

【0349】

Affymetrix測定技術 (Affymetrix GeneChip Expression Analysis Manual、サンタクララ、CA) に従って、1つのチップに関する一つの遺伝子発現測定により平均の差値と絶対の判定が得られる。それぞれのチップは、遺伝子またはcDNAクローニングにつき16から20のオリゴヌクレオチドプローブ対を含む。これらのプローブ対は完全にマッチするセットおよびミスマッチするセットを含み、その双方が、完璧なマッチの強度からミスマッチの強度を引くことにより計算される、各プローブ対の強度の尺度である、平均的差、または発現値の計算に必要である。これは、蛍光強度に影響を与えることができるプローブ対および他のハイブリダイゼーション人為要素間でのハイブリダイゼーションで変動性を考慮に入れる。平均の差は該遺伝子の発現値を表すと思われる数値である。絶対的コールは値「A」(欠如している)、「M」(ほとんどない)、または「P」(存在する)をとることができて、一つのハイブリダイゼーションの質を示す。本発明者らは平均の差によって与えられた量的な情報と絶対的コールによって与えられた質的な情報の両方を、正常な集団からの生物学的サンプルに対して乳がんにかかった個人からの生物学的サンプルにおいて差別的に発現される遺伝子を識別するために使用した。Affymetrix以外のアルゴリズムを用いて、本発明者らは比較により同じ発現値と発現差を表す異なった数の値を得た。

10

20

30

30

40

50

【0350】

較正CT値の計算

CT値を上に記載したとおり計算する。CF値は、以下のとおり計算する。

1. cDNAサンプルについてハウスキーピング遺伝子 (HKG)を定量するためにPCR反応を設定する。

2. CT_{HKG} 値を上記のとおり計算した。

3. 各cDNAについてのすべてのHKGのCT平均値を計算する($n = HKG$ の数):

$$(CT_{HKG1} \text{ 値} + CT_{HKG2} \text{ 値} + CT_{HKG-X} \text{ - 値}) / n = CT_{cDNA-X} \text{ - 平均値}$$

($n = HKG$ の数)

$$4. (CT_{cDNA-1} \text{ - 平均値} + CT_{cDNA-X} \text{ - 平均値}) / y = CT_{panel} \text{ - 平均値}$$

($y = cDNA$ の数)

$$5. CT_{panel} \text{ - 平均値} - CT_{cDNA-X} \text{ - 平均値} = CF_{cDNA-X}$$

$$6. CT_{cDNA-X} + CF_{cDNA-X} = CT_{cor-cDNA-X}$$

【0351】

定義: 最も高い $CT_{cor-cDNA-X}$ 40 は $CT_{cor-cDNA-X}$ [高い]と定義する。

$$\text{比発現量} = 2e(CT_{cor-cDNA-X} \text{ [高い]} - CT_{cor-cDNA-Y})$$

結果を図11～13に示す。ヒトセロトニン様GPCRは種々の比と組織で発現する。セロトニンGPCR mRNAは、小脳、中心後回、後根神経節、赤血球、肺 COPD、食道、回腸慢性炎症、前立腺BPH、およびペニスでの発現量が高い。

【0352】

セロトニン様GPCR mRNAは、小脳、中心後回、後根神経節等の種々の脳組織において発現量が高い。上記組織における発現は、ヒトセロトニン様GPCRと末梢および中枢神経系の疾患との関連を示唆している。

【0353】

セロトニン様GPCR mRNAは、前立腺BPHおよびペニスでの発現量が高い。上記組織での発現は、ヒトセロトニン様GPCRと生殖・泌尿器系の疾患との関連を示唆している。

【0354】

セロトニン様GPCR mRNAは、肺COPDでの発現量が高い。上記組織での発現は、ヒトセロトニン様GPCRと呼吸器系の疾患との関連を示唆している。

【0355】

セロトニン様GPCR mRNAは、赤血球での発現量が高い。上記組織での発現は、ヒトセロトニン様GPCRと血液の疾患との関連を示唆している。

【0356】

実施例22

麻酔ラットにおける周期的な等積膀胱収縮の測定

(1) 動物

雌性のSprague-Dawleyラット (200～250 g / Charles River Japan)を用いる。

(2) カテール移植

ラットを1.25 g / kg のウレタン (Sigma) の腹腔内投与によって麻酔する。正中切開により開腹し、ポリウレタンカテーテル (BECTON DICKINSON, PE50) をドームを介して膀胱へ移植する。並行して、鼠径部を切開し、生理食塩水 (Otsuka) を満たしたポリウレタンカテーテル (BECTON DICKINSON, PE50) を大腿静脈へ挿入する。

(3) 膀胱収縮の測定

自発的な膀胱収縮が起こるまで、カテーテルを介して膀胱を増加体積の生理食塩水で満たす。膀胱腔内圧を圧力変換器で測定し、チャートレコーダーに継続的に表示する。大腿静脈に挿入したポリエチレンカニューレを介して静脈内投与した後、試験化合物の能力を調べる。

【0357】

コンシャスラットにおける膀胱内圧の測定

10

20

30

40

50

(1) 動物

雌性のSprague-Dawleyラット(200~250g / Charles River Japan)を用いる。

(2) カテーテル移植

ラットをケタミン(75mg/kg)およびキシラジン(15mg/kg)の筋肉内投与によって麻酔する。正中切開により開腹し、ポリウレタンカテーテル(BECTON DICKINSON, PE50)をドームを介して膀胱へ移植する。カテーテルを、針(14G)を用いて、ラットの皮下組織の下から首へとくぐらせる。並行して、鼠径部を切開し、生理食塩水(Otsuka)を満たしたポリウレタンカテーテル(BECTON DICKINSON, PE50)を大腿静脈へ挿入する。カテーテルを、針を用いて、ラットの皮下組織の下から首へとくぐらせる。

(3) 膀胱内圧測定

T-チューブ(Viggo-Spectramed Pte Ltd, DT-XXAD)で膀胱のカテーテルを圧力変換器およびマイクロインジェクションポンプ(TERUMO)とを連結する。室温、10mL/時間にて膀胱に生理食塩水を灌流させる。膀胱内圧を、チャート・ペン・レコーダー(Yokogawa)で継続的に記録する。試験化合物を投与する前に、少なくとも3回の再現性ある排尿周期を記録する。

(4) 試験化合物の投与

エタノール、Tween 80(ICN Biomedicals Inc.)および生理食塩水の混合物(1:1:8, v/v/v)溶解した試験化合物をカテーテルを介して静脈内投与する。

【0358】

参考文献

1. Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT1D alpha and 5-HT1D beta. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Apr 15;89(8):3630-4
2. Cloning and expression of the human 5-HT1B-type receptor gene. Biochem Biophys Res Commun 1992 Jun 15;185(2):517-23
3. Molecular cloning of a human serotonin receptor (S12) with a pharmacological profile resembling that of the 5-HT1D subtype. J Biol Chem 1992 Apr 15;267(11):7553-62
4. Human serotonin1B receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. Biochemistry 1993 Nov 2;32(43):11727-33

【図面の簡単な説明】

【0359】

【図1】5-HT様GPCR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. P28222|5H1B_HUMAB5 - HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR(5-HT-1B)(セロトニンレセプター)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】5-HT様GPCR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】swiss|P28222|5H1B_ヒト5-ヒドロキシTRYPTアミン1Bレセプター(5-HT-1B)(セロトニンレセプター)(配列番号3)に対する414(配列番号2)のBLASTP-アライメントを示す。

【図6】pfam|hmm|7tm_17_transmembraneレセプター(ロドプシンファミリー)に対する414(配列番号2)のHMMFAM-アライメントを示す。

【図7】遺伝子スキャンの結果を示す。

【図8】推定アミノ酸およびヌクレオチド配列を示す。

【図9】SNP:1275729_867778に対する414(配列番号2)のBLASTN-アライメントを示す。

10

20

30

40

50

【図10】配列番号2の膜貫通領域を示す。

【図11】発現プロファイルを示す。

【図12】発現プロファイルを示す。

【図13】発現プロファイルを示す。

【図5A】

Fig. 5
BLASTP_swiss|P28222_5H1B_ヒト5ヒドロキシトリプタミン_1B レセプター (5-HT_{1B}) (セロトニン レセプター)に対する4~14のアライメント

(5-HT_{1D}-BETA)(S12)/trembl|AB041370_AB041370_1 gene: "HTR1B";
5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B のヒト HTR1B 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041377_AB041377_1 gene: "HTR1D";
5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1D のヒト HTR1D 遺伝子, 完全 cds./trembl|D10995_HSHGCR_1 gene: "HGCR1";

セロトニン_1B レセプターのヒト遺伝子完全 cds./trembl|IM751281HSHTR1E_1 gene: "HTR1D"; ヒトセロトニン_1Db レセプター (HTR1D) 遺伝子, 完全 cds./trembl|MS3180_HSHTRA_1 ヒトセロトニン_レセプター_遺伝子, 完全 cds./trembl|L09732_HSHTR1DA_1 ヒト5ヒドロキシトリプタミン_1D レセプター_遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041378_AB041378_1 gene: "HTR1B";

染色体6q13-14.3 上のクローン_501M33由来ヒトDNA配列以下を含む:HTR1B(5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B 遺伝子), STS, CA リビット, STS および CpG島/trembl|IM81590_HSSER1DRB_1 gene: "5-HT1D"; ヒトセロトニン_1D レセプター_遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041371_AB041371_1 gene: "HTR1B"; 5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B の Pan troglodytes HTR1B 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041378_AB041378_1 gene: "HTR1D";

AL049595_5629918 遺伝子, "HTR1B"; 染色体6q13-14.3 上のクローン_501M33由来ヒトDNA配列。以下を含む:HTR1B(5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B 遺伝子), ESTS, CA リビット, STS および CpG島, 完全な配列/trembl|ID0995_219679 遺伝子; TIGCR1"セロトニン_1B レセプターのヒト遺伝子, 完全 cds.

/trembl|IM75128_184460_ID レセプター (HTR1D) 遺伝子, 完全 cds.

/trembl|IM8180_1184464_遺伝子: "HTR1D"; ヒトセロトニン_レセプター_1D レセプター, ヒト5ヒドロキシトリプタミン_1D レセプター, ヒトセロトニン_1D レセプター, ヒトセロトニン_1D レセプター, ヒトセロトニン_1D レセプター (5-HT1D-) mRNA, 完全 cds.

【図5B】

Fig. 5(続き)
5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1D の Pan troglodytes HTR1B 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041370_17592929_遺伝子, "HTR1B"; 5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B のヒト HTR1B 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041371_17592931 gene: "HTR1B"; 5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B 的 Pan troglodytes HTR1D 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041371_17592944_遺伝子, "HTR1D"; 5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1D のヒト HTR1D 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041378_17592946_遺伝子, "HTR1D"; 5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1D の Pan troglodytes HTR1D 遺伝子, 完全 cds./trembl|AB041378_17592947_遺伝子, "HTR1D";

/trembl|AL049595_5629918_遺伝子, "HTR1B"; 染色体6q13-14.3 上のクローン_501M33由来ヒトDNA配列。以下を含む:HTR1B(5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター_1B 遺伝子), ESTS, CA リビット, STS および CpG島, 完全な配列/trembl|ID0995_219679 遺伝子; TIGCR1"セロトニン_1B レセプターのヒト遺伝子, 完全 cds.

/trembl|IM75128_184460_ID レセプター (HTR1D) 遺伝子, 完全 cds.

/trembl|IM8180_1184464_遺伝子: "HTR1D"; ヒトセロトニン_レセプター_1D レセプター, ヒト5ヒドロキシトリプタミン_1D レセプター, ヒトセロトニン_1D レセプター, ヒトセロトニン_1D レセプター, ヒトセロトニン_1D レセプター (5-HT1D-) mRNA, 完全 cds.

このヒットは以下のスコアリングである: 5e-12 (期待値)

アライメント長 (重複): 272

同 一性: 36 %

スコア: 137.0 マトリクス: BLOSUM62 (コンセンサスバーンの推測に使用)
サーチしたデータベース: nrdb_1_;

【 四 6 】

Fig. 6
—

【図7】

四百一

【図 8 A】

【 図 8 B 】

०

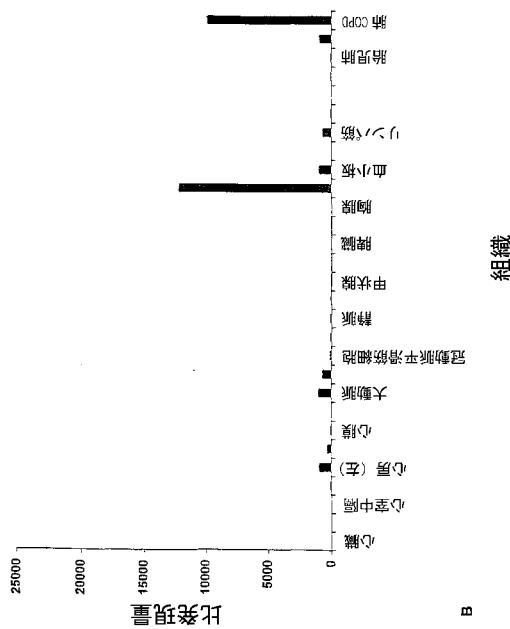
【図9】

Fig. 9
BLASTN - SNP:1275729_867778SNP:CVLIP-000621-1-21708 NR:2 >SNP:1942595_8677780
SNP:CVLIP-000894-412068 NR:2に対する414_DNAアライメント
>SNP:384138_867782 SNP:CVLIP-0C0925-720069 NR:2

このヒットは以下のスコアリングである： 7e-18 (期待値)
アライメント長（重複）： 51
同一性： 98 %
スコアリングマトリクス： blastn (コンセンサスペターンの推測に使用)
クエリー・リーディング・フレーム： +1
ヒット・リーディング・フレーム： -1
サーチしたデータベース： dbSNP_nrdb.fasta

Q: 924 catatgtctcccccgtggccatgtcccatacccatccatgttaccctgtccggctaccc
H: 51 CATTGCTTCCGTGCATGTC CATAACCGTACCTGCTCCGCTACCG
51 catatgtttccccccgtggccatgtcccatacccatccatgttaccctgtccggctaccc

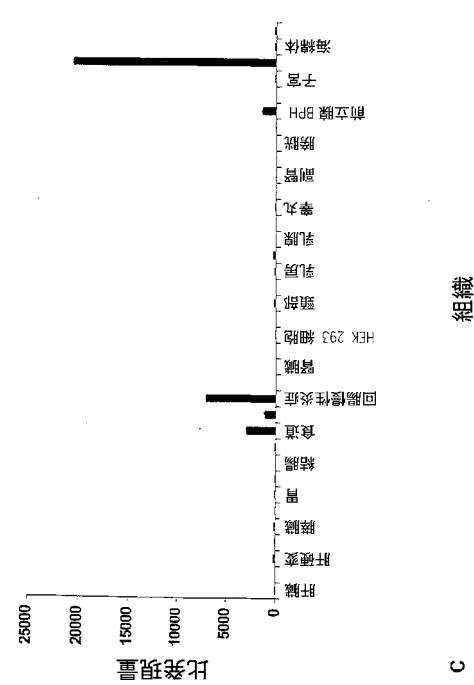
【図12】



【図11】



【図13】



【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

(10) International Publication Number
WO 02/059302 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/12, G01N 33/50, 33/68, A61K 31/711, 31/713, 38/12, 39/395

(21) International Application Number: PCT/EP02/00540

(22) International Filing Date: 21 January 2002 (21.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/264,071 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/324,054 24 September 2001 (24.09.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **SMOLYAR, Alex** [US/US]; 734 Boylston Street, Brookline, MA 02467 (US).(74) Common Representative: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, 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, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SJ, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG)

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(iii)) for the following designations: AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, 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, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SJ, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG)
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

**WO 02/059302 A2**

(54) Title: REGULATION OF HUMAN SEROTONIN-LIKE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR

(57) Abstract: Reagents which regulate human serotonin-like G protein-coupled receptor (5-HT-like GPCR) and reagents which bind to human 5-HT-like GPCR gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, COPD, cardiovascular disorders, cancer, urinary disorders, obesity, diabetes, CNS disorders, asthma, and hematological disorders.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

**REGULATION OF HUMAN SEROTONIN-LIKE
G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR**

This application claims the benefit of and incorporates by reference co-pending
5 provisional application Serial No. 60/264,071 filed January 26, 2001 and Serial No.
60/324,054 filed September 24, 2001.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

10 The invention relates to the area of G-protein coupled receptors. More particularly, it
relates to the area of human serotonin-like G protein-coupled receptor and its
regulation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 *G-Protein Coupled Receptors*

Many medically significant biological processes are mediated by signal transduction
pathways that involve G-proteins (Lefkowitz, *Nature* 351, 353-354, 1991). The
20 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 dopamine, calcitonin, adrenergic hormones,
endothelin, cAMP, adenosine, acetylcholine, serotonin, histamine, thrombin, kinin,
follicle stimulating hormone, opsins, endothelial differentiation gene-1, rhodopsins,
25 odorants, cytomegalovirus, G-proteins themselves, effector proteins such as
phospholipase C, adenyl cyclase, and phosphodiesterase, and actuator proteins such
as protein kinase A and protein kinase C.

30 GPCRs possess seven conserved membrane-spanning domains connecting at least
eight divergent hydrophilic loops. GPCRs (also known as 7TM receptors) have been

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 2 -

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 5 structure. The seven transmembrane regions are designated as TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, and TM7. TM3 has been implicated in signal transduction.

Phosphorylation and lipidation (palmitylation or farnesylation) of cysteine residues can influence signal transduction of some GPCRs. Most GPCRs contain potential 10 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.

For some receptors, the ligand binding sites of GPCRs are believed to comprise 15 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 having a ligand binding site, such as the TM3 aspartate residue. TM5 serines, a TM6 20 asparagine, and TM6 or TM7 phenylalanines or tyrosines also are implicated in ligand binding.

GPCRs are coupled inside the cell by heterotrimeric G-proteins to various intracellular enzymes, ion channels, and transporters (*see Johnson et al., Endoc. Rev.* 25 *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 30 cyclase. Enzyme activation by hormones is dependent on the presence of the

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 3 -

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 dual role, as an intermediate that relays the signal from receptor to effector, and as a clock that controls the duration of the signal.

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 ongoing 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, 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 syndrome.

Serotonin

Serotonin is a neuromodulator capable of inducing and modulating a wide variety of behavioral functions such as sleep, appetite, locomotion, sexual activity and vascular contraction. Since the discovery of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) over four decades ago, the cumulative results of many diverse studies have indicated that serotonin plays a significant role in the functioning of the mammalian body, both in the central nervous system and in peripheral systems. Morphological studies of the

central nervous system have shown that serotonergic neurons, which originate in the brain stem, form a very diffuse system that projects to most areas of the brain and spinal cord (O'Brien, Serotonin in Mental Abnormalities 1:41, 1978; Steinbusch, "Handbook of Chemical Neuroanatomy", Volume 3, Part II, 68, 1984; Anden *et al.*, 5 *Acta Physiologica Scandinavia* 67, 313, 1966). These studies have been complemented by biochemical evidence that indicates large concentrations of 5-HT exists in the brain and spinal cord (Steinbusch, 1984). See U.S. Patent 5,698,444.

With such a diffuse system, it is not surprising that 5-HT has been implicated as 10 being involved in the expression of a number of behaviors, physiological responses, and diseases which originate in the central nervous system. These include such diverse areas as sleeping, eating, perceiving pain, controlling body temperature, controlling blood pressure, depression, schizophrenia, and other bodily states (Fuller, Biology of Serotonergic Transmission 21, 1982; Boullin, Serotonin in Mental 15 Abnormalities 1, 316, 1978; Barchas *et al.*, SEROTONIN AND BEHAVIOR, 1973).

Serotonin plays an important role in peripheral systems as well. For example, approximately 90% of the body's serotonin is found in the gastrointestinal system, and serotonin has been found to mediate a variety of contractile, secretory, and 20 electrophysiologic effects in this system. Another example of a peripheral network that is very sensitive to serotonin is the cardiovascular system, which also contains its own source of serotonin, *i.e.*, the platelet.

Given the broad distribution of serotonin within the body, it is understandable that 25 tremendous interest in drugs that affect serotonergic systems exists. In particular, receptor-specific agonists and antagonists are of interest for the treatment of a wide range of disorders, including anxiety, depression, hypertension, migraine, compulsive disorders, schizophrenia, autism, neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinsonism, and Huntington's chorea, and cancer 30 chemotherapy-induced vomiting (Gershon *et al.*, The Peripheral Actions of 5-

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 5 -

Hydroxytryptamine 246, 1989; Saxena *et al.*, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 15, Supplement 7, 990).

Serotonin Receptors

5

Serotonin produces its effects on cellular physiology by binding to specialized receptors on the cell surface. It is now recognized that multiple types of receptors exist for all neurotransmitters and hormones, including serotonin. The existence of multiple, structurally distinct serotonin receptors has provided the possibility that subtype-selective pharmacologic agents can be produced. The development of such compounds could result in new and increasingly selective therapeutic agents with fewer side effects, since individual receptor subtypes may function to affect specific actions of the different parts of the central peripheral serotonergic systems.

10

An example of such specificity can be demonstrated by using the vascular system as an example. In certain blood vessels, stimulation of 5-HT₁-like receptors on the endothelial cells produces vasodilation while stimulation of 5-HT₂ receptors on the smooth muscle cells produces vasoconstriction. Currently, the major classes of serotonin receptors (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, and 5-HT₇) contain some fourteen to eighteen separate receptors that have been formally classified based on their pharmacological or structural differences (see Glennon *et al.*, *Neuroscience and Behavioral Reviews* 14, 35, 1990).

15

The 5-HT receptors which have been described to date belong either to the family of receptors associated with ion channels (5-HT₃ receptors), or to the family of receptors which interact with G proteins and which possess seven transmembrane domains. Moreover, analysis of the amino acid sequences has shown that the 5-HT receptors which interact with G proteins may be subdivided into two distinct groups: 5-HT₁ receptors, comprising the mammalian subtypes 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{1D}, as well as three *Drosophila* 5-HT receptors, and 5-HT₂ receptors comprising the subtypes 5-

20

25

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 6 -

HT₂ and 5-HT_{1C}. Pharmacological studies have revealed other subtypes, such as 5-HT₄ receptors, as well as some receptors related to the subtype 5-HT₁ ("5-HT1-like" receptors). Furthermore, additional molecular biology studies have also revealed heterogeneities within the subtypes 5-HT_{1B/1D}.

5

The 5-HT₂ receptors act via phospholipase C, and are responsible for numerous physiological activities of serotonin at the central and peripheral level. At the cardiovascular level, they are involved in the contraction of the blood vessels and in the morphological changes of the platelets; in the central nervous system, they act on the sensitization of the neurons to tactile stimuli and on the mediation of the hallucinogenic effects of diethylamidelysergic acid, and of the related phenylisopropylamines. Numerous studies show that the 5-HT₂ receptors described up until now do not account for all the properties which are attributed to them. In particular, certain 5-HT₂-types effects of serotonin on the peripheral smooth muscles are classified as atypical effects, of which the effects are thought to be mediated by unknown receptors. *See U.S. Patent 5,780,245.*

Because of serotonin's diverse biological effects, there is a need in the art to identify additional members of the serotonin GPCR family whose activity 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 serotonin-like G protein-coupled receptor 1 protein. 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 serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 7 -

amino acid sequences which are at least about 27% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

- 5 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

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 serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 27% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

- 15 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

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

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 serotonin-like G protein-coupled 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; and

- 25

- 30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 8 -

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

5 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 serotonin-like G protein-coupled receptor through interacting with the serotonin-like G protein-coupled receptor mRNA.

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

15 amino acid sequences which are at least about 27% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

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

20 A serotonin-like G protein-coupled receptor activity of the polypeptide is detected. A test compound which increases serotonin-like G protein-coupled receptor activity of the polypeptide relative to serotonin-like G protein-coupled 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 serotonin-like G 25 protein-coupled receptor activity of the polypeptide relative to serotonin-like G protein-coupled receptor activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

30 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

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 9 -

serotonin-like G protein-coupled receptor product of a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

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

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

10 Binding of the test compound to the serotonin-like G protein-coupled receptor product is detected. A test compound which binds to the serotonin-like G protein-coupled receptor product is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

15 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 serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide or the product encoded by the polynucleotide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

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

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

25 Serotonin-like G protein-coupled receptor activity in the cell is thereby decreased.

The invention thus provides a human serotonin-like G protein-coupled receptor which can be used to identify test compounds which may act as agonists or antagonists at the receptor site. Human serotonin-like G protein-coupled receptor

and fragments thereof also are useful in raising specific antibodies which can block the receptor and effectively prevent ligand binding.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- 5 Fig. 1 shows the DNA-sequence encoding a serotonin-like G protein-coupled receptor Polypeptide (SEQ ID NO:1).
- Fig. 2 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.1 (SEQ ID NO:2).
- 10 Fig. 3 shows the amino acid sequence of the protein identified by SwissProt Accession No. P28222|5H1B_HUMAB5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B) (SEROTONIN RECEPTOR) (SEQ ID NO:3).
- Fig. 4 shows the DNA-sequence encoding a serotonin-like G protein-coupled receptor Polypeptide (SEQ ID NO:4).
- 15 Fig. 5 shows the BLASTP - alignment of 414 (SEQ ID NO:2) against swiss|P28222|5H1B_HUMAN5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B) (SEROTONIN RECEPTOR) (SEQ ID NO:3).
- Fig. 6 shows the HHMPFAM - alignment of 414 (SEQ ID NO:2) against pfam|hrmm|7tm_17 transmembrane receptor (rhodopsin family).
- 20 Fig. 7 shows the Genescan results.
- Fig. 8 shows the Predicted amino acid and nucleotide sequences.
- Fig. 9 shows the BLASTN - alignment of 414_DNA against SNP:1275729_867778.
- Fig. 10 shows the Transmembrane regions of SEQ ID NO:2.
- 25 Fig. 11 shows the Expression profiles.
- Fig. 12 shows the Expression profiles.
- Fig. 13 shows the Expression profiles

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention relates to an isolated polynucleotide being selected from the group consisting of:

- 5 a) a polynucleotide encoding a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 amino acid sequences which are at least about 27% identical to
 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and
10 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.
- 10 b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
- 15 c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b) and encodes a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide;
- 15 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 encodes a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide; and
20 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d) and encodes a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide.

Furthermore, it has been discovered by the present applicant that a novel 5-HT-like GPCR, particularly a human 5-HT-like GPCR, can be used in therapeutic methods to treat COPD, cardiovascular disorders, cancer, urinary disorders, obesity, diabetes, CNS disorders, asthma, or hematological disorders. Human 5-HT-like GPCR comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. A coding sequence for human 5-HT-like GPCR is shown in SEQ ID NO:1. This sequence is contained within the longer sequence shown in SEQ ID NO:4. This sequence is located on chromosome 2 and was assembled from the genomic sequence of Accession No.
25
30 AC060810 using Genescan or Geneid.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 12 -

Human 5-HT-like GPCR is 26% identical over 272 amino acids to swiss|P28222|5H1B_HUMAN5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B) (SEROTONIN RECEPTOR) (SEQ ID NO:3) (Fig. 5). Pfam detected seven 5 transmembrane motifs, which are shown in Fig. 10.

Human 5-HT-like GPCR of the invention is expected to be useful for the same purposes as previously identified serotonin receptors. Human 5-HT-like GPCR is believed to be useful in therapeutic methods to treat disorders such as COPD, 10 cardiovascular disorders, cancer, urinary disorders, obesity, diabetes, CNS disorders, asthma, and hematological disorders. Human 5-HT-like GPCR also can be used to screen for human 5-HT-like GPCR activators and inhibitors.

5-HT-like GPCR Polypeptides

15 5-HT-like GPCR polypeptides according to the invention comprise at least 6, 8 10, 12, 15, 18, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, or 347 contiguous amino acids selected from SEQ ID NO:2 or from a biologically active variant thereof, as defined below. A 5-HT-like GPCR polypeptide of the invention therefore can be a portion of a 5-HT-like GPCR protein, a full-length 5-HT-like 20 GPCR protein, or a fusion protein comprising all or a portion of a 5-HT-like GPCR protein. A coding sequence for SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:1.

Biologically Active Variants

25 5-HT-like GPCR polypeptide variants which are biologically active, *i.e.*, retain the ability to bind a serotonin or a serotonin-like ligand to produce a biological effect, such as cyclic AMP formation, mobilization of intracellular calcium, or phosphoinositide metabolism, also are 5-HT-like GPCR polypeptides. Preferably, naturally 30 or non-naturally occurring 5-HT-like GPCR polypeptide variants have amino acid

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 13 -

sequences which are at least about 27, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or a fragment thereof. Percent identity between a putative 5-HT-like GPCR polypeptide variant and an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is 5 determined by conventional methods. See, for example, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986), and 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 10 the art appreciate that there are many established algorithms available to align two amino acid sequences. The "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. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988), and by Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 15 (1990). Briefly, FASTA first characterizes sequence similarity by identifying regions shared by the query sequence (e.g. SEQ ID NO:2) 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 20 deletions. The ten regions with the highest density of identities are then rescored by comparing the 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 25 the sequence and the ktup value), then the trimmed initial regions are examined to determine whether the regions can be joined to form an approximate alignment with gaps. Finally, the 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 30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 14 -

parameters for FASTA analysis are: ktup=1, gap opening penalty=10, gap extension penalty=1, and substitution matrix=BLOSUM62. These parameters can be introduced into a FASTA program by modifying the scoring matrix file ("SMATRIX"), as explained in Appendix 2 of Pearson, Meth. Enzymol. 183:63
5 (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 to six, preferably from three to six, most preferably three, with other parameters set as default..

10 Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, 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
15 glutamate, or a threonine with a serine.

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
20 which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity of a 5-HT-like GPCR polypeptide can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software. Whether an amino acid change results in a biologically active 5-HT-like GPCR polypeptide can readily be determined by assaying for binding to a ligand or by conducting a functional assay, as described for example, in the specific Examples,
25 below.

Fusion Proteins

30 Fusion proteins are useful for generating antibodies against 5-HT-like GPCR polypeptide amino acid sequences and for use in various assay systems. For

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 15 -

example, fusion proteins can be used to identify proteins which interact with portions of a 5-HT-like GPCR 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 5 also can be used as drug screens.

A 5-HT-like GPCR polypeptide fusion protein comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at 6, 8 10, 12, 15, 18, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 10 325, or 347 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2 or from a biologically active variant, such as those described above. The first polypeptide segment also can comprise full-length 5-HT-like GPCR protein.

The second polypeptide segment can be a full-length protein or a protein fragment. 15 Proteins commonly used in fusion protein construction include β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), autofluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horseradish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including 20 histidine (His) 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 fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between 25 the 5-HT-like GPCR polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the 5-HT-like GPCR polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a 30 fusion protein is produced by covalently linking two polypeptide segments or by

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 16 -

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 SEQ ID NO:1 in proper reading frame with nucleotides encoding the second polypeptide segment and expressing the 5 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 Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-10 KITS).

Identification of Species Homologs

Species homologs of human 5-HT-like GPCR polypeptide can be obtained using 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide, and expressing the cDNAs as is known in the art.

5-HT-like GPCR Polynucleotides

A 5-HT-like GPCR polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for a 5-HT-like GPCR polypeptide. A coding sequences for human 5-HT-like GPCR is shown in SEQ ID NO:3.

Degenerate nucleotide sequences encoding human 5-HT-like GPCR polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 also are 5-HT-like GPCR polynucleotides. Percent sequence identity between the 25 30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 17 -

sequences of two 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 5-HT-like GPCR polynucleotides which encode biologically active 5-HT-like GPCR polypeptides also are 5-HT-like GPCR polynucleotides. Polynucleotides comprising at least 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, or 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or its complement also are 5-HT-like GPCR polynucleotides. Such polynucleotides can be used, for example, as hybridization probes or antisense oligonucleotides.

10

Identification of Variants and Homologs of 5-HT-like GPCR Polynucleotides

Variants and homologs of the 5-HT-like GPCR polynucleotides described above also are 5-HT-like GPCR polynucleotides. Typically, homologous 5-HT-like GPCR polynucleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known 5-HT-like GPCR 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 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.

25

Species homologs of the 5-HT-like GPCR polynucleotides disclosed herein 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 5-HT-like GPCR 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 (Bonner *et al.*, *J. Mol.*

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 18 -

- Biol.* 81, 123 (1973). Variants of human 5-HT-like GPCR polynucleotides or 5-HT-like GPCR polynucleotides of other species can therefore be identified by hybridizing a putative homologous 5-HT-like GPCR polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ 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 5-HT-like GPCR polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.
- 10 Nucleotide sequences which hybridize to 5-HT-like GPCR polynucleotides or their complements following stringent hybridization and/or wash conditions also are 5-HT-like GPCR 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.
- 15 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 5-HT-like GPCR polynucleotide having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3 or the complement thereof and a polynucleotide sequence which is at least 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):
- 25 $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l$,
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.

Preparation of 5-HT-like GPCR Polynucleotides

A naturally occurring 5-HT-like GPCR polynucleotide can be isolated free of other 5 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 10 for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated 5-HT-like GPCR polynucleotides. For example, restriction enzymes and probes can be used to isolate polynucleotide fragments which comprises 5-HT-like GPCR nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations which are free or at least 70, 80, or 90% 15 free of other molecules.

15 5-HT-like GPCR cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using 5-HT-like GPCR mRNA as a template. 5-HT-like GPCR 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 20 technique, such as PCR, can be used to obtain additional copies of polynucleotides of the invention, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

25 Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize 5-HT-like GPCR polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode a 5-HT-like GPCR polypeptide having, for example, an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or a biologically active variant thereof.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 20 -

Extending 5-HT-like GPCR Polynucleotides

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 Applic.* 2, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a 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.

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 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68-72 °C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

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 enzyme 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.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 21 -

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 5 to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

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 10 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.

Commercially available capillary electrophoresis systems can be used to analyze the 15 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 20 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.

25

Obtaining 5-HT-like GPCR Polypeptides

5-HT-like GPCR polypeptides can be obtained, for example, by purification from 30 human cells, by expression of 5-HT-like GPCR polynucleotides, or by direct chemical synthesis.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 22 -

Protein Purification

5-HT-like GPCR polypeptides can be purified from any human cell which expresses
5 the receptor, including host cells which have been transfected with 5-HT-like GPCR
polynucleotides. A purified 5-HT-like GPCR polypeptide is separated from other
compounds which normally associate with the 5-HT-like GPCR 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,
10 ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, affinity chromatog-
raphy, and preparative gel electrophoresis.

5-HT-like GPCR polypeptide can be conveniently isolated as a complex with its
associated G protein, as described in the specific examples, below. A preparation of
15 purified 5-HT-like GPCR polypeptides is at least 80% pure; preferably, the
preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the preparations can be assessed
by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Expression of 5-HT-like GPCR Polynucleotides

20 To express a 5-HT-like GPCR polypeptide, a 5-HT-like GPCR 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
25 containing sequences encoding 5-HT-like GPCR polypeptides and appropriate
transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* re-
combinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination.
Such techniques are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989) and in
Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons,
30 New York, N.Y., 1989.

A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding a 5-HT-like GPCR 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 (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.

10

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 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., 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 5-HT-like GPCR polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 24 -

Bacterial and Yeast Expression Systems

- In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the 5-HT-like GPCR polypeptide. For example, when a large quantity of a 5-HT-like GPCR 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, multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene). In a BLUESCRIPT vector, a sequence encoding the 5-HT-like GPCR polypeptide can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal 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 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.
- 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.
- If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding 5-HT-like GPCR polypeptides can be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in

Plant and Insect Expression Systems

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 25 -

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 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 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptides can be expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

15

20

Mammalian Expression Systems

25

A number of viral-based expression systems can be used to express 5-HT-like GPCR polypeptides in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding 5-HT-like GPCR 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 30 viral genome can be used to obtain a viable virus which is capable of expressing a 5-

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 26 -

HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptides. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding a 5-HT-like GPCR 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 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 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).

15

Host Cells

20

A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed 5-HT-like GPCR polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 27 -

acylation. Post-translational processing which cleaves a "pro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and 5 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.

Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant 10 proteins. For example, cell lines which stably express 5-HT-like GPCR 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 15 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 5-HT-like GPCR 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.

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

These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase 25 (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 *aprt*⁻ cells, respectively. Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dfr*^r confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *npt* confers resistance to the 30 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 phosphinotricin

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 28 -

5 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 (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 (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

10 Detecting Expression of 5-HT-like GPCR Polypeptides

15 Although the presence of marker gene expression suggests that the 5-HT-like GPCR polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding a 5-HT-like GPCR polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences which encode a 5-HT-like GPCR polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding a 5-HT-like GPCR polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates 20 expression of the 5-HT-like GPCR polynucleotide.

25 Alternatively, host cells which contain a 5-HT-like GPCR polynucleotide and which express a 5-HT-like GPCR 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 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 5-HT-like GPCR polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or 30 fragments or fragments of polynucleotides encoding a 5-HT-like GPCR polypeptide.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 29 -

Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides selected from sequences encoding a 5-HT-like GPCR polypeptide to detect transformants which contain a 5-HT-like GPCR polynucleotide.

- 5 A variety of protocols for detecting and measuring the expression of a 5-HT-like GPCR polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent 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 5-HT-like GPCR 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).
- 10 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 polynucleotides encoding 5-HT-like GPCR polypeptides include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, sequences encoding a 5-HT-like GPCR polypeptide 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, 20 25 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, enzymes, and fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 30 -

Expression and Purification of 5-HT-like GPCR Polypeptides

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptides can be designed to contain signal sequences which direct secretion of soluble 5-HT-like GPCR polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane or which direct the membrane insertion of membrane-bound 5-HT-like GPCR polypeptide.

As discussed above, other constructions can be used to join a sequence encoding a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide also can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide can be synthesized, in whole or 5 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 5-HT-like GPCR 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 10 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 5-HT-like GPCR polypeptides can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule. 15

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 20 composition of a synthetic 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant 25 polypeptide or a fusion protein.

Production of Altered 5-HT-like GPCR Polypeptides

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce 30 5-HT-like GPCR polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-natural-

ly 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 5-HT-like GPCR 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

15 *Antibodies*

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR 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

25 An antibody which specifically binds to an epitope of a 5-HT-like GPCR 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

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 33 -

protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well 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 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptides do not detect 10 other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a 5-HT-like GPCR polypeptide from solution.

5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide can be conjugated to a 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. 20 lyssolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

Monoclonal antibodies which specifically bind to a 5-HT-like GPCR polypeptide can 25 be prepared using any technique which provides for the production of 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, 30 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.*,
5 *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
10 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,
15 humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in
GB2188638B. Antibodies which specifically bind to a 5-HT-like GPCR 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
20 be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which
specifically bind to 5-HT-like GPCR 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).

25 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
30 antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15,

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 35 -

159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in
Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using
5 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 pro-
duced 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-
10 91).

Antibodies which specifically bind to 5-HT-like GPCR polypeptides also can be
produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by
15 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).

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
20 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.

25 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 5-HT-like GPCR polypeptide is bound. The bound antibodies can then be
eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary 5 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 10 cell as described above to decrease the level of 5-HT-like GPCR gene products in the cell.

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- 15 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.

Modifications of 5-HT-like GPCR gene expression can be obtained by designing 25 antisense oligonucleotides which will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the 5-HT-like GPCR 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 30 of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have been described

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 37 -

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.

5

Precise complementarity is not required for successful complex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of a 5-HT-like GPCR polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to a 5-HT-like GPCR polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent 5-HT-like GPCR nucleotides, can provide sufficient targeting specificity for 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polynucleotide sequence.

20

Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to a 5-HT-like GPCR polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, internucleoside phosphate linkages can be modified by adding cholesterol 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.*,

25

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 38 -

Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

Ribozymes

5

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

10

15

The coding sequence of a 5-HT-like GPCR polynucleotide, such as the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3, can be used to generate ribozymes which will specifically bind to mRNA transcribed from the 5-HT-like GPCR polynucleotide.

20

25

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).

30

Specific ribozyme cleavage sites within a 5-HT-like GPCR 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

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 39 -

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 5-HT-like GPCR RNA targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. The nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3 and its complement provide a source of suitable hybridization region sequences. 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 through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

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 5-HT-like GPCR 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 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.

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.

Differentially Expressed Genes

- Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human 5-HT-like GPCR. Such genes may represent genes that are differentially expressed in disorders including, but not limited to, COPD, cardiovascular disorders, cancer, urinary disorders, obesity, diabetes, CNS disorders, asthma, and hematological disorders. Further, such genes may represent genes that 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 or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the human 5-HT-like GPCR 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 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.

20 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. Any RNA isolation technique that 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

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

~ 41 ~

techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, the single-step RNA isolation process of Chomczynski, U.S. Patent 4,843,155.

Transcripts within the collected RNA samples that represent RNA produced by
5 differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill
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
differential display (Liang & Pardue, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent
10 5,262,311), and microarrays.

The differential expression information may itself suggest relevant methods for the
treatment of disorders involving the human 5-HT-like GPCR. For example,
treatment may include a modulation of expression of the differentially expressed
15 genes and/or the gene encoding the human 5-HT-like GPCR. The differential ex-
pression information may indicate whether the expression or activity of the
differentially expressed gene or gene product or the human 5-HT-like GPCR gene or
gene product are up-regulated or down-regulated.

20 Screening Methods

The invention provides assays for screening test compounds which bind to or
modulate the activity of a 5-HT-like GPCR polypeptide or a 5-HT-like GPCR poly-
nucleotide. A test compound preferably binds to a 5-HT-like GPCR polypeptide or
25 polynucleotide. More preferably, a test compound decreases or increases the effect
of serotonin or a serotonin analog as mediated via human 5-HT-like GPCR by at
least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to
the absence of the test compound.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 42 -

Test Compounds

Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be compounds previously unknown to have any pharmacological activity. The 5 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 10 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 15 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 20 (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).

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 43 -

High Throughput Screening

Test compounds can be screened for the ability to bind to 5-HT-like GPCR polypeptides or polynucleotides or to affect 5-HT-like GPCR activity or 5-HT-like GPCR gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested in parallel so that 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 µl. In addition to the plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

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 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.

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 enzyme assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the enzyme in the gel would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the com-

pounds were partially released by UV-light. Compounds that inhibited the enzyme were observed as local zones of inhibition having less color change.

Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63
5 (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
5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more
10 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.

15 Binding Assays

For binding assays, the test compound is preferably a small molecule which binds to
and occupies the active site of the 5-HT-like GPCR polypeptide, thereby making the
ligand binding site inaccessible to substrate such that normal biological activity is
20 prevented. Examples of such small molecules include, but are not limited to, small
peptides or peptide-like molecules. Potential ligands which bind to a polypeptide of
the invention include, but are not limited to, the natural ligands of known 5-HT-like
GPCRs and analogues or derivatives thereof.

25 In binding assays, either the test compound or the 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR
polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radio-

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 45 -

emmission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

Alternatively, binding of a test compound to a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide. A microphysiometer (*e.g.*, CytosensorTM) 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 5-HT-like GPCR polypeptide (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

Determining the ability of a test compound to bind to a 5-HT-like GPCR 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 of the interactants (*e.g.*, BIAcoreTM). Changes in the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

In yet another aspect of the invention, a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide and modulate its activity.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 46 -

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 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide.

It may be desirable to immobilize either the 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent linkages, passive absorption, or pairs of 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 5-HT-like GPCR 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.

- 5 In one embodiment, the 5-HT-like GPCR polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the 5-HT-like GPCR 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
10 test compound and the non-adsorbed 5-HT-like GPCR 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.
15 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 5-HT-like
20 GPCR polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 5-HT-like GPCR 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
25 streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to a 5-HT-like GPCR polypeptide, polynucleotide, or a test compound, but which do not interfere with a desired binding site, such as the active site of the 5-HT-like GPCR polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

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 5-HT-like GPCR polypeptide or test compound, enzyme-linked assays which rely on detecting an activity of the 5-HT-like GPCR polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

Screening for test compounds which bind to a 5-HT-like GPCR polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises a 5-HT-like GPCR polypeptide or polynucleotide can be used in a cell-based assay system. A 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR polypeptide or polynucleotide is determined as described above.

15 Functional Assays

Test compounds can be tested for the ability to increase or decrease a biological effect of a 5-HT-like GPCR polypeptide. Such biological effects can be determined using the functional assays described in the specific examples, below. Functional assays can be carried out after contacting either a purified 5-HT-like GPCR polypeptide, a cell membrane preparation, or an intact cell with a test compound. A test compound which decreases a functional activity of a 5-HT-like GPCR by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential agent for decreasing 5-HT-like GPCR activity. A test compound which increases 5-HT-like GPCR activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential agent for increasing 5-HT-like GPCR activity.

One such screening procedure involves the use of melanophores which are transfected to express a 5-HT-like GPCR polypeptide. Such a screening technique is

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 49 -

described in WO 92/01810 published Feb. 6, 1992. Thus, for example, such an assay may be employed for screening for a compound which inhibits activation of the receptor polypeptide by contacting the melanophore cells which comprise the receptor with both the receptor ligand (*e.g.*, serotonin or a serotonin analog) and a test compound to be screened. Inhibition of the signal generated by the ligand indicates that a test compound is a potential antagonist for the receptor, *i.e.*, inhibits activation of the receptor. The screen may be employed for identifying a test compound which activates the receptor by contacting such cells with compounds to be screened and determining whether each test compound generates a signal, *i.e.*, activates the receptor.

Other screening techniques include the use of cells which express a human 5-HT-like GPCR polypeptide (for example, transfected CHO cells) in a system which measures extracellular pH changes caused by receptor activation (*see, e.g., Science 246*, 181-296, 1989). For example, test compounds may be contacted with a cell which expresses a human 5-HT-like GPCR polypeptide and a second messenger response, *e.g.*, signal transduction or pH changes, can be measured to determine whether the test compound activates or inhibits the receptor.

Another such screening technique involves introducing RNA encoding a human 5-HT-like GPCR polypeptide into *Xenopus* oocytes to transiently express the receptor. The transfected oocytes can then be contacted with the receptor ligand and a test compound to be screened, followed by detection of inhibition or activation of a calcium signal in the case of screening for test compounds which are thought to inhibit activation of the receptor.

Another screening technique involves expressing a human 5-HT-like GPCR polypeptide in cells in which the receptor is linked to a phospholipase C or D. Such cells include endothelial cells, smooth muscle cells, embryonic kidney cells, etc. The

screening may be accomplished as described above by quantifying the degree of activation of the receptor from changes in the phospholipase activity.

Details of functional assays such as those described above are provided in the 5 specific examples, below.

5-HT-like GPCR Gene Expression

In another embodiment, test compounds which increase or decrease 5-HT-like GPCR 10 gene expression are identified. A 5-HT-like GPCR polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the 5-HT-like GPCR 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 15 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 20 compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of the mRNA or polypeptide expression.

The level of 5-HT-like GPCR mRNA or polypeptide expression in the cells can be 25 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 5-HT-like GPCR 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*

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 51 -

translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into a 5-HT-like GPCR polypeptide.

Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell which expresses a 5-HT-like GPCR polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The 5-HT-like GPCR polymucleotide 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.

10

Pharmaceutical Compositions

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 5-HT-like GPCR polypeptide, 5-HT-like GPCR polynucleotide, antibodies which specifically bind to a 5-HT-like GPCR polypeptide, or mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of a 5-HT-like GPCR 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.

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, intrathecal, intraventricular, transdermal,

25

30

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 5 formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and 10 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 15 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 20 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.

25 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 30 stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 53 -

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
5 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, suspensions of the active compounds can be prepared as appropriate
10 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
15 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.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in
20 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
25 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.

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

10 GPCRs are ubiquitous in the mammalian host and are responsible for many biological functions, including many pathologies. Accordingly, it is desirable to find compounds and drugs which stimulate a GPCR on the one hand and which can inhibit the function of a GPCR on the other hand. For example, compounds which activate a GPCR may be employed for therapeutic purposes, such as the treatment of asthma, Parkinson's disease, acute heart failure, urinary retention, and osteoporosis.

15 In particular, compounds which activate GPCRs are useful in treating various cardiovascular ailments such as caused by the lack of pulmonary blood flow or hypertension. In addition these compounds may also be used in treating various physiological disorders relating to abnormal control of fluid and electrolyte

20 homeostasis and in diseases associated with abnormal angiotensin-induced aldosterone secretion.

In general, compounds which inhibit activation of a GPCR can be used for a variety of therapeutic purposes, for example, for the treatment of hypotension and/or hypertension, angina pectoris, myocardial infarction, ulcers, asthma, allergies, benign prostatic hypertrophy, and psychotic and neurological disorders including schizophrenia, manic excitement, depression, delirium, dementia or severe mental retardation, dyskinesias, such as Huntington's disease or Touret's syndrome, among others. Compounds which inhibit GPCRs also are useful in reversing endogenous

25 anorexia, in the control of bulimia, and in treating various cardiovascular ailments

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 55 -

such as caused by excessive pulmonary blood flow or hypotension. In particular, regulation of 5-HT-like GPCR can be used to treat anxiety, depression, hypertension, migraine, compulsive disorders, schizophrenia, autism, neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinsonism, and Huntington's chorea, and cancer 5 chemotherapy-induced vomiting, as well as sleep and eating disorders, pain control, disorders involving regulation of body temperature and blood pressure.

Diabetes

10 Human 5-HT-like GPCR can be regulated to treat diabetes. Diabetes mellitus is a common metabolic disorder characterized by an abnormal elevation in blood glucose, alterations in lipids and abnormalities (complications) in the cardiovascular system, eye, kidney and nervous system. Diabetes is divided into two separate diseases: type 1 diabetes (juvenile onset), which results from a loss of cells which make and secrete insulin, and type 2 diabetes (adult onset), which is caused by a defect in insulin secretion and a defect in insulin action.

15 Type 1 diabetes is initiated by an autoimmune reaction that attacks the insulin secreting cells (beta cells) in the pancreatic islets. Agents that prevent this reaction 20 from occurring or that stop the reaction before destruction of the beta cells has been accomplished are potential therapies for this disease. Other agents that induce beta cell proliferation and regeneration also are potential therapies.

25 Type II diabetes is the most common of the two diabetic conditions (6% of the population). The defect in insulin secretion is an important cause of the diabetic condition and results from an inability of the beta cell to properly detect and respond to rises in blood glucose levels with insulin release. Therapies that increase the response by the beta cell to glucose would offer an important new treatment for this disease.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 56 -

The defect in insulin action in Type II diabetic subjects is another target for therapeutic intervention. Agents that increase the activity of the insulin receptor in muscle, liver, and fat will cause a decrease in blood glucose and a normalization of plasma lipids. The receptor activity can be increased by agents that directly stimulate 5 the receptor or that increase the intracellular signals from the receptor. Other therapies can directly activate the cellular end process, *i.e.* glucose transport or various enzyme systems, to generate an insulin-like effect and therefore produce beneficial outcome. Because overweight subjects have a greater susceptibility to Type II diabetes, any agent that reduces body weight is a possible therapy.

10

Both Type I and Type diabetes can be treated with agents that mimic insulin action or that treat diabetic complications by reducing blood glucose levels. Likewise, agents that reduce new blood vessel growth can be used to treat the eye complications that develop in both diseases.

15

Obesity

Obesity and overweight are defined as an excess of body fat relative to lean body mass. An increase in caloric intake or a decrease in energy expenditure or both can 20 bring about this imbalance leading to surplus energy being stored as fat. Obesity is associated with important medical morbidities and an increase in mortality. The causes of obesity are poorly understood and may be due to genetic factors, environmental factors or a combination of the two to cause a positive energy balance. In contrast, anorexia and cachexia are characterized by an imbalance in energy intake 25 versus energy expenditure leading to a negative energy balance and weight loss. Agents that either increase energy expenditure and/or decrease energy intake, absorption or storage would be useful for treating obesity, overweight, and associated comorbidities. Agents that either increase energy intake and/or decrease energy expenditure or increase the amount of lean tissue would be useful for treating 30 cachexia, anorexia and wasting disorders.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 57 -

This gene, translated proteins and agents which modulate this gene or portions of the gene or its products are useful for treating obesity, overweight, anorexia, cachexia, wasting disorders, appetite suppression, appetite enhancement, increases or decreases 5 in satiety, modulation of body weight, and/or other eating disorders such as bulimia. Also this gene, translated proteins and agents which modulate this gene or portions of the gene or its products are useful for treating obesity/overweight-associated comorbidities including hypertension, type 2 diabetes, coronary artery disease, hyperlipidemia, stroke, gallbladder disease, gout, osteoarthritis, sleep apnea and 10 respiratory problems, some types of cancer including endometrial, breast, prostate, and colon cancer, thrombotic disease, polycystic ovarian syndrome, reduced fertility, complications of pregnancy, menstrual irregularities, hirsutism, stress incontinence, and depression.

15 CNS disorders

CNS disorders which may be treated include brain injuries, cerebrovascular diseases and their consequences, Parkinson's disease, corticobasal degeneration, motor neuron disease, dementia, including ALS, multiple sclerosis, traumatic brain injury, stroke, post-stroke, post-traumatic brain injury, and small-vessel cerebrovascular disease. 20 Dementias, such as Alzheimer's disease, vascular dementia, dementia with Lewy bodies, frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17, frontotemporal dementias, including Pick's disease, progressive nuclear palsy, corticobasal degeneration, Huntington's disease, thalamic degeneration, Creutzfeld-Jakob dementia, HIV dementia, schizophrenia with dementia, and Korsakoff's 25 psychosis also can be treated. Similarly, it may be possible to treat cognitive-related disorders, such as mild cognitive impairment, age-associated memory impairment, age-related cognitive decline, vascular cognitive impairment, attention deficit disorders, attention deficit hyperactivity disorders, and memory disturbances in

children with learning disabilities, by regulating the activity of human 5HT-like GPCR.

Pain that is associated with CNS disorders also can be treated by regulating the
5 activity of human 5HT-like GPCR. Pain which can be treated includes that
associated with central nervous system disorders, such as multiple sclerosis, spinal
cord injury, sciatica, failed back surgery syndrome, traumatic brain injury, epilepsy,
Parkinson's disease, post-stroke, and vascular lesions in the brain and spinal cord
(e.g., infarct, hemorrhage, vascular malformation). Non-central neuropathic pain
10 includes that associated with post mastectomy pain, reflex sympathetic dystrophy
(RSD), trigeminal neuralgia/oculopathy, post-surgical pain, HIV/AIDS related
pain, cancer pain, metabolic neuropathies (e.g., diabetic neuropathy, vasculitic neuro-
pathy secondary to connective tissue disease), paraneoplastic polyneuropathy
15 associated, for example, with carcinoma of lung, or leukemia, or lymphoma, or
carcinoma of prostate, colon or stomach, trigeminal neuralgia, cranial neuralgias, and
post-herpetic neuralgia. Pain associated with cancer and cancer treatment also can be
treated, as can headache pain (for example, migraine with aura, migraine without
aura, and other migraine disorders), episodic and chronic tension-type headache,
tension-type like headache, cluster headache, and chronic paroxysmal hemicrania.
20

Cardiovascular disorders

Cardiovascular diseases include the following disorders of the heart and the vascular
25 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.

Heart failure is defined as a pathophysiologic state in which an abnormality of
30 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.

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Peripheral vascular diseases are defined as 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.

COPD

- Chronic obstructive pulmonary (or airways) disease (COPD) is a condition defined physiologically as airflow obstruction that generally results from a mixture of 5 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 the lung. Chronic bronchitis is defined clinically as the presence of chronic 10 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.
- 15 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 20 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 25 dysfunction, and mucus hypersecretion, all are potential sequelae of this inflammatory response that lead to impaired airflow and gas exchange.

GPCRs and COPD

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, 5 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.

Cancer

15

Cancer is a disease fundamentally caused by oncogenic cellular transformation. There are several hallmarks of transformed cells that distinguish them from their normal counterparts and underlie the pathophysiology of cancer. These include uncontrolled cellular proliferation, unresponsiveness to normal death-inducing signals 20 (immortalization), increased cellular motility and invasiveness, increased ability to recruit blood supply through induction of new blood vessel formation (angiogenesis), genetic instability, and dysregulated gene expression. Various combinations of these aberrant physiologies, along with the acquisition of drug-resistance frequently lead to an intractable disease state in which organ failure and patient death ultimately ensue.

25

Most standard cancer therapies target cellular proliferation and rely on the differential proliferative capacities between transformed and normal cells for their efficacy. This approach is hindered by the facts that several important normal cell types are also highly proliferative and that cancer cells frequently become resistant to

these agents. Thus, the therapeutic indices for traditional anti-cancer therapies rarely exceed 2.0.

The advent of genomics-driven molecular target identification has opened up the possibility of identifying new cancer-specific targets for therapeutic intervention that will provide safer, more effective treatments for cancer patients. Thus, newly discovered tumor-associated genes and their products can be tested for their role(s) in disease and used as tools to discover and develop innovative therapies. Genes playing important roles in any of the physiological processes outlined above can be characterized as cancer targets.

Genes or gene fragments identified through genomics can readily be expressed in one or more heterologous expression systems to produce functional recombinant proteins. These proteins are characterized *in vitro* for their biochemical properties and then used as tools in high-throughput molecular screening programs to identify chemical modulators of their biochemical activities. Agonists and/or antagonists of target protein activity can be identified in this manner and subsequently tested in cellular and *in vivo* disease models for anti-cancer activity. Optimization of lead compounds with iterative testing in biological models and detailed pharmacokinetic and toxicological analyses form the basis for drug development and subsequent testing in humans.

Allergy and Asthma

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 IgE-dependent or T cell-dependent hypersensitivity reaction. Hypersensitivity reactions can be local or systemic and typically occur within minutes of allergen ex-

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 63 -

posure 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 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.

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 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
5 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,
10 such as beta agonists, 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,
15 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.
20 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
25 inhibit interleukin-2 dependent T lymphocyte proliferation; however, they are known to have many other effects. For example, cyclosporin is used as a immuno-suppressant 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
30 homeostasis. Other treatments that block the release or activity of mediators of

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 65 -

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 asthma that both blocks the episodic attacks of the disorder and preferentially dampens the hyperactive allergic immune response without immunocompromising the patient.

GPCRs and asthma

10

G protein-coupled receptors (GPCRs) are membrane proteins characterized by seven transmembrane spanning domains that mediate the actions of many extracellular signals. GPCRs interact with heterotrimeric guanine nucleotide binding regulatory proteins (G proteins) that modulate a variety of second messenger systems or ionic conductances to effect physiological responses. Many of the mediators involved in airway smooth muscle contraction and in the chemoattraction of inflammatory cells exert their effects through GPCR binding. Among the mediators of smooth muscle contraction are leukotrienes, platelet-activating factor, endothelin-1, adenosine, and thromboxane A2. Receptor antagonists that block the activation of GPCRs by some of these mediators have been successfully used as treatments for asthma. Among the chemoattractants of inflammatory cells are the chemokines, such as eotaxin, MCP-4, RANTES, and IL-8. Chemokine receptor antagonists similarly are being developed as treatments for asthma. Sarau *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 56, 657-63, 1999; Kitaura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271, 7725-30, 1996; Ligget *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 394-402, 1995; Panettieri *et al.*, *J. Immunol.* 154, 2358-65, 1995; Noveral *et al.*, *Am. J. Physiol.* 263, L317-24, 1992; Honda *et al.*, *Nature* 349, 342-46, 1991.

15

Activation of some GPCRs may conversely have beneficial effects in asthma. For example, receptor agonists that activate the β 1- and β 2-adrenergic GPCRs are used therapeutically to relax contracted airway smooth muscle in the treatment of asthma

20

25

30

attacks. Thus, regulation of GPCRs in either a positive or negative manner may play an important role in the treatment of asthma.

Hematological disorders

5

Guanin-nucleotide-binding (G-) protein coupled receptors (GPCRs) are involved in various hematopoietic processes, e.g. proliferation, differentiation, survival, migration and homing of precursor cells to hematopoietic and lymphoid tissues. Dysfunction of GPCRs may lead to inappropriate production of blood cells resulting in diseases like anemia, leukopenia, thrombocytopenia or different forms of leukemia.

10

15 GPCRs also play a role in diverse functions of circulating white blood cells, e.g. activation of immune response in lymphocytes, cytokine production by monocytes and chemotaxis of granulocytes. Dysregulated GPCR function may contribute to compromised immune function, allergy and other pathologic conditions of the host defense system.

20

In circulating platelets GPCRs mediate activation resulting in platelet aggregation and secretion of mediators eventually leading to hemostasis. Modulation of GPCR function in platelets by pharmacologic or molecular genetic methods has demonstrated key roles of GPCRs in thrombotic diseases and in bleeding disorders thus proving that GPCRs represent appropriate therapeutic drug targets.

25

25 GPCRs are activated by binding of various classes of ligands ranging from small molecules like serotonin to high molecular peptides like chemokines. Some GPCRs are activated by proteolytic cleavage, e.g. by thrombin. Upon ligand binding, signals from GPCRs are mediated via heterotrimeric G-proteins with the class of the α -sub-unit determining the further pathway signal transduction.

It is conceivable that genes coding for „non-standard“ GPCRs with unidentified ligands or unknown intracellular signal transduction pathways (e.g. novel G-proteins) or that GPCRs from classes as yet not associated with the hematopoietic and hemostatic systems will be identified. Therefore it is reasonable to assume that GPCRs
5 specifically expressed in hematopoietic precursor or circulating blood cells represent good targets for therapeutic interventions in dysfunctions of hematopoiesis and hemostasis. See Yang M., Srikaiatkachorn A., Antony M., Chong B.H.; Blood Coagul. Fibrinolysis 1996, 127-33; Arai H., Tsou C.L., Charo I.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14495-14499, 1997; Aragay A.M., Quick M.W.; J. Biol. Chem. 274,
10 4807-4815, 1999; Davignon I., Catalina M.D., Smith D., Montgomery J., Croy J., Siegelman M., Wilkie T.M.; Mol. Cell. Biol. 20, 797-804, 2000; Wiesmann A., Spangrude G.J.; Exp. Hematol. 27, 946-955, 1999; Van Brocklyn J.R., Graler M.H., Bernhardt G., Hobson J.P., Lipp M., Spiegel S.; Blood 95, 2624-2629, 2000; Brass L.F.; J. Clin. Invest. 104, 1663-1665, 1999; Coughlin S.R.; Proc. Natl. Acad. Sci.
15 USA 96, 11023-11027, 1999.

Urological disorders.

Urinary Incontinence

20 Urinary incontinence (UI) is the involuntary loss of urine. Urge urinary incontinence (UUI) is one of the most common types of UI together with stress urinary incontinence (SUI), which is usually caused by a defect in the urethral closure mechanism. UUI is often associated with neurological disorders or diseases causing neuronal damage, such as dementia, Parkinson's disease, multiple sclerosis, stroke, and diabetes, although it also occurs in individuals with no such disorders. One of the usual causes of UUI is overactive bladder (OAB), which is a medical condition referring to the symptoms of frequency and urgency derived from abnormal contractions and instability of the detrusor muscle.
25

30

There are several medications for urinary incontinence on the market today, mainly to help treating UUI. Therapy for OAB is focused on drugs that affect peripheral neural control mechanisms or those that act directly on bladder detrusor smooth muscle contraction, with a major emphasis on development of anticholinergic agents.

- 5 These agents can inhibit the parasympathetic nerves, which control bladder voiding, or can exert a direct spasmolytic effect on the detrusor muscle of the bladder. This results in a decrease in intravesicular pressure, an increase in capacity, and a reduction in the frequency of bladder contraction. Orally active anticholinergic drugs, such as propantheline (ProBanthine), tolterodine tartrate (Detro), and oxybutynin (Ditropan), are the most commonly prescribed drugs. However, their
10 most serious drawbacks are unacceptable side effects, such as dry mouth, abnormal visions, constipation, and central nervous system disturbances. These side effects lead to poor compliance. Dry mouth symptoms alone are responsible for a 70% non-compliance rate with oxybutynin. The inadequacies of present therapies highlight
15 the need for novel, efficacious, safe, orally available drugs that have fewer side effects.

Serotonin receptors

- 20 Correctly coordinated detrusor relaxation and contraction of the urethral sphincter are required for the normal bladder filling, while voiding requires the converse. This harmonized coordination is achieved by the integration of excitatory, inhibitory, and sensory nerve activities in micturition centers located in the spinal cord, pons, and forebrain. Several neurotransmitters, such as 5-hydroxytryptamine (5-HT), □-
25 aminobutyric acid, glycine, dopamine, acetylcholine, and enkephalins, have been identified in the micturition reflex pathways at both spinal and supraspinal sites (de Groat *et al.*, Nervous Control of the Urogenital System, 227-290, 1993).

- It has been recognized that 5-HT has an effect on micturition through both central
30 and peripheral mechanisms (Espey & Downie, Eur J Pharmacol 287: 173-177, 1995).

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 69 -

Most of the well-characterized 5-HT receptors are G-protein coupled receptors (Raymond et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 346: 127-137, 1992). The 5-HT1 family consists of five receptors (5-HT1A, 1B, 1D, 1E and 1F) that share the property of inhibiting the enzyme adenylate cyclase when stimulated by serotonin.

5 With the exception of the 5-HT1E receptor, which appears to be limited to the CNS, these receptors are found in both the CNS and the periphery.

The physiological role of 5-HT1A in the control of micturition was elucidated using 5-HT1A receptor selective antagonist WAY100635, which showed a marked block 10 of isovolumetric bladder contraction in anesthetized rats and an increase of bladder capacity without consistently impairing bladder contractility in conscious rats (Lecci et al., J Pharmacol Exp Therap 262: 181-189, 1992. Blockade of spinal 5-HT1A receptors by intrathecal administration of WAY100635 inhibited the micturition reflex induced by bladder distension as well as bladder contractions elicited by 15 electrical stimulation of the pontine micturition center, whereas it did not show any effect on the ascending pathway. The effective intrathecal administration of WAY100635 was restricted to the L6-S1 spinal cord level Hedge & Eglen, FASEB J 10: 1398-1407, 1996. It was also shown that intrathecal administration of 5-HT1A receptor selective agonist 8-OH-DPAT facilitated the micturition reflex in normal 20 rats and that intravenous administration of 8-OH-DPAT increased the amplitude of reflex-bladder contractions induced by bladder distension in chronically spinalized rats (Khan et al., World J Urol 17:255-260, 1999). Taken together with these results 5-HT1A receptors at the lumbosacral spinal cord level have an important role in tonic control of the micturition reflex pathway. 5-HT1A antagonists may provide 25 therapeutic benefit to treat overactive bladder and urge urinary incontinence.

The 5-HT2 family consists of three receptors (5-HT2A, 2B and 2C) that act through increasing intracellular phosphoinositide metabolism. The 5-HT4 receptor is present 30 in both the CNS and on various tissues of the periphery, where it is positively coupled to adenylate cyclase. There appears to be a negative coupling of the 5-HT5

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 70 -

receptor to adenylate cyclase. The 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors are both positively coupled to adenylate cyclase. The 5-HT₆ receptor is found only in the CNS, while 5-HT₇ receptors are located in both central and peripheral tissues. The only serotonin receptor that is a member of the ligand-gated ion channel superfamily is the 5-HT₃ receptor. When stimulated by serotonin, this receptor conducts a depolarizing cation current into cells.

The activation of 5-HT₃ or 5-HT₄ receptors facilitates acetylcholine release (Testa et al., J Pharmacol Exp Ther 290: 1258-1269, 1999). 5-HT receptors are upregulated in 10 the bladder following obstruction (Kakizaki et al., Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 280: R1407-1413, 2001). Thus, 5-HT₃ or 5-HT₄ antagonists may be beneficial in the treatment of the overactive bladder.

This invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening 15 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 example, an agent identified as described herein (e.g., a modulating agent, an antisense nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or a 5-HT-like GPCR polypeptide binding molecule) can be used in an animal model to determine the 20 efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, 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.

25 A reagent which affects 5-HT-like GPCR activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce 5-HT-like GPCR activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human 5-HT-like GPCR gene. If the expression product is a protein, the reagent is preferably an antibody. For treatment 30 of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a preparation of stem cells which

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 71 -

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.

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 targeting to a specific organ of an animal, such as the lung, liver, spleen, heart brain, lymph nodes, and skin.

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 µg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, more preferably about 1.0 µg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, and even more preferably about 2.0 µg 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.

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 tumor cell, such as a tumor cell ligand exposed on the outer surface of the liposome.

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 72 -

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 5 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.

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, Findeis *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

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 5-HT-like GPCR activity relative to the 5-HT-like GPCR activity which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

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.

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 73 -

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
5 can be expressed as the ratio, LD₅₀/ED₅₀.

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
10 preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to
15 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, general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and
20 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.

Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose
25 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,
30 locations, etc.

- 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, protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.
- 10 Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 µg to about 50 µg/kg, about 50 µg to about 5 mg/kg, about 100 µg to about 500 µg /kg of patient body weight, and about 200 to about 250 µg /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,
- 15 about 1 µg to about 2 mg, about 5 µg to about 500 µg, and about 20 µg to about 100 µg of DNA.
- 20 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.
- 25 Preferably, a reagent reduces expression of a 5-HT-like GPCR gene or the activity of a 5-HT-like GPCR 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 5-HT-like GPCR gene or the activity of a 5-HT-like GPCR polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to 5-
- 30 HT-like GPCR-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of a 5-HT-like GPCR polypeptide, or measurement of 5-HT-like GPCR activity.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 75 -

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
5 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.

10

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.

15

Diagnostic Methods

GPCRs 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 a GPCR. Such diseases, by way of example,
20 are related to cell transformation, such as tumors and cancers, and various cardiovascular disorders, including hypertension and hypotension, as well as diseases arising from abnormal blood flow, abnormal angiotensin-induced aldosterone secretion, and other abnormal control of fluid and electrolyte homeostasis.

25

Differences can be determined between the cDNA or genomic sequence encoding a GPCR 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.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 76 -

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 5 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.

- 10 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 15 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, 20 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 enzymes 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.
- 25 Altered levels of a GPCR 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 30 assays.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 77 -

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 specific examples which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1*Detection of 5-HT-GPCR activity*

5 The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 is inserted into the expression vector pCEV4 and the expression vector pCEV4-5-HT-GPCR. Polypeptide obtained is transfected into human embryonic kidney 293 cells. The cells are scraped from a culture flask into 5 ml of Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5, and lysed by sonication. Cell lysates are centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4 °C. The supernatant is centrifuged at
10 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 protein concentration required to bind less than 10 % of an added radioligand, i.e.
15 ¹²⁵I-labeled serotonin, are added to 96-well polypropylene microtiter plates containing ligand, non-labeled peptides, and binding buffer to a final volume of 250 µl.

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

20 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. 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. The 5-HT-GPCR activity of the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is demonstrated.
25

EXAMPLE 2*Radioligand binding assays*

Human embryonic kidney 293 cells transfected with a polynucleotide which expresses human 5-HT-like GPCR are scraped from a culture flask into 5 ml of Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5, and lysed by sonication. Cell lysates are 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 protein concentration required to bind less than 10 % of the added radioligand, are added to 96-well polypropylene microtiter plates containing ¹²⁵I-labeled ligand or test compound, non-labeled peptides, and binding buffer to a final volume of 250 µl.

In equilibrium saturation binding assays, membrane preparations are incubated in the presence of increasing concentrations (0.1 nM to 4 nM) of ¹²⁵I-labeled ligand or test compound (specific activity 2200 Ci/mmol). The binding affinities of different test compounds are determined in equilibrium competition binding assays, using 0.1 nM ¹²⁵I-peptide in the presence of twelve different concentrations of each test compound.

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.

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. A test compound which increases the

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 80 -

radioactivity of membrane protein by at least 15% relative to radioactivity of membrane protein which was not incubated with a test compound is identified as a compound which binds to a human 5-HT-like GPCR polypeptide.

5 **EXAMPLE 3**

Effect of a test compound on human 5-HT-like GPCR-mediated cyclic AMP formation

Receptor-mediated inhibition of cAMP formation can be assayed in host cells which
10 express human 5-HT-like GPCR. Cells are plated in 96-well plates and incubated in Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 10 mM HEPES, 5 mM theophylline, 2 µg /ml aprotinin, 0.5 mg/ml leupeptin, and 10 µg /ml phosphoramidon for 20 minutes at 37 °C in 5% CO₂. A test compound is added and incubated for an additional 10 minutes at 37 °C. The medium is aspirated, and the reaction is stopped by the addition of 100 mM HCl. The plates are stored at 4 °C for 15 minutes. cAMP content in the stopping solution is measured by radioimmunoassay.

Radioactivity is quantified using a gamma counter equipped with data reduction software. A test compound which decreases radioactivity of the contents of a well relative to radioactivity of the contents of a well in the absence of the test compound is identified as a potential inhibitor of cAMP formation. A test compound which increases radioactivity of the contents of a well relative to radioactivity of the contents of a well in the absence of the test compound is identified as a potential enhancer of cAMP formation.

25

EXAMPLE 4

Effect of a test compound on the mobilization of intracellular calcium

Intracellular free calcium concentration can be measured by microspectrofluorometry
30 using the fluorescent indicator dye Fura-2/AM (Bush *et al.*, *J. Neurochem.* 57, 562-

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 81 -

74, 1991). Stably transfected cells are seeded onto a 35 mm culture dish containing a glass coverslip insert. Cells are washed with HBS, incubated with a test compound, and loaded with 100 µl of Fura-2/AM (10 µM) for 20-40 minutes. After washing with HBS to remove the Fura-2/AM solution, cells are equilibrated in HBS for 10-20
5 minutes. Cells are then visualized under the 40X objective of a Leitz Fluovert FS microscope.

Fluorescence emission is determined at 510 nM, with excitation wavelengths alternating between 340 nM and 380 nM. Raw fluorescence data are converted to
10 calcium concentrations using standard calcium concentration curves and software analysis techniques. A test compound which increases the fluorescence by at least 15% relative to fluorescence in the absence of a test compound is identified as a compound which mobilizes intracellular calcium.

15 **EXAMPLE 5**

Effect of a test compound on phosphoinositide metabolism

Cells which stably express human 5-HT-like GPCR cDNA are plated in 96-well plates and grown to confluence. The day before the assay, the growth medium is
20 changed to 100 µl of medium containing 1% serum and 0.5 µCi ³H-myoinositol. The plates are incubated overnight in a CO₂ incubator (5% CO₂ at 37 °C). Immediately before the assay, the medium is removed and replaced by 200 µl of PBS containing 10 mM LiCl, and the cells are equilibrated with the new medium for 20 minutes.
25 During this interval, cells also are equilibrated with antagonist, added as a 10 µl aliquot of a 20-fold concentrated solution in PBS.

The ³H-inositol phosphate accumulation from inositol phospholipid metabolism is started by adding 10 µl of a solution containing a test compound. To the first well 10 µl are added to measure basal accumulation. Eleven different concentrations of test
30 compound are assayed in the following 11 wells of each plate row. All assays are

performed in duplicate by repeating the same additions in two consecutive plate rows.

The plates are incubated in a CO₂ incubator for one hour. The reaction is terminated 5 by adding 15 µl of 50% v/v trichloroacetic acid (TCA), followed by a 40 minute incubation at 4 °C. After neutralizing TCA with 40 µl of 1 M Tris, the content of the wells is transferred to a Multiscreen HV filter plate (Millipore) containing Dowex AG1-X8 (200-400 mesh, formate form). The filter plates are prepared by adding 10 200 µl of Dowex AG1-X8 suspension (50% v/v, water:resin) to each well. The filter plates are placed on a vacuum manifold to wash or elute the resin bed. Each well is washed 2 times with 200 µl of water, followed by 2 x 200 µl of 5 mM sodium tetraborate/60 mM ammonium formate.

15 The ³H-IPs are eluted into empty 96-well plates with 200 µl of 1.2 M ammonium formate/0.1 formic acid. The content of the wells is added to 3 ml of scintillation cocktail, and radioactivity is determined by liquid scintillation counting.

EXAMPLE 6

Receptor Binding Methods

20 Standard Binding Assays. Binding assays are carried out in a binding buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.5% BSA, and 5 mM MgCl₂. The standard assay for radioligand binding to membrane fragments comprising 5-HT-like GPCR polypeptides is carried out as follows in 96 well microtiter plates (e.g., Dynatech 25 Immulon II Removewell plates). Radioligand is diluted in binding buffer+ PMSF/Baci to the desired cpm per 50 µl, then 50 µl aliquots are added to the wells. For non-specific binding samples, 5 µl of 40 µM cold ligand also is added per well. Binding is initiated by adding 150 µl per well of membrane diluted to the desired concentration (10-30 µg membrane protein/well) in binding buffer+ PMSF/Baci. 30 Plates are then covered with Linbro mylar plate sealers (Flow Labs) and placed on a

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 83 -

Dynatech Microshaker II. Binding is allowed to proceed at room temperature for 1-2 hours and is stopped by centrifuging the plate for 15 minutes at 2,000 x g. The supernatants are decanted, and the membrane pellets are washed once by addition of 200 µl of ice cold binding buffer, brief shaking, and recentrifugation. The individual wells are placed in 12 x 75 mm tubes and counted in an LKB Gammamaster counter (78% efficiency). Specific binding by this method is identical to that measured when free ligand is removed by rapid (3-5 seconds) filtration and washing on polyethylene-imine-coated glass fiber filters.

10 Three variations of the standard binding assay are also used.

1. Competitive radioligand binding assays with a concentration range of cold ligand vs. ¹²⁵I-labeled ligand are carried out as described above with one modification. All dilutions of ligands being assayed are made in 40X PMSF/Baci to a concentration 15 40X the final concentration in the assay. Samples of peptide (5 µl each) are then added per microtiter well. Membranes and radioligand are diluted in binding buffer without protease inhibitors. Radioligand is added and mixed with cold ligand, and then binding is initiated by addition of membranes.
- 20 2. Chemical cross-linking of radioligand with receptor is done after a binding step identical to the standard assay. However, the wash step is done with binding buffer minus BSA to reduce the possibility of non-specific cross-linking of radioligand with BSA. The cross-linking step is carried out as described below.
- 25 3. Larger scale binding assays to obtain membrane pellets for studies on solubilization of receptor:ligand complex and for receptor purification are also carried out. These are identical to the standard assays except that (a) binding is carried out in polypropylene tubes in volumes from 1-250 ml, (b) concentration of membrane protein is always 0.5 mg/ml, and (c) for receptor purification, BSA concentration in the binding buffer is reduced to 0.25%, and the wash step is done 30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 84 -

with binding buffer without BSA, which reduces BSA contamination of the purified receptor.

EXAMPLE 75 *Chemical Cross-Linking of Radioligand to Receptor*

After a radioligand binding step as described above, membrane pellets are re-suspended in 200 µl per microtiter plate well of ice-cold binding buffer without BSA. Then 5 µl per well of 4 mM N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide (ANB-NOS, Pierce) in DMSO is added and mixed. The samples are held on ice and UV-irradiated for 10 minutes with a Mineralight R-52G lamp (UVP Inc., San Gabriel, Calif.) at a distance of 5-10 cm. Then the samples are transferred to Eppendorf microfuge tubes, the membranes pelleted by centrifugation, supernatants removed, and membranes solubilized in Laemmli SDS sample buffer for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). PAGE is carried out as described below. Radiolabeled proteins are visualized by autoradiography of the dried gels with Kodak XAR film and Dupont image intensifier screens.

EXAMPLE 820 *Membrane Solubilization*

Membrane solubilization is carried out in buffer containing 25 mM Tris , pH 8, 10% glycerol (w/v) and 0.2 mM CaCl₂ (solubilization buffer). The highly soluble detergents including Triton X-100, deoxycholate, deoxycholate:lysolecithin, CHAPS, and zwittergent are made up in solubilization buffer at 10% concentrations and stored as frozen aliquots. Lysolecithin is made up fresh because of insolubility upon freeze-thawing and digitonin is made fresh at lower concentrations due to its more limited solubility.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 85 -

To solubilize membranes, washed pellets after the binding step are resuspended free of visible particles by pipetting and vortexing in solubilization buffer at 100,000 x g for 30 minutes. The supernatants are removed and held on ice and the pellets are discarded.

5

EXAMPLE 9*Assay of Solubilized Receptors*

After binding of ^{125}I ligands and solubilization of the membranes with detergent, the
10 intact R:L complex can be assayed by four different methods. All are carried out on
ice or in a cold room at 4-10 °C.).

15 1. Column chromatography (Knutson *et al.*, *Biochem. J.* 254, 641-647, 1988).
Sephadex G-50 columns (8 x 250 mm) are equilibrated with solubilization buffer
containing detergent at the concentration used to solubilize membranes and 1 mg/ml
bovine serum albumin. Samples of solubilized membranes (0.2-0.5 ml) are applied
to the columns and eluted at a flow rate of about 0.7 ml/minute. Samples (0.18 ml)
are collected. Radioactivity is determined in a gamma counter. Void volumes of the
columns are determined by the elution volume of blue dextran. Radioactivity eluting
20 in the void volume is considered bound to protein. Radioactivity eluting later, at the
same volume as free ^{125}I ligands, is considered non-bound.

25 2. Polyethyleneglycol precipitation (Cuatrecasas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69,
318-322, 1972). For a 100 μl sample of solubilized membranes in a 12 x 75 mm
polypropylene tube, 0.5 ml of 1% (w/v) bovine gamma globulin (Sigma) in 0.1 M
sodium phosphate buffer is added, followed by 0.5 ml of 25% (w/v) polyethyleneglycol
(Sigma) and mixing. The mixture is held on ice for 15 minutes. Then 3 ml of
0.1 M sodium phosphate, pH 7.4, is added per sample. The samples are rapidly (1-3
seconds) filtered over Whatman GF/B glass fiber filters and washed with 4 ml of the

phosphate buffer. PEG-precipitated receptor : ^{125}I -ligand complex is determined by gamma counting of the filters.

3. GFB/PEI filter binding (Bruns *et al.*, *Analytical Biochem.* 132, 74-81, 1983).

5 Whatman GF/B glass fiber filters are soaked in 0.3% polyethyleneimine (PEI, Sigma) for 3 hours. Samples of solubilized membranes (25-100 μl) are replaced in 12 x 75 mm polypropylene tubes. Then 4 ml of solubilization buffer without detergent is added per sample and the samples are immediately filtered through the GFB/PEI filters (1-3 seconds) and washed with 4 ml of solubilization buffer. CPM of receptor : ^{125}I -ligand complex adsorbed to filters are determined by gamma counting.

10 4. Charcoal/Dextran (Paul and Said, *Peptides* 7(Suppl. 1), 147-149, 1986). Dextran

T70 (0.5 g, Pharmacia) is dissolved in 1 liter of water, then 5 g of activated charcoal (Norit A, alkaline; Fisher Scientific) is added. The suspension is stirred for 10 minutes at room temperature and then stored at 4 °C. until use. To measure R:L complex, 4 parts by volume of charcoal/dextran suspension are added to 1 part by volume of solubilized membrane. The samples are mixed and held on ice for 2 minutes and then centrifuged for 2 minutes at 11,000 x g in a Beckman microfuge.

15 20 Free radioligand is adsorbed charcoal/dextran and is discarded with the pellet. Receptor : ^{125}I -ligand complexes remain in the supernatant and are determined by gamma counting.

EXAMPLE 10

25 *Receptor Purification*

Binding of biotinyl-receptor to GH₄ C1 membranes is carried out as described above. Incubations are for 1 hour at room temperature. In the standard purification protocol, the binding incubations contain 10 nM Bio-S29. ^{125}I ligand is added as a tracer at

levels of 5,000-100,000 cpm per mg of membrane protein. Control incubations contain 10 μ M cold ligand to saturate the receptor with non-biotinylated ligand.

Solubilization of receptor:ligand complex also is carried out as described above, with 5 0.15% deoxycholate:lysolecithin in solubilization buffer containing 0.2 mM MgCl₂, to obtain 100,000 \times g supernatants containing solubilized R:L complex.

10 Immobilized streptavidin (streptavidin cross-linked to 6% beaded agarose, Pierce Chemical Co.; "SA-agarose") is washed in solubilization buffer and added to the solubilized membranes as 1/30 of the final volume. This mixture is incubated with constant stirring by end-over-end rotation for 4-5 hours at 4-10 °C. Then the mixture is applied to a column and the non-bound material is washed through. Binding of radioligand to SA-agarose is determined by comparing cpm in the 100,000 \times g supernatant with that in the column effluent after adsorption to SA-agarose. Finally, 15 the column is washed with 12-15 column volumes of solubilization buffer+0.15% deoxycholate:lysolecithin +1/500 (vol/vol) 100 \times 4pase.

20 The streptavidin column is eluted with solubilization buffer+0.1 mM EDTA+0.1 mM EGTA+0.1 mM GTP-gamma-S (Sigma)+0.15% (wt/vol) deoxycholate:lysolecithin +1/1000 (vol/vol) 100.times.4pase. First, one column volume of elution buffer is passed through the column and flow is stopped for 20-30 minutes. Then 3-4 more column volumes of elution buffer are passed through. All the eluates are pooled.

25 Eluates from the streptavidin column are incubated overnight (12-15 hours) with immobilized wheat germ agglutinin (WGA agarose, Vector Labs) to adsorb the receptor via interaction of covalently bound carbohydrate with the WGA lectin. The ratio (vol/vol) of WGA-agarose to streptavidin column eluate is generally 1:400. A range from 1:1000 to 1:200 also can be used. After the binding step, the resin is 30 pelleted by centrifugation, the supernatant is removed and saved, and the resin is washed 3 times (about 2 minutes each) in buffer containing 50 mM HEPES, pH 8, 5

mM MgCl₂, and 0.15% deoxycholate:lysolecithin. To elute the WGA-bound receptor, the resin is extracted three times by repeated mixing (vortex mixer on low speed) over a 15-30 minute period on ice, with 3 resin columns each time, of 10 mM N-N'-N"-triacetylchitotriose in the same HEPES buffer used to wash the resin. After 5 each elution step, the resin is centrifuged down and the supernatant is carefully removed, free of WGA-agarose pellets. The three, pooled eluates contain the final, purified receptor. The material non-bound to WGA contain G protein subunits specifically eluted from the streptavidin column, as well as non-specific contaminants. All these fractions are stored frozen at -90 °C.

10

EXAMPLE 11*Identification of test compounds that bind to 5-HT-like GPCR polypeptides*

Purified 5-HT-like GPCR 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. 5-HT-like GPCR polypeptides comprise an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. The test compounds comprise a fluorescent tag. The samples are incubated for 5 minutes to one hour. Control samples are incubated 15 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 5-HT-like GPCR 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 20 in which a test compound is not incubated is identified as a compound which binds to a 5-HT-like GPCR polypeptide.

EXAMPLE 12*Identification of a test compound which decreases 5-HT-like GPCR gene expression*

A test compound is administered to a culture of human gastric cells and incubated at
5 37 °C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells incubated for the
same time without the test compound provides a negative control.

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
10 hybridized with a ³²P-labeled 5-HT-like GPCR-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 5-HT-
like GPCR-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test
compound is identified as an inhibitor of 5-HT-like GPCR gene expression.

15

EXAMPLE 13*Expression of recombinant human 5-HT-like GPCR*

The *Pichia pastoris* expression vector pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) is used.
20 to produce large quantities of recombinant human 5-HT-like GPCR polypeptides in
yeast. The 5-HT-like GPCR-encoding DNA sequence is derived from SEQ ID NO:1.
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.
25 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 enzymes 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
30 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 5-HT-like GPCR polypeptide is obtained.

10 **EXAMPLE 14**

Tissue-specific expression of 5-HT-like GPCR

The qualitative expression pattern of 5-HT-like GPCR in various tissues and cell lines was determined by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

To demonstrate that 5-HT-like GPCR is involved in CNS disorders, the following tissues are screened: fetal and adult brain, muscle, heart, lung, kidney, liver, thymus, testis, colon, placenta, trachea, pancreas, kidney, gastric mucosa, colon, liver, cerebellum, skin, cortex (Alzheimer's and normal), hypothalamus, cortex, amygdala, cerebellum, hippocampus, choroid, plexus, thalamus, and spinal cord.

To demonstrate that 5-HT-like GPCR is involved in the disease process of obesity, expression is determined in the following tissues: subcutaneous adipose tissue, mesenteric adipose tissue, adrenal gland, bone marrow, brain (cerebellum, spinal cord, cerebral cortex, caudate, medulla, substantia nigra, and putamen), colon, fetal brain, heart, kidney, liver, lung, mammary gland, pancreas, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle small intestine, spleen, stomach, testes, thymus, thyroid trachea, and uterus. Neuroblastoma cell lines SK-Nr-Be (2), Hr, Sk-N-As, HTB-10, IMR-32, SNSY-5Y, T3, SK-N-D2, D283, DAOY, CHP-2, U87MG,

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 91 -

BE(2)C, T986, KANTS, MO59K, CHP234, C6 (rat), SK-N-F1, SK-PU-DW, PFSK-1, BE(2)M17, and MCIXC also are tested for 5-HT-like GPCR expression. As a final step, the expression of 5-HT-like GPCR in cells derived from normal individuals with the expression of cells derived from obese individuals is compared.

5

To demonstrate that 5-HT-like GPCR is involved in the disease process of COPD, the initial expression panel consists of RNA samples from 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 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.

10

15

To demonstrate that 5-HT-like GPCR is involved in cancer, expression is determined in the following tissues: adrenal gland, bone marrow, brain, cerebellum, colon, fetal brain, fetal liver, heart, kidney, liver, lung, mammary gland, pancreas, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spinal cord, spleen, stomach, testis, thymus, thyroid, trachea, uterus, and peripheral blood lymphocytes. Expression in the following cancer cell lines also is determined: DU-145 (prostate), NCI-H125 (lung), HT-29 (colon), COLO-205 (colon), A-549 (lung), NCI-H460 (lung), HT-116 (colon), DLD-1 (colon), MDA-MD-231 (breast), LS174T (colon), ZF-75 (breast), MDA-MN-435 (breast), HT-1080, MCF-7 (breast), and U87. Matched pairs of malignant and normal tissue from the same patient also are tested.

20

25

30

To demonstrate that 5-HT-like GPCR is involved in the disease process of diabetes, the following whole body panel is screened to show predominant or relatively high expression: subcutaneous and mesenteric adipose tissue, adrenal gland, bone marrow,

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 92 -

brain, colon, fetal brain, heart, hypothalamus, kidney, liver, lung, mammary gland, pancreas, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spleen, stomach, testis, thymus, thyroid, trachea, and uterus. Human islet cells and an islet cell library also are tested. As a final step, the expression of 5-HT-like GPCR in 5 cells derived from normal individuals with the expression of cells derived from diabetic individuals is compared.

To demonstrate that 5-HT-like GPCR is involved in the disease process of asthma, the following whole body panel is screened to show predominant or relatively high 10 expression in lung or immune tissues: brain, heart, kidney, liver, lung, trachea, bone marrow, colon, small intestine, spleen, stomach, thymus, mammary gland, skeletal muscle, prostate, testis, uterus, cerebellum, fetal brain, fetal liver, spinal cord, placenta, adrenal gland, pancreas, salivary gland, thyroid, peripheral blood leukocytes, lymph node, and tonsil. Once this is established, the following lung and 15 immune system cells are screened to localize expression to particular cell subsets: lung microvascular endothelial cells, bronchial/tracheal epithelial cells, bronchial/tracheal smooth muscle cells, lung fibroblasts, T cells (T helper 1 subset, T helper 2 subset, NKT cell subset, and cytotoxic T lymphocytes), B cells, mono-nuclear cells (monocytes and macrophages), mast cells, eosinophils, neutrophils, and 20 dendritic cells. As a final step, the expression of 5-HT-like GPCR in cells derived from normal individuals with the expression of cells derived from asthmatic individuals is compared.

25 *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 phase of PCR, the amount of product is proportional to the initial number of template copies.

30

If the amplification is performed in the presence of an internally quenched 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).

10

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 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.

15

All "real time PCR" measurements of fluorescence are made in the ABI Prism 7700.

RNA extraction and cDNA preparation. Total RNA from the tissues listed above are used for expression quantification. RNAs labeled "from autopsy" are 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; 10mM 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

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 94 -

precipitated with 1/10 volume of 3 M sodium acetate, pH5.2, and 2 volumes of ethanol.

5 Fifty µg of each RNA from the autopic tissues are DNase treated with the DNA-free kit purchased from Ambion (Ambion, TX). After resuspension and spectrophotometric quantification, each sample is reverse transcribed with the TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems, CA) according to the manufacturer's protocol. The final concentration of RNA in the reaction mix is 200ng/µL. Reverse transcription is carried out with 2.5µM of random hexamer
10 primers.

15 *TaqMan quantitative analysis.* Specific primers and probe are designed according to the recommendations of PE Applied Biosystems; a FAM (6-carboxyfluorescein)- or TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine)-labeled probe is used. Quantification experiments are performed on 10 ng of reverse transcribed RNA from each sample. Each determination is done in triplicate.

20 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).

25 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 ml.

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.

30

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 15

In vivo testing of compounds/target validation

10 **1. Pain:**

Acute Pain

Acute pain is measured on a hot plate mainly in rats. Two variants of hot plate testing are used: In the classical variant animals are put on a hot surface (52 to 56 °C) and the latency time is measured until the animals show nocifensive behavior, such as stepping or foot licking. The other variant is an increasing temperature hot plate where the experimental animals are put on a surface of neutral temperature. Subsequently this surface is slowly but constantly heated until the animals begin to lick a hind paw. The temperature which is reached when hind paw licking begins is a measure for pain threshold.

Compounds are tested against a vehicle treated control group. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

25

Persistent Pain

Persistent pain is measured with the formalin or capsaicin test, mainly in rats. A solution of 1 to 5% formalin or 10 to 100 µg capsaicin is injected into one hind paw of the experimental animal. After formalin or capsaicin application the animals show

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 96 -

nocifensive reactions like flinching, licking and biting of the affected paw. The number of nocifensive reactions within a time frame of up to 90 minutes is a measure for intensity of pain.

- 5 Compounds are tested against a vehicle treated control group. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to formalin or capsaicin administration.

Neuropathic Pain

- 10 Neuropathic pain is induced by different variants of unilateral sciatic nerve injury mainly in rats. The operation is performed under anesthesia. The first variant of sciatic nerve injury is produced by placing loosely constrictive ligatures around the common sciatic nerve. The second variant is the tight ligation of about the half of the diameter of the common sciatic nerve. In the next variant, a group of models is used in which tight ligations or transections are made of either the L5 and L6 spinal nerves, or the L₅ spinal nerve only. The fourth variant involves an axotomy of two of the three terminal branches of the sciatic nerve (tibial and common peroneal nerves) leaving the remaining sural nerve intact whereas the last variant comprises 15 the axotomy of only the tibial branch leaving the sural and common nerves uninjured. Control animals are treated with a sham operation.

- 20 Postoperatively, the nerve injured animals develop a chronic mechanical allodynia, cold allodynbia, as well as a thermal hyperalgesia. Mechanical allodynia is measured by means of a pressure transducer (electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA; Electronic von Frey System, Somedic Sales AB, Hörby, Sweden). Thermal hyperalgesia is measured by means of a radiant heat source (Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy), or by means of a cold plate of 5 to 10 °C where the nocifensive reactions of the affected 25 hind paw are counted as a measure of pain intensity. A further test for cold induced

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 97 -

5 pain is the counting of nocifensive reactions, or duration of nocifensive responses after plantar administration of acetone to the affected hind limb. Chronic pain in general is assessed by registering the circadian rhythms in activity (Surjo and Arndt, Universität zu Köln, Cologne, Germany), and by scoring differences in gait (foot print patterns; FOOTPRINTS program, Klapdor et al., 1997. A low cost method to analyze footprint patterns. J. Neurosci. Methods 75, 49-54).

10 Compounds are tested against sham operated and vehicle treated control groups. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

Inflammatory Pain

15 Inflammatory pain is induced mainly in rats by injection of 0.75 mg carrageenan or complete Freund's adjuvant into one hind paw. The animals develop an edema with mechanical allodynia as well as thermal hyperalgesia. Mechanical allodynia is measured by means of a pressure transducer (electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA). Thermal hyperalgesia is measured by means of a radiant heat source (Plantar Test, Ugo Basile, 20 Comerio, Italy, Paw thermal stimulator, G. Ozaki, University of California, USA). For edema measurement two methods are being used. In the first method, the animals are sacrificed and the affected hindpaws sectioned and weighed. The second method comprises differences in paw volume by measuring water displacement in a plethysmometer (Ugo Basile, Comerio, Italy).

25 Compounds are tested against uninflamed as well as vehicle treated control groups. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

Diabetic Neuropathic Pain

Rats treated with a single intraperitoneal injection of 50 to 80 mg/kg streptozotocin develop a profound hyperglycemia and mechanical allodynia within 1 to 3 weeks.

5 Mechanical allodynia is measured by means of a pressure transducer (electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, USA).

10 Compounds are tested against diabetic and non-diabetic vehicle treated control groups. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

2. Parkinson's disease***6-Hydroxydopamine (6-OH-DA) Lesion***

Degeneration of the dopaminergic nigrostriatal and striatopallidal pathways is the central pathological event in Parkinson's disease. This disorder has been mimicked experimentally in rats using single/sequential unilateral stereotaxic injections of 20 6-OH-DA into the medium forebrain bundle (MFB).

Male Wistar rats (Harlan Winkelmann, Germany), weighing 200±250 g at the beginning of the experiment, are used. The rats are maintained in a temperature- and humidity-controlled environment under a 12 h light/dark cycle with free access to 25 food and water when not in experimental sessions. The following *in vivo* protocols are approved by the governmental authorities. All efforts are made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to *in vivo* techniques.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 99 -

Animals are administered pargyline on the day of surgery (Sigma, St. Louis, MO, USA; 50 mg/kg i.p.) in order to inhibit metabolism of 6-OHDA by monoamine oxidase and desmethylimipramine HCl (Sigma; 25 mg/kg i.p.) in order to prevent uptake of 6-OHDA by noradrenergic terminals. Thirty minutes later the rats are
5 anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and placed in a stereotaxic frame. In order to lesion the DA nigrostriatal pathway 4 µl of 0.01% ascorbic acid-saline containing 8 µg of 6-OHDA HBr (Sigma) are injected into the left medial fore-brain bundle at a rate of 1 µl/min (2.4 mm anterior, 1.49 mm lateral, -2.7 mm ventral to Bregma and the skull surface). The needle is left in place an additional 5 min to allow
10 diffusion to occur.

Stepping Test

Forelimb akinesia is assessed three weeks following lesion placement using a modified stepping test protocol. In brief, the animals are held by the experimenter with one hand fixing the hindlimbs and slightly raising the hind part above the surface. One paw is touching the table, and is then moved slowly sideways (5 s for 1 m), first in the forehand and then in the backhand direction. The number of adjusting steps is counted for both paws in the backhand and forehand direction of movement. The
15 sequence of testing is right paw forehand and backhand adjusting stepping, followed by left paw forehand and backhand directions. The test is repeated three times on three consecutive days, after an initial training period of three days prior to the first testing. Forehand adjusted stepping reveals no consistent differences between lesioned and healthy control animals. Analysis is therefore restricted to backhand ad-
20 justed stepping.
25

Balance Test

Balance adjustments following postural challenge are also measured during the
30 stepping test sessions. The rats are held in the same position as described in the

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 100 -

stepping test and, instead of being moved sideways, tilted by the experimenter towards the side of the paw touching the table. This maneuver results in loss of balance and the ability of the rats to regain balance by forelimb movements is scored on a scale ranging from 0 to 3. Score 0 is given for a normal forelimb placement.

5 When the forelimb movement is delayed but recovery of postural balance detected, score 1 is given. Score 2 represents a clear, yet insufficient, forelimb reaction, as evidenced by muscle contraction, but lack of success in recovering balance, and score 3 is given for no reaction of movement. The test is repeated three times a day on each side for three consecutive days after an initial training period of three days prior to

10 the first testing.

Staircase Test (Paw Reaching)

A modified version of the staircase test is used for evaluation of paw reaching behavior three weeks following primary and secondary lesion placement. Plexiglass test boxes with a central platform and a removable staircase on each side are used. The apparatus is designed such that only the paw on the same side at each staircase can be used, thus providing a measure of independent forelimb use. For each test the animals are left in the test boxes for 15 min. The double staircase is filled with 7 x 3

15 chow pellets (Precision food pellets, formula: P, purified rodent diet, size 45 mg; Sandown Scientific) on each side. After each test the number of pellets eaten (successfully retrieved pellets) and the number of pellets taken (touched but dropped) for each paw and the success rate (pellets eaten/pellets taken) are counted separately.

20 After three days of food deprivation (12 g per animal per day) the animals are tested for 11 days. Full analysis is conducted only for the last five days.

25

MPTP treatment

The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP) causes degeneration of mesencephalic dopaminergic (DAergic) neurons in rodents, non-human

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 101 -

5 primates, and humans and, in so doing, reproduces many of the symptoms of Parkinson's disease. MPTP leads to a marked decrease in the levels of dopamine and its metabolites, and in the number of dopaminergic terminals in the striatum as well as severe loss of the tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactive cell bodies in the substantia nigra, pars compacta.

In order to obtain severe and long-lasting lesions, and to reduce mortality, animals receive single injections of MPTP, and are then tested for severity of lesion 7–10 days later. Successive MPTP injections are administered on days 1, 2 and 3. Animals 10 receive application of 4 mg/kg MPTP hydrochloride (Sigma) in saline once daily. All injections are intraperitoneal (i.p.) and the MPTP stock solution is frozen between injections. Animals are decapitated on day 11.

Immunohistology

15 At the completion of behavioral experiments, all animals are anaesthetized with 3 ml thiopental (1 g/40 ml i.p., Tyrol Pharma). The mice are perfused transcardially with 0.01 M PBS (pH 7.4) for 2 min, followed by 4% paraformaldehyde (Merck) in PBS for 15 min. The brains are removed and placed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4 °C. For dehydration they are then transferred to a 20% sucrose (Merck) solution in 20 0.1 M PBS at 4 °C until they sink. The brains are frozen in methylbutan at -20 °C for 2 min and stored at -70 °C. Using a sledge microtome (mod. 3800-Frigocut, Leica), 25 µm sections are taken from the genu of the corpus callosum (AP 1.7 mm) to the hippocampus (AP 21.8 mm) and from AP 24.16 to AP 26.72. Forty-six sections are 25 cut and stored in assorters in 0.25 M Tris buffer (pH 7.4) for immunohistochemistry.

A series of sections is processed for free-floating tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry. Following three rinses in 0.1 M PBS, endogenous peroxidase activity is quenched for 10 min in 0.3% H₂O₂ ± PBS. After rinsing in PBS, sections

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 102 -

are preincubated in 10% normal bovine serum (Sigma) for 5 min as blocking agent and transferred to either primary anti-rat TH rabbit antiserum (dilution 1:2000).

Following overnight incubation at room temperature, sections for TH immunoreactivity are rinsed in PBS (2 x10 min) and incubated in biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G raised in goat (dilution 1:200) (Vector) for 90 min, rinsed repeatedly and transferred to Vectastain ABC (Vector) solution for 1 h. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) in 0.1 M PBS, supplemented with 0.005% H₂O₂, serves as chromogen in the subsequent visualization reaction.

Sections are mounted on to gelatin-coated slides, left to dry overnight, counter-stained with hematoxylin dehydrated in ascending alcohol concentrations and cleared in butylacetate. Coverslips are mounted on entellan.

Rotarod Test

15

We use a modification of the procedure described by Rozas and Labandeira-Garcia (1997), with a CR-1 Rotamex system (Columbus Instruments, Columbus, OH) comprising an IBM-compatible personal computer, a CIO-24 data acquisition card, a control unit, and a four-lane rotarod unit. The rotarod unit consists of a rotating spindle (diameter 7.3 cm) and individual compartments for each mouse. The system software allows preprogramming of session protocols with varying rotational speeds (0–80 rpm). Infrared beams are used to detect when a mouse has fallen onto the base grid beneath the rotarod. The system logs the fall as the end of the experiment for that mouse, and the total time on the rotarod, as well as the time of the fall and all the set-up parameters, are recorded. The system also allows a weak current to be passed through the base grid, to aid training.

20

25

3. Dementia**The object recognition task**

The object recognition task has been designed to assess the effects of experimental
5 manipulations on the cognitive performance of rodents. A rat is placed in an open
field, in which two identical objects are present. The rats inspects both objects during
the first trial of the object recognition task. In a second trial, after a retention interval
of for example 24 hours, one of the two objects used in the first trial, the 'familiar'
10 object, and a novel object are placed in the open field. The inspection time at each of
the objects is registered. The basic measures in the OR task is the time spent by a rat
exploring the two object the second trial. Good retention is reflected by higher
exploration times towards the novel than the 'familiar' object.

15 Administration of the putative cognition enhancer prior to the first trial
predominantly allows assessment of the effects on acquisition, and eventually on
consolidation processes. Administration of the testing compound after the first trial
allows to assess the effects on consolidation processes, whereas administration before
the second trial allows to measure effects on retrieval processes.

20 **The passive avoidance task**

The passive avoidance task assesses memory performance in rats and mice. The in-
hibitory avoidance apparatus consists of a two-compartment box with a light com-
partment and a dark compartment. The two compartments are separated by a
25 guillotine door that can be operated by the experimenter. A threshold of 2 cm
separates the two compartments when the guillotine door is raised. When the door is
open, the illumination in the dark compartment is about 2 lux. The light intensity is
about 500 lux at the center of the floor of the light compartment.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 104 -

Two habituation sessions, one shock session, and a retention session are given, separated by inter-session intervals of 24 hours. In the habituation sessions and the retention session the rat is allowed to explore the apparatus for 300 sec. The rat is placed in the light compartment, facing the wall opposite to the guillotine door. After 5 an accommodation period of 15 sec. the guillotine door is opened so that all parts of the apparatus can be visited freely. Rats normally avoid brightly lit areas and will enter the dark compartment within a few seconds.

In the shock session the guillotine door between the compartments is lowered as soon 10 as the rat has entered the dark compartment with its four paws, and a scrambled 1 mA footshock is administered for 2 sec. The rat is removed from the apparatus and put back into its home cage. The procedure during the retention session is identical to that of the habituation sessions.

15 The step-through latency, that is the first latency of entering the dark compartment (in sec.) during the retention session is an index of the memory performance of the animal; the longer the latency to enter the dark compartment, the better the retention is. A testing compound is given half an hour before the shock session, together with 20 1 mg*kg⁻¹ scopolamine. Scopolamine impairs the memory performance during the retention session 24 hours later. If the test compound increases the enter latency compared with the scopolamine-treated controls, is likely to possess cognition enhancing potential.

The Morris water escape task

25 The Morris water escape task measures spatial orientation learning in rodents. It is a test system that has extensively been used to investigate the effects of putative therapeutic on the cognitive functions of rats and mice. The performance of an animal is assessed in a circular water tank with an escape platform that is submerged about 1 cm below the surface of the water. The escape platform is not visible for an 30

animal swimming in the water tank. Abundant extra-maze cues are provided by the furniture in the room, including desks, computer equipment, a second water tank, the presence of the experimenter, and by a radio on a shelf that is playing softly.

- 5 The animals receive four trials during five daily acquisition sessions. A trial is started by placing an animal into the pool, facing the wall of the tank. Each of four starting positions in the quadrants north, east, south, and west is used once in a series of four trials; their order is randomized. The escape platform is always in the same position. A trial is terminated as soon as the animal had climbs onto the escape platform or
10 when 90 seconds have elapsed, whichever event occurs first. The animal is allowed to stay on the platform for 30 seconds. Then it is taken from the platform and the next trial is started. If an animal did not find the platform within 90 seconds it is put on the platform by the experimenter and is allowed to stay there for 30 seconds. After the fourth trial of the fifth daily session, an additional trial is given as a probe trial:
15 the platform is removed, and the time the animal spends in the four quadrants is measured for 30 or 60 seconds. In the probe trial, all animals start from the same start position, opposite to the quadrant where the escape platform had been positioned during acquisition.

20 Four different measures are taken to evaluate the performance of an animal during acquisition training: escape latency, traveled distance, distance to platform, and swimming speed. The following measures are evaluated for the probe trial: time (s) in quadrants and traveled distance (cm) in the four quadrants. The probe trial provides additional information about how well an animal learned the position of the escape platform. If an animal spends more time and swims a longer distance in the quadrant where the platform had been positioned during the acquisition sessions than in any other quadrant, one concludes that the platform position has been learned well.

25 In order to assess the effects of putative cognition enhancing compounds, rats or
30 mice with specific brain lesions which impair cognitive functions, or animals treated

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 106 -

with compounds such as scopolamine or MK-801, which interfere with normal learning, or aged animals which suffer from cognitive deficits, are used.

The T-maze spontaneous alternation task

5

The T-maze spontaneous alternation task (TeMCAT) assesses the spatial memory performance in mice. The start arm and the two goal arms of the T-maze are provided with guillotine doors which can be operated manually by the experimenter. A mouse is put into the start arm at the beginning of training. The guillotine door is closed. In the first trial, the 'forced trial', either the left or right goal arm is blocked by lowering the guillotine door. After the mouse has been released from the start arm, it will negotiate the maze, eventually enter the open goal arm, and return to the start position, where it will be confined for 5 seconds, by lowering the guillotine door. Then, the animal can choose freely between the left and right goal arm (all guillotine-doors opened) during 14 'free choice' trials. As soon as the mouse has entered one goal arm, the other one is closed. The mouse eventually returns to the start arm and is free to visit whichever goal arm it wants after having been confined to the start arm for 5 seconds. After completion of 14 free choice trials in one session, the animal is removed from the maze. During training, the animal is never handled.

10

15

20

25

The per-cent alternations out of 14 trials is calculated. This percentage and the total time needed to complete the first forced trial and the subsequent 14 free choice trials (in s) is analyzed. Cognitive deficits are usually induced by an injection of scopolamine, 30 min before the start of the training session. Scopolamine reduced the per-cent alternations to chance level, or below. A cognition enhancer, which is always administered before the training session, will at least partially, antagonize the scopolamine-induced reduction in the spontaneous alternation rate.

EXAMPLE 16*Diabetes: In vivo testing of compounds/target validation*

1. Glucose Production:

5 Over-production of glucose by the liver, due to an enhanced rate of gluconeogenesis, is the major cause of fasting hyperglycemia in diabetes. Overnight fasted normal rats or mice have elevated rates of gluconeogenesis as do streptozotocin-induced diabetic rats or mice fed ad libitum. Rats are made diabetic with a single intravenous injection of 40 mg/kg of streptozotocin while C57BL/KsJ mice are given 40-
10 60 mg/kg i.p. for 5 consecutive days. Blood glucose is measured from tail-tip blood and then compounds are administered via different routes (p.o., i.p., i.v., s.c.). Blood is collected at various times thereafter and glucose measured. Alternatively, compounds are administered for several days, then the animals are fasted overnight, blood is collected and plasma glucose measured. Compounds that inhibit glucose
15 production will decrease plasma glucose levels compared to the vehicle-treated control group.

2. Insulin Sensitivity:

20 Both ob/ob and db/db mice as well as diabetic Zucker rats are hyperglycemic, hyperinsulinemic and insulin resistant. The animals are pre-bled, their glucose levels measured, and then they are grouped so that the mean glucose level is the same for each group. Compounds are administered daily either q.d. or b.i.d. by different routes (p.o., i.p., s.c.) for 7-28 days. Blood is collected at various times and plasma glucose and insulin levels determined. Compounds that improve insulin sensitivity in these models will decrease both plasma glucose and insulin levels when compared to the vehicle-treated control group.
25

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 108 -

3. Insulin Secretion:

Compounds that enhance insulin secretion from the pancreas will increase plasma insulin levels and improve the disappearance of plasma glucose following the administration of a glucose load. When measuring insulin levels, compounds are administered by different routes (p.o., i.p., s.c. or i.v.) to overnight fasted normal rats or mice. At the appropriate time an intravenous glucose load (0.4g/kg) is given, blood is collected one minute later. Plasma insulin levels are determined. Compounds that enhance insulin secretion will increase plasma insulin levels compared to animals given only glucose. When measuring glucose disappearance, animals are bled at the appropriate time after compound administration, then given either an oral or intraperitoneal glucose load (1g/kg), bled again after 15, 30, 60 and 90 minutes and plasma glucose levels determined. Compounds that increase insulin levels will decrease glucose levels and the area-under-the glucose curve when compared to the vehicle-treated group given only glucose.

Compounds that enhance insulin secretion from the pancreas will increase plasma insulin levels and improve the disappearance of plasma glucose following the administration of a glucose load. When measuring insulin levels, test compounds which regulate 5-HT-like GPCR are administered by different routes (p.o., i.p., s.c., or i.v.) to overnight fasted normal rats or mice. At the appropriate time an intravenous glucose load (0.4g/kg) is given, blood is collected one minute later. Plasma insulin levels are determined. Test compounds that enhance insulin secretion will increase plasma insulin levels compared to animals given only glucose. When measuring glucose disappearance, animals are bled at the appropriate time after compound administration, then given either an oral or intraperitoneal glucose load (1g/kg), bled again after 15, 30, 60, and 90 minutes and plasma glucose levels determined. Test compounds that increase insulin levels will decrease glucose levels and the area-under-the glucose curve when compared to the vehicle-treated group given only glucose.

4. Glucose Production:

Over-production of glucose by the liver, due to an enhanced rate of gluconeogenesis, 5 is the major cause of fasting hyperglycemia in diabetes. Overnight fasted normal rats or mice have elevated rates of gluconeogenesis as do streptozotocin-induced diabetic rats or mice fed ad libitum. Rats are made diabetic with a single intravenous injection of 40 mg/kg of streptozotocin while C57BL/KsJ mice are given 40-60 mg/kg i.p. for 5 consecutive days. Blood glucose is measured from tail-tip blood and then 10 compounds are administered via different routes (p.o., i.p., i.v., s.c.). Blood is collected at various times thereafter and glucose measured. Alternatively, compounds are administered for several days, then the animals are fasted overnight, blood is collected and plasma glucose measured. Compounds that inhibit glucose production will decrease plasma glucose levels compared to the vehicle-treated 15 control group.

5. Insulin Sensitivity:

Both ob/ob and db/db mice as well as diabetic Zucker rats are hyperglycemic, hyperinsulinemic and insulin resistant. The animals are pre-bled, their glucose levels 20 measured, and then they are grouped so that the mean glucose level is the same for each group. Compounds are administered daily either q.d. or b.i.d. by different routes (p.o., i.p., s.c.) for 7-28 days. Blood is collected at various times and plasma glucose and insulin levels determined. Compounds that improve insulin sensitivity in 25 these models will decrease both plasma glucose and insulin levels when compared to the vehicle-treated control group.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 110 -

6. Insulin Secretion:

Compounds that enhance insulin secretion from the pancreas will increase plasma insulin levels and improve the disappearance of plasma glucose following the administration of a glucose load. When measuring insulin levels, compounds are administered by different routes (p.o., i.p., s.c. or i.v.) to overnight fasted normal rats or mice. At the appropriate time an intravenous glucose load (0.4g/kg) is given, blood is collected one minute later. Plasma insulin levels are determined. Compounds that enhance insulin secretion will increase plasma insulin levels compared to animals given only glucose. When measuring glucose disappearance, animals are bled at the appropriate time after compound administration, then given either an oral or intraperitoneal glucose load (1g/kg), bled again after 15, 30, 60 and 90 minutes and plasma glucose levels determined. Compounds that increase insulin levels will decrease glucose levels and the area-under-the-glucose curve when compared to the vehicle-treated group given only glucose.

EXAMPLE 17

Proliferation inhibition assay: Antisense oligonucleotides suppress the growth of cancer cell lines

The cell line used for testing is the human colon cancer cell line HCT116. Cells are cultured in RPMI-1640 with 10-15% fetal calf serum at a concentration of 10,000 cells per milliliter in a volume of 0.5 ml and kept at 37 °C in a 95% air/5%CO₂ atmosphere.

Phosphorothioate oligoribonucleotides are synthesized on an Applied Biosystems Model 380B DNA synthesizer using phosphoroamidite chemistry. A sequence of 24 bases complementary to the nucleotides at position 1 to 24 of SEQ ID NO:1 is used as the test oligonucleotide. As a control, another (random) sequence is used: 5'-TCA ACT GAC TAG ATG TAC ATG GAC-3'. Following assembly and deprotection,

oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate buffered saline at the desired concentration. Purity of the oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoresis and ion exchange HPLC. The purified oligonucleotides are added to the culture medium at a concentration of 10 µM once per 5 day for seven days.

The addition of the test oligonucleotide for seven days results in significantly reduced expression of human 5-HT-like GPCR as determined by Western blotting. This effect is not observed with the control oligonucleotide. After 3 to 7 days, the 10 number of cells in the cultures is counted using an automatic cell counter. The number of cells in cultures treated with the test oligonucleotide (expressed as 100%) is compared with the number of cells in cultures treated with the control oligonucleotide. The number of cells in cultures treated with the test oligonucleotide is not more than 30% of control, indicating that the inhibition of human 5-HT-like 15 GPCR has an anti-proliferative effect on cancer cells.

EXAMPLE 18

In vivo testing of compounds/target validation

1. Acute Mechanistic Assays

20 1.1. Reduction in Mitogenic Plasma Hormone Levels

This non-tumor assay measures the ability of a compound to reduce either the endogenous level of a circulating hormone or the level of hormone produced in response to a biologic stimulus. Rodents are administered test compound (p.o., i.p., 25 i.v., i.m., or s.c.). At a predetermined time after administration of test compound, blood plasma is collected. Plasma is assayed for levels of the hormone of interest. If the normal circulating levels of the hormone are too low and/or variable to provide consistent results, the level of the hormone may be elevated by a pre-treatment with a biologic stimulus (i.e., LHRH may be injected i.m. into mice at a dosage of 30 30 ng/mouse to induce a burst of testosterone synthesis). The timing of plasma

collection would be adjusted to coincide with the peak of the induced hormone response. Compound effects are compared to a vehicle-treated control group. An F-test is preformed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test. Significance is p value ≤ 0.05 compared to the vehicle control group.

5

1.2. Hollow Fiber Mechanism of Action Assay

10

Hollow fibers are prepared with desired cell line(s) and implanted intraperitoneally and/or subcutaneously in rodents. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. Fibers are harvested in accordance with specific readout assay protocol, these may include assays for gene expression (bDNA, PCR, or Taqman), or a specific biochemical activity (i.e., cAMP levels. Results are analyzed by Student's t-test or Rank Sum test after the variance between groups is compared by an F-test, with significance at p ≤ 0.05 as compared to the vehicle control group.

15

2. Subacute Functional *In Vivo* Assays

2.1. Reduction in Mass of Hormone Dependent Tissues

20

This is another non-tumor assay that measures the ability of a compound to reduce the mass of a hormone dependent tissue (i.e., seminal vesicles in males and uteri in females). Rodents are administered test compound (p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c.) according to a predetermined schedule and for a predetermined duration (i.e., 1 week). At termination of the study, animals are weighed, the target organ is excised, any fluid is expressed, and the weight of the organ is recorded. Blood plasma may also be collected. Plasma may be assayed for levels of a hormone of interest or for levels of test agent. Organ weights may be directly compared or they may be normalized for the body weight of the animal. Compound effects are compared to a vehicle-treated control group. An F-test is preformed to determine if the variance is

25

equal or unequal followed by a Student's t-test. Significance is p value ≤ 0.05 compared to the vehicle control group.

2.2. *Hollow Fiber Proliferation Assay*

5

Hollow fibers are prepared with desired cell line(s) and implanted intraperitoneally and/or subcutaneously in rodents. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. Fibers are harvested in accordance with specific readout assay protocol. Cell proliferation is determined by measuring a marker of cell number (i.e., MTT or LDH). The cell number and change in cell number from the starting inoculum are analyzed by Student's t-test or Rank Sum test after the variance between groups is compared by an F-test, with significance at p ≤ 0.05 as compared to the vehicle control group.

10 15 2.3. *Anti-angiogenesis Models*

2.3.1. *Corneal Angiogenesis*

Hydron pellets with or without growth factors or cells are implanted into a micropocket surgically created in the rodent cornea. Compound administration may 20 be systemic or local (compound mixed with growth factors in the hydron pellet). Corneas are harvested at 7 days post implantation immediately following intracardiac infusion of colloidal carbon and are fixed in 10% formalin. Readout is qualitative scoring and/or image analysis. Qualitative scores are compared by Rank Sum test. Image analysis data is evaluated by measuring the area of neovascularization (in 25 pixels) and group averages are compared by Student's t-test (2 tail). Significance is p ≤ 0.05 as compared to the growth factor or cells only group.

2.3.2. Matrigel Angiogenesis

Matrigel, containing cells or growth factors, is injected subcutaneously. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. Matrigel plugs are harvested at predetermined time point(s) and prepared for readout. Readout is an ELISA-based assay for hemoglobin concentration and/or histological examination (i.e. vessel count, special staining for endothelial surface markers: CD31, factor-8). Readouts are analyzed by Student's t-test, after the variance between groups is compared by an F-test, with significance determined at $p < 0.05$ as compared to the vehicle control group.

10

3. Primary Antitumor Efficacy**3.1. Early Therapy Models****3.1.1. Subcutaneous Tumor**

15 Tumor cells or fragments are implanted subcutaneously on Day 0. Vehicle and/or compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule starting at a time, usually on Day 1, prior to the ability to measure the tumor burden. Body weights and tumor measurements are recorded 2-3 times weekly. Mean net body and tumor weights are calculated for each data collection day. Anti-tumor efficacy may be initially determined by comparing the size of treated (T) and control (C) tumors on a given day by a Student's t-test, after the variance between groups is compared by an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$. The experiment may also be continued past the end of dosing in which case tumor measurements would continue to be recorded to monitor tumor growth delay. Tumor growth delays are expressed as the difference in the median time for the treated and control groups to attain a predetermined size divided by the median time for the control group to attain that size. Growth delays are compared by generating Kaplan-Meier curves from the times for individual tumors to attain the evaluation size. Significance is $p \leq 0.05$.

20

25

30

3.1.2. Intraperitoneal/Intracranial Tumor Models

Tumor cells are injected intraperitoneally or intracranially on Day 0. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule
5 starting on Day 1. Observations of morbidity and/or mortality are recorded twice daily. Body weights are measured and recorded twice weekly. Morbidity/mortality data is expressed in terms of the median time of survival and the number of long-term survivors is indicated separately. Survival times are used to generate Kaplan-Meier curves. Significance is $p \leq 0.05$ by a log-rank test compared to the control
10 group in the experiment.

3.2. Established Disease Model

Tumor cells or fragments are implanted subcutaneously and grown to the desired size
15 for treatment to begin. Once at the predetermined size range, mice are randomized into treatment groups. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Tumor and body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. Mean tumor weights of all groups over days post inoculation are graphed for comparison. An F-test is preformed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in
20 the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. Tumor measurements may be recorded after dosing has stopped to monitor tumor growth delay. Tumor growth delays are expressed as the difference in the median time for the treated and control groups to attain a predetermined size divided by the median time for the control group to attain that size.
25 Growth delays are compared by generating Kaplan-Meier curves from the times for individual tumors to attain the evaluation size. Significance is $p \leq 0.05$ compared to the vehicle control group.

3.3. Orthotopic Disease Models**3.3.1. Mammary Fat Pad Assay**

- Tumor cells or fragments, of mammary adenocarcinoma origin, are implanted directly into a surgically exposed and reflected mammary fat pad in rodents. The fat pad is placed back in its original position and the surgical site is closed. Hormones may also be administered to the rodents to support the growth of the tumors. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Tumor and body weights are measured and recorded 2-3 times weekly.
- Mean tumor weights of all groups over days post inoculation are graphed for comparison. An F-test is preformed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group.
- Tumor measurements may be recorded after dosing has stopped to monitor tumor growth delay. Tumor growth delays are expressed as the difference in the median time for the treated and control groups to attain a predetermined size divided by the median time for the control group to attain that size. Growth delays are compared by generating Kaplan-Meier curves from the times for individual tumors to attain the evaluation size. Significance is $p \text{ value} \leq 0.05$ compared to the vehicle control group. In addition, this model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ, or measuring the target organ weight. The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

3.3.2. Intraprostatic Assay.

Tumor cells or fragments, of prostatic adenocarcinoma origin, are implanted directly into a surgically exposed dorsal lobe of the prostate in rodents. The prostate is externalized through an abdominal incision so that the tumor can be implanted specifically in the dorsal lobe while verifying that the implant does not enter the seminal vesicles. The successfully inoculated prostate is replaced in the abdomen and the incisions through the abdomen and skin are closed. Hormones may also be administered to the rodents to support the growth of the tumors. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. At a predetermined time, the experiment is terminated and the animal is dissected. The size of the primary tumor is measured in three dimensions using either a caliper or an ocular micrometer attached to a dissecting scope. An F-test is preformed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. This model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ (i.e., the lungs), or measuring the target organ weight (i.e., the regional lymph nodes). The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

25 3.3.3. Intrabronchial Assay

Tumor cells of pulmonary origin may be implanted intrabronchially by making an incision through the skin and exposing the trachea. The trachea is pierced with the beveled end of a 25 gauge needle and the tumor cells are inoculated into the main bronchus using a flat-ended 27 gauge needle with a 90° bend. Compounds are

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 118 -

administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. At a predetermined time, the experiment is terminated and the animal is dissected. The size of the primary tumor is measured in three dimensions using either a caliper or an ocular micrometer attached to a dissecting scope. An F-test is preformed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. This model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ (i.e., the contralateral lung), or measuring the target organ weight. The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

3.3.4. *Intracecal Assay*

Tumor cells of gastrointestinal origin may be implanted intracecally by making an abdominal incision through the skin and externalizing the intestine. Tumor cells are inoculated into the cecal wall without penetrating the lumen of the intestine using a 27 or 30 gauge needle. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. At a predetermined time, the experiment is terminated and the animal is dissected. The size of the primary tumor is measured in three dimensions using either a caliper or an ocular micrometer attached to a dissecting scope. An F-test is preformed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. This model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ (i.e., the liver), or measuring the target organ weight. The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test,

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 119 -

with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

4. Secondary (Metastatic) Antitumor Efficacy

5 **4.1. Spontaneous Metastasis**

Tumor cells are inoculated s.c. and the tumors allowed to grow to a predetermined range for spontaneous metastasis studies to the lung or liver. These primary tumors are then excised. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according 10 to a predetermined schedule which may include the period leading up to the excision of the primary tumor to evaluate therapies directed at inhibiting the early stages of tumor metastasis. Observations of morbidity and/or mortality are recorded daily. Body weights are measured and recorded twice weekly. Potential endpoints include survival time, numbers of visible foci per target organ, or target organ weight. When 15 survival time is used as the endpoint the other values are not determined. Survival data is used to generate Kaplan-Meier curves. Significance is $p \leq 0.05$ by a log-rank test compared to the control group in the experiment. The mean number of visible tumor foci, as determined under a dissecting microscope, and the mean target organ weights are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with 20 significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment for both of these endpoints.

4.2. Forced Metastasis

25 Tumor cells are injected into the tail vein, portal vein, or the left ventricle of the heart in experimental (forced) lung, liver, and bone metastasis studies, respectively. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Observations of morbidity and/or mortality are recorded daily. Body 30 weights are measured and recorded twice weekly. Potential endpoints include survival time, numbers of visible foci per target organ, or target organ weight. When

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 120 -

survival time is used as the endpoint the other values are not determined. Survival data is used to generate Kaplan-Meier curves. Significance is $p \leq 0.05$ by a log-rank test compared to the control group in the experiment. The mean number of visible tumor foci, as determined under a dissecting microscope, and the mean target organ weights are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance at $p \leq 0.05$ compared to the vehicle control group in the experiment for both endpoints.

EXAMPLE 19

10 *Screening for G_i -, G_S -, and G_q - coupled receptors*

15 G_i -coupled receptors. Cells are stably transfected with the relevant receptor and with an inducible CRE-luciferase construct. Cells are grown in 50% Dulbecco's modified Eagle medium / 50% F12 (DMEM/F12) supplemented with 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere with 10% CO₂ and are routinely split at a ratio of 1:10 every 2 or 3 days. Test cultures are seeded into 384 – well plates at an appropriate density (e.g. 2000 cells / well in 35 µl cell culture medium) in DMEM/F12 with FBS, and are grown for 48 hours (range: ~ 24 - 60 hours, depending on cell line). Growth medium is then exchanged against serum free medium (SFM; e.g. Ultra-CHO), containing 0.1% BSA.

20 Test compounds dissolved in DMSO are diluted in SFM and transferred to the test cultures (maximal final concentration 10 µmolar), followed by addition of forskolin (~1 µmolar, final conc.) in SFM + 0.1% BSA 10 minutes later. In case of antagonist screening both, an appropriate concentration of agonist, and forskolin are added. The plates are incubated at 37°C in 10% CO₂ for 3 hours. Then the supernatant is removed, cells are lysed with lysis reagent (25 mmolar phosphate-buffer, pH 7.8 , containing 2 mmolar DDT, 10% glycerol and 3% Triton X100).

The luciferase reaction is started by addition of substrate-buffer (e.g. luciferase assay reagent, Promega) and luminescence is immediately determined (e.g. Berthold luminometer or Hamamatsu camera system).

- 5 G_s-coupled receptors. Cells are stably transfected with the relevant receptor and with an inducible CRE-luciferase construct. Cells are grown in 50% Dulbecco's modified Eagle medium / 50% F12 (DMEM/F12) supplemented with 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere with 10% CO₂ and are routinely split at a ratio of 1:10 every 2 or 3 days. Test cultures are seeded into 384 – well plates at an appropriate density (e.g. 1000 or 2000 cells / well in 35 µl cell culture medium) in DMEM/F12 with FBS, and are grown for 48 hours (range: ~24 - 60 hours, depending on cell line). The assay is started by addition of test-compounds in serum free medium (SFM; e.g. Ultra-CHO) containing 0.1% BSA.
- 10 Test compounds are dissolved in DMSO, diluted in SFM and transferred to the test cultures (maximal final concentration 10 µmolar, DMSO conc. < 0,6 %). In case of antagonist screening an appropriate concentration of agonist is added 5 – 10 minutes later. The plates are incubated at 37°C in 10% CO₂ for 3 hours. Then the cells are lysed with 10 µl lysis reagent per well (25 mmolar phosphate-buffer, pH 7,8 ,
- 20 containing 2 mmolar DDT, 10% glycerol and 3% Triton X100).

The luciferase reaction is started by addition of 20 µl substrate-buffer per well (e.g. luciferase assay reagent, Promega). Measurement of luminescence is started immediately (e.g. Berthold luminometer or Hamamatsu camera system).

- 25 G_q-coupled receptors. Cells are stably transfected with the relevant receptor. Cells expressing functional receptor protein are grown in 50% Dulbecco's modified Eagle medium / 50% F12 (DMEM/F12) supplemented with 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and are routinely split at a cell line dependent ratio every 3 or 4 days. Test cultures are seeded into 384 – well plates at an

appropriate density (e.g. 2000 cells / well in 35 µl cell culture medium) in DMEM/F12 with FBS, and are grown for 48 hours (range: ~ 24 - 60 hours, depending on cell line). Growth medium is then exchanged against physiological salt solution (e.g. Tyrode solution).

5

Test compounds dissolved in DMSO are diluted in Tyrode solution containing 0.1% BSA and transferred to the test cultures (maximal final concentration 10 µmolar). After addition of the receptor specific agonist the resulting Gq-mediated intracellular calcium increase is measured using appropriate read-out systems (e.g. calcium-sensitive dyes).

10

EXAMPLE 20*Promoter assay*

15

A promoter assay is set up with a human hepatocellular carcinoma cell HepG2 that was stably transfected with a luciferase gene under the control of a serotonin-regulated promoter. The vector 2xIROLuc, which is used for transfection, carries a serotonin responsive element of two 12 bp inverted palindromes separated by an 8 bp spacer in front of a tk minimal promoter and the luciferase gene.

20

Test cultures are seeded in 96 well plates in serum - free Eagle's Minimal Essential Medium supplemented with glutamine, tricine, sodium pyruvate, non -- essential amino acids, insulin, selen, transferrin, and are cultivated in a humidified atmosphere at 10 % CO₂ at 37°C. After 48 hours of incubation, serial dilutions of test compounds or reference compounds and costimulator if appropriate (final concentration 1 nM) are added to the cell cultures and incubation is continued for the optimal time (e.g. another 4-72 hours). The cells are then lysed by addition of buffer containing Triton X100 and luciferin and the luminescence of luciferase induced by test or reference compounds is measured in a luminometer. For each concentration of a test compound

25

replicates of 4 are tested. EC₅₀ – values for each test compound are calculated by use of the Graph Pad Prism Scientific software.

EXAMPLE 21

5 *Expression profiling*

Total cellular RNA was isolated from cells by one of two standard methods: (1) guanidine isothiocyanate/Cesium chloride density gradient centrifugation or (2) the Tri-Reagent protocol according to the manufacturer's specifications (Molecular 10 Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). Total RNA prepared by the Tri-reagent protocol was treated with DNase I to remove genomic DNA contamination. RNA was prepared from the following sources: coronary smooth muscle cells, brain, testis, pancreas, stomach, cerebellum, trachea, adrenal gland, skeletal muscle, salivary gland, small intestine, prostate, fetal liver, placenta, fetal brain, uterus, 15 mammary gland, heart, spleen, lung, HeLa cells, liver, kidney, thymus, bone marrow, thyroid, colon, bladder, spinal cord, peripheral blood, liver cirrhosis, pancreas liver cirrhosis, spleen liver cirrhosis, total Alzheimer brain, fetal lung, breast tumor, colon tumor, lung tumor, HEK 293 cells, adipose, pericardium, fetal heart, thyroid tumor, MDA MB 231 cells, HEP G2 cells, HUVEC cells, fetal kidney, breast, Jurkat T- 20 cells, Alzheimer brain cortex, cervix, esophagus, thalamus, precentral gyrus, hippocampus, occipital lobe, cerebral peduncles, postcentral gyrus, temporal lobe, parietal lobe, cerebellum (right), cerebellum (left), tonsilla cerebelli, cerebral meninges, pons, frontal lobe, cerebral cortex, corpus callosum, vermis cerebelli, Alzheimer brain frontal lobe, interventricular septum, heart atrium (right), heart 25 atrium (left), heart ventricle (left), skin, ileum chronic inflammation, erythrocytes, aorta, lung COPD, aorta sclerotic, prostate BPH, rectum, retina, penis, artery, vein, lymph node, dorsal root ganglia, corpus cavernosum, and thrombocytes.

For relative quantitation of the mRNA distribution of serotonin-like GPCR, total 30 RNA from each cell or tissue source was first reverse transcribed. Eighty-five µg of

total RNA was reverse transcribed using 1 μ mole random hexamer primers, 0.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Qiagen, Hilden, Germany), 3000 U RnaseQut (Invitrogen, Groningen, Netherlands) in a final volume of 680 μ l. The first strand synthesis buffer and Omniscript (2 U/ μ l) reverse transcriptase were from 5 (Qiagen, Hilden, Germany). The reaction was incubated at 37 °C for 90 minutes and cooled on ice. The volume was adjusted to 6800 μ l with water, yielding a final concentration of 12.5 ng/ μ l of starting RNA.

For relative quantitation of the distribution of serotonin-like GPCR mRNA in cells 10 and tissues the Perkin Elmer ABI Prism® 7700 Sequence Detection system or Biorad iCycler was used according to the manufacturer's specifications and protocols. PCR reactions were set up to quantitate X and the housekeeping genes HPRT, GAPDH, beta-actin, and others. Forward and reverse primers and probe for the serotonin-like GPCR were designed using the Perkin Elmer ABI Primer Express™. 15 software and were synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany). The X forward primer sequence was: GTCCTTCACCGCCATTGTG (SEQ ID NO: 5). The X reverse primer sequence was TGCACACCTACCTGGCAGTCATCCA (SEQ ID NO:6). The fluorogenic probe, labeled with FAM as the reporter dye and TAMRA as the quencher, is AAGGAGAGGTAGCGCAGTGG (SEQ ID NO: 7).

20 The following reactions in a final volume of 25 μ l were set up: 1X TaqMan buffer A, 5.5 mM MgCl₂, 200 nM each of dATP, dCTP, dGTP, and dUTP, 0.025 U/ μ l AmpliTaq Gold™, 0.01 U/ μ l AmpErase UNG® and probe 1X, serotonin-like GPCR forward and reverse primers each at 200 nM, 200 nM serotonin-like GPCR 25 FAM/TAMRA-labeled probe, and 5 μ l of template cDNA. Thermal cycling parameters were 2 min HOLD at 50 °C, 10 min HOLD at 95 °C, followed by melting at 95 °C for 15 sec and annealing/extending at 60 °C for 1 min for each of 40 cycles.

Calculation of corrected CT values

The CT-value is calculated as described above. The CF-value is calculated as followed :

5

1. PCR reactions were set up to quantitate the housekeeping genes (HKG) for each cDNA sample.
2. CT_{HKG} -values were calculated as described above
3. CT-mean values of all HKG for each cDNA are calculated ($n = \text{number of HKG}$):
$$(CT_{HKG1}-\text{value} + CT_{HKG2}-\text{value} + CT_{HKG-X}-\text{value}) / n = CT_{cDNA-X}\text{-mean values}$$
$$(n = \text{number of HKG})$$
4. $(CT_{cDNA-1}\text{-mean value} + CT_{cDNA-X}\text{-mean value}) / y = CT_{panel}\text{-mean value}$
(y = number of cDNAs)
- 15 5. $CT_{panel}\text{-mean value} - CT_{cDNA-X}\text{-mean value} = CF_{cDNA-X}$
6. $CT_{cDNA-X} + CF_{cDNA-X} = CT_{cor-cDNA-X}$

Calculation of relative expression

20 Definition : highest $CT_{cor-cDNA-X} \neq 40$ is defined as $CT_{cor-cDNA-X}$ [high]

$$\text{Relative Expression} = 2e(CT_{cor-cDNA-X} \text{ [high]} - CT_{cor-cDNA-Y})$$

25 The results are shown in Figs. 11-13. The human serotonin-like GPCR is expressed in different human tissues. Serotonin-like GPCR mRNA is highly expressed in cerebellum, postcentral gyrus, dorsal root ganglia, erythrocyte, lung COPD, esophagus, ileum chronic inflammation, prostate BPH, and penis.

30 Serotonin-like GPCR mRNA is highly expressed in different brain tissues as cerebellum, postcentral gyrus and dorsal root ganglia. The expression in the above

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 126 -

mentioned tissues suggests an association between the human serotonin-like GPCR and peripheral and central nervous system diseases.

5 Serotonin-like GPCR mRNA is highly expressed in prostate BPH and penis. The expression in the above mentioned tissues suggests an association the human serotonin-like GPCR and genito-urinary diseases.

10 Serotonin-like GPCR mRNA is highly expressed in lung COPD. The expression in the above mentioned tissues suggests an association between the human serotonin-like GPCR and respiratory diseases.

15 Serotonin-like GPCR mRNA is highly expressed in erythrocytes. The expression in the above mentioned tissues suggests an association between the human serotonin-like GPCR and hematological diseases.

15

EXAMPLE 22

Measurement of rhythmic isovolumetric bladder contraction in anesthetized rats

(1) Animals

20 Female Sprague-Dawley rats (200~250 g / Charles River Japan) are used.

(2) Catheter implantation

Rats are anesthetized by intraperitoneal administration of urethane (Sigma) at 1.25 g/kg. The abdomen is opened through a midline incision, and a polyethylene catheter (BECTON DICKINSON, PE50) is implanted into the bladder through the dome. In 25 parallel, the inguinal region is incised, and a polyethylene catheter (BECTON DICKINSON, PE50) filled with saline (Otsuka) is inserted into a femoral vein.

(3) Investigation of bladder contraction

The bladder is filled via the catheter by incremental volume of saline until spontaneous bladder contractions occurred. The intravesical pressure is measured a 30 pressure transducer and displayed continuously on a chart recorder. The activity of

test compounds is assessed after intravenous administration through a polyethylene cannula inserted into the femoral vein.

Measurement of bladder cystometry in conscious rats

5

(1) Animals

Female Sprague-Dawley rats (200~250 g / Charles River Japan) are used.

(2) Catheter implantation

Rats are anesthetized by intramuscular administration of ketamine (75 mg/kg) and 10 xylazine (15 mg/kg). The abdomen is opened through a midline incision, and a polyethylene catheter (BECTON DICKINSON, PE50) is implanted into the bladder through the dome. The catheter is tunneled through subcutis of the animal by needle (14G) to neck. In parallel, the inguinal region is incised, and a polyethylene catheter (BECTON DICKINSON, PE50) filled with saline (Otsuka) is inserted into a femoral 15 vein. The catheter is tunneled through subcutis of the animal by needle to neck.

(3) Cystometric investigation

The bladder catheter is connected via T-tube to a pressure transducer (Viggo-Spectramed Pte Ltd, DT-XXAD) and a microinjection pump (TERUMO). Saline is infused at room temperature into the bladder at a rate of 10 ml/hr. Intravesical 20 pressure is recorded continuously on a chart pen recorder (Yokogawa). At least three reproducible micturition cycles are recorded before a test compound administration.

(4) Administration of test compounds

A testing compound dissolved in the mixture of ethanol, Tween 80 (ICN Biomedicals Inc.) and saline (1 : 1 : 8, v/v/v) is administered intravenously through 25 the catheter.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 128 -

REFERENCES

1. Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT1D alpha and 5-HT1D beta. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Apr 15;89(8):3630-4
2. Cloning and expression of the human 5-HT1B-type receptor gene. Biochem Biophys Res Commun 1992 Jun 15;185(2):517-23
3. Molecular cloning of a human serotonin receptor (S12) with a pharmacological profile resembling that of the 5-HT1D subtype. J Biol Chem 1992 Apr 15;267(11):7553-62
4. Human serotonin1B receptor expression in SF9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. Biochemistry 1993 Nov 2;32(43):11727-33

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide being selected from the group consisting of:
 - a) a polynucleotide encoding a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

5 amino acid sequences which are at least about 27% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.
 - b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
 - c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b) and encodes a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide;
 - 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 encodes a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide; and
 - e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d) and encodes a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide.
2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
3. A host cell containing the expression vector of claim 2.
4. A substantially purified serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.
5. A method for producing a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide, wherein the method comprises the following steps:

25

30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 130 -

- a) culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide; and
 - b) recovering the serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide from the host cell culture.
- 5
- 6. A method for detection of a polynucleotide encoding a serotonin-like G protein-coupled 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
 - b) detecting said hybridization complex.
- 10
- 7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.
- 15
- 8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide of claim 4 comprising the steps of:
 - contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide or the serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide.
- 20
- 9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claims 6 to 8.
- 25
- 10. A method of screening for agents which decrease the activity of a serotonin-like G protein-coupled receptor, comprising the steps of:
 - contacting a test compound with any serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;
 - detecting binding of the test compound to the serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide, wherein a test compound which binds to the
- 30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 131 -

polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of a serotonin-like G protein-coupled receptor.

11. A method of screening for agents which regulate the activity of a serotonin-like G protein-coupled receptor, comprising the steps of:
 - 5 contacting a test compound with a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and
 - detecting a serotonin-like G protein-coupled receptor activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the serotonin-like G protein-coupled receptor activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the serotonin-like G protein-coupled receptor, and wherein a test compound which decreases the serotonin-like G protein-coupled receptor activity of the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of the serotonin-like G protein-coupled receptor.
- 10
- 15
12. A method of screening for agents which decrease the activity of a serotonin-like G protein-coupled receptor, comprising the steps of:
 - 20 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 serotonin-like G protein-coupled receptor.
- 25
13. A method of reducing the activity of serotonin-like G protein-coupled receptor, comprising the steps of:
 - 30 contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 or any serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide of claim 4, whereby the activity of serotonin-like G protein-coupled receptor is reduced.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 132 -

14. A reagent that modulates the activity of a serotonin-like G protein-coupled receptor polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.
- 5 15. A pharmaceutical composition, comprising:
the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 10 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 serotonin-like G protein-coupled receptor in a disease.
- 15 17. Use of claim 16 wherein the disease is COPD, a cardiovascular disorder, cancer, a urinary disorder, obesity, diabetes, a CNS disorder, asthma, or a hematological disorder.
- 20 18. A cDNA encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
20. 19. The cDNA of claim 18 which comprises SEQ ID NO:1.
21. 20. The cDNA of claim 18 which consists of SEQ ID NO:1.
- 25 21. An expression vector comprising a polynucleotide which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
22. 25. The expression vector of claim 21 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO:1.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 133 -

23. A host cell comprising an expression vector which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
24. The host cell of claim 23 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO:1.
5
25. A purified polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
- 10 26. The purified polypeptide of claim 25 which consists of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
27. A fusion protein comprising a polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
15
28. A method of producing a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising the steps of:
culturing a host cell comprising an expression vector which encodes the polypeptide under conditions whereby the polypeptide is expressed; and
isolating the polypeptide.
20
29. The method of claim 28 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO:1.
- 25 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:
hybridizing a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 to nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
detecting the hybridization complex.
30

31. The method of claim 30 further comprising the step of amplifying the nucleic acid material before the step of hybridizing.
- 5 32. A kit for detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising:
a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1; and
instructions for the method of claim 30.
- 10 33. A method of detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising the steps of:
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.
- 15 34. The method of claim 33 wherein the reagent is an antibody.
35. A kit for detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising:
20 an antibody which specifically binds to the polypeptide; and
instructions for the method of claim 33.
- 25 36. A method of screening for agents which can modulate the activity of a human serotonin-like G protein-coupled 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 27% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; 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 serotonin-like G protein-coupled receptor.

- 5 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*.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 45. A method of screening for agents which modulate an activity of a human serotonin-like G protein-coupled 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 27% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; and
- 30

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 136 -

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 serotonin-like G protein-coupled 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 serotonin-like G protein-coupled receptor.

- 5 46. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell.
- 10 47. The method of claim 45 wherein the cell is *in vitro*.
- 15 48. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
- 20 49. A method of screening for agents which modulate an activity of a human serotonin-like G protein-coupled receptor, comprising the steps of:
contacting a test compound with a product encoded by a polynucleotide which comprises the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; 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 serotonin-like G protein-coupled receptor.
- 25 50. The method of claim 49 wherein the product is a polypeptide.
51. The method of claim 49 wherein the product is RNA.
52. A method of reducing activity of a human serotonin-like G protein-coupled 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 NO:1, whereby the activity of a human serotonin-like G protein-coupled receptor is reduced.

5

53. The method of claim 52 wherein the product is a polypeptide.
54. The method of claim 53 wherein the reagent is an antibody.
- 10 55. The method of claim 52 wherein the product is RNA.
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*.
- 20 60. A pharmaceutical composition, comprising:
a reagent which specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; and
a pharmaceutically acceptable carrier.
- 25 61. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein the reagent is an antibody.
62. A pharmaceutical composition, comprising:
a reagent which specifically binds to a product of a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; and
- 30

a pharmaceutically acceptable carrier.

63. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is a
ribozyme.
5
64. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an
antisense oligonucleotide.
65. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an
10 antibody.
66. A pharmaceutical composition, comprising:
an expression vector encoding a polypeptide comprising the amino acid
sequence shown in SEQ ID NO:2; and
15 a pharmaceutically acceptable carrier.
67. The pharmaceutical composition of claim 66 wherein the expression vector
comprises SEQ ID NO:1.
- 20 68. A method of treating a serotonin-like G protein-coupled receptor dysfunction
related disease, wherein the disease is selected from COPD, a cardiovascular
disorder, cancer, a urinary disorder, obesity, diabetes, a CNS disorder,
asthma, or a hematological disorder comprising the step of:
administering to a patient in need thereof a therapeutically effective dose of a
25 reagent that modulates a function of a human serotonin-like G protein-
coupled receptor, whereby symptoms of the serotonin-like G protein-coupled
receptor dysfunction related disease are ameliorated.
69. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of
30 claim 36.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 139 -

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

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

Fig. 1

atggggatg agctggcacc ttggccctgtg ggcaactacag ctggggggc cotgatccaa
 ctcatcaaca agacaccctg catucccaa ycagecaagca acacttcc ggccttggg
 gacctcagg tgcccagetic cagtcgttac tggctttcc ttccctcaag cctgttgtgg
 gacgcacac tggctgtcg ccacctgtg ctgtgtacca ccaacgcgtg
 cgacaggagc cccacatact getccccgtt acacatccitgc tcitcaagacctt ggccttacatt
 ctccatccaa tgctcatcic ctccaggcgtt gggacttggg ccgcattggg
 tggtggattc tcaactgaing tggcttccgc ggcctgtacca gcaaccatcc
 gccatgtgc tgcacacca ccggcgtc atccatccac tggcttaccc tcccttcatg
 tccccagggg otgcctgtaa ggagatggcc ctcatctgg tggtggccctg ctgtttcc
 acattcccta ttgtgtcaag caagtggcg gatgtcccg
 tacatccatc caccaaatcg gggcaccccg ccggatgtt ggccttctgg
 tacatccca ttctgtgttgc tggatgttccgc tcacatgttcc
 aggatctatgt cagatggccaa gacttccaggc atctggggc agggatatttccggcagg
 ggcacccatgc tgatccactc agtgcgtatc acatgttacg tggtgttgc
 tccctggaca tggtgctgac caatgttccac cactatgtact
 ctggcageta acatgttacgt accatgtatg ctteccctgtg ctagtgc
 ctgtctccgtt accggcgttccgtt ctagtgc
 caggccatctt traccatttc **cttag**

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 2/16 -

Fig. 2

MGDELAPCPV GTIAMPALIQ LISSKPCMPQ AASNTSLGLG DLRVPSMMLY WLFLPSSLIA
ATLAVSEPI IVTILRNORI ROEPhYLPA NIIISDIALYI LIIHMTSSSS LGGWELGRMA
CGILTDAFTA ACTSTILLSPF AIVHTYLAV IHPRLYSFM SHGAIAKAVA LIWIVCCFP
TELIWLSKWO DAQLEQQAS YILPEPMGTO PGCGULIVIT YTSILCYLEL CTALIANCFW
RIYAEEAKUSG TWCGYSSRAR GTLLLHSVLT TLYYSTGVVF SLDWVLTRYH HIDSGTHWL
LAANSEVLMN LPRAMILPLY LIRYRQLGM VRGHLPSSRH QAITFIS

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 3/16 -

Fig. 3

MEEPGAOQCAP PPPAGSETWV POANLSSAPS QNCSDAKDITY ODSISLPWKV LLVMMIALLIT
LATFLSNAY LAVTRTRKL HTPANYLAS LAVTDLVSI IMPLISTMYT VTGRWEIGQV
YCDUFLSSDI TCCUTASILHL CVIDALDRWA ITDAVEYSAK EUPKRAAVMI ALWVWFESI
SLIPPFMROA KAEFEEVSECV VNTDHILYT VSTVGFYFP TLLIJALYGR TYEARSRL
KOOPENRTERER LTRACCLITDS PGSESVTSI NSRPDVSE SGSPVYNNOV KVRSDALE
KKKLMAARER KATATIGIL GAFIVCWLPE FISLSLYMPIC KDACWFHAI EDEFTWIGYL
NSLNLNPLIXT MSNEFQAF HKLRFKCIS

Fig. 4

tgacaagaacc agccatccct gcccggaaagc **at**ggggatg agctggcacc ttggccctgtg
 ggcactacatg ctggccggc cctatccatg
 ctcatacgca agacaccctcg catggccaa gcacccggcc
 gacctcaagg tgcccaagtc catctgtac tggtttcc tccctcaag cctgtcggt
 gcaaggcacac tyggtaag cccctgtcg cccctgtcg
 cgacaggagc ccaactacatc gtcggccgt aacatctgc tctcgact
 ctccatccaa tgcgtatcc tcacagcgc ctgggtggc tggtttgg
 tggtggcc tcactgtac tgccatccaa gtcgttcc
 gccattgtgc tgcaacatca cctcgactc atccatccac tgctgtatcc
 tcccatgggg ctgcctggaa ggccgtggcc ctcaatggc tggtggccctg
 acattccat tttggctcg caatggcag gatggccagg tgadggaca
 tacatctac cacaagcat gggacccag ccggatgtg gcctcttgt
 tacaccatca ttgttgtgt tctgttccs tgcaacatgc tcattggccaa cgttttgt
 aggatctatg caggggccaa gacttcaggc atctggggc aggccattc
 gggaccctgc tgatccactc agtctgtacg acatgttacg tgageacagg
 tccctggaca tggtgtgac cggfaccac cacaatgtacta cacaatgtc
 ctggcggcta acatgggtt actatgtatg ctcccccgtg ccatgttcc
 ctgctccgtt acggcgtt gtggccatg gtcggggcc acctccatc
 caggccatc ttacatttc **c**taggttct ttagtccaca gttctggcaag ctga

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 5/16 -

Fig. 5

BLASTP - alignment of 414 against swiss|P28222|5H1B_HUMAN5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B) (SEROTONIN RECEPTOR)

(5-HT-1D-BETA) (S12).//:trembl|AB041370|AB041370_1 gene: "HTR1B";
 Homo sapiens HTR1B gene for 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B,
 complete cds.//:trembl|AB041377|AB041377_1 gene: "HTR1D";
 Homo sapiens HTR1D gene for 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D,
 complete cds.//:trembl|D10995|HSHGCR_1 gene: "HGCR1";
 Human gene for serotonin 1B receptor, complete cds.//:trembl|M75128|HSHTRE_1
 gene: "HTR1D"; Human serotonin 1Db receptor (HTR1D) gene, complete cds.
 //:trembl|M83180|HSHTRA_1 Human serotonin receptor gene, complete cds.
 //:trembl|L09732|HSHTRDIA_1 Homo sapiens 5-hydroxytryptamine 1D receptor
 gene, complete cds.//:trembl|AU049595|HSJ501M23_1 gene: "HTR1B";
 Human DNA sequence from clone 501M23 on chromosome 6q13-14.3 Contains HTR1B
 (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B gene), ESTs, CA repeat, STS and a
 CpG island //:trembl|M81590|HSSENIDRB_1 gene: "5-HT1D~"; Homo sapiens
 serotonin 1D receptor (5-HT1D~) mRNA, complete cds.
 //:trembl|AB041371|AB041371_1 gene: "HTR1B"; Pan troglodytes HTR1B gene for 5-
 hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B, complete cds.
 //:trembl|AB041378|AB041378_1 gene: "HTR1D"; Pan troglodytes HTR1D gene for

- 6/16 -

Fig. 5 (continued)

5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D, complete cds.
 //:gp|AB041370|7592949 gene: "HTR1B"; Homo sapiens HTR1B gene for 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B, complete cds.
 //:gp|AB041371|7592931 gene: "HTR1B"; Pan troglodytes HTR1B gene for 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B, complete cds. //:gp|AB041377|7592944 gene: "HTR1D"; Homo sapiens HTR1D gene for 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D, complete cds. //:gp|AB041378|7592946 gene: "HTR1D"; Pan troglodytes HTR1D gene for 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D, complete cds.
 //:gp|AL049595|5629918 gene: "HTR1B"; Human DNA sequence from clone 501M23 on chromosome 6q13-14.3 Contains HTR1B(5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B gene), ESTs, CA repeat, STS and a CPG island, complete sequence.//:rp|D10935|219679 gene: "IGCR1"; Human gene for serotonin 1B receptor, complete cds. //:gp|M5128|184460 gene: "HTR1D"; Human serotonin 1Db receptor (HTR1D) gene, complete cds. //:gp|M83180|184464 product: "serotonin receptor"; Human serotonin receptor gene, complete cds. //:gp|L09732|184468 product: "5-hydroxytryptamine 1D receptor"; Homo sapiens 5-hydroxytryptamine 1D receptor gene, complete cds.//:gp|M81590|338026 gene: "5-HT1D"; Homo sapiens serotonin 1D receptor (5-HT1D-) mRNA, complete cds.

This hit is scoring at : 5e-12 (expectation value)

Alignment length (overlap) : 272

Identities : 26 %

Scoring matrix : BLOSUM62 (used to infer consensus pattern)

Database searched : nrdb_1;

Fig. 5 (continued)

Q: 7 PCPVGTAWPALIQLISKTPCMQAAASNTSLIGDILRVSSMLYWLFPSLAAATIAV
 P. P. G.: .W . .L S A. S . . . : .S .J W .J .JIA. TIA.
 H: 11 PPPAGSETWVQANLSS-----APSQNCSAKDYYQDSISLPPKVLVNMLLAATIA
 S---PLILYLTILRNQRQEPEPHYLIPANILLSDAYILLHMLISS--SSLGGWELGRMAC
 : . . . : T: R . . L . . . : YL: A: . . : DL: . : L M IS: . : G W. I.G.: .C
 TISNAFVIAVYRTRFLHTPANYLI-ASLAVTDLVSILVMPISMNTVTERWTLGIVVC
 GLIDDAVEFACTSTLISFTAVLHTLYTAVIRPLRLSFMSHGAAMKAVALTWL--VACCF
 . . . : . . . : CT: : IL . . . : I . . . : Y A: . . . : V : . . : A . : AL W: . . . :
 DEWLSSDTICCTASILHLCVTAIDRWAITDAVEYSAKTPKRAAVMIALWVFSTISL
 PTFLIWLSKWQDAQLEEQGASTYLPPSMGTOPGGLVVVTYTSILCVLFCLCTALANCE
 P.F. W: A: FE: . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . :
 PPTF: ---WRQAKAEEEVSECVNNDH-----ILTVYSSVGAFYPTLILTY
 WRITYAEAKUSGIMGOQYSRARGTLLHSVLIT
 RIV.EA: S I Q :P. G. L : LIT
 GRIYVEAR-SRILKQTPNRT-GKRLLQALIT 271
 258

Fig. 6

RHMPFAM - alignment of 414 against pfam|hmm|7tm_17 transmembrane receptor (rhodopsin family)

This hit is scoring at : 31.6

Scoring matrix : BloSUM62 (used to infer consensus pattern)

Q:	69	LIVVITRNRQEPHYLIPANILSPDIAVTLJHMLISSSTGG---WFLGRMAGGTLL
	L:::ILR:::LR:::...:	N:::DL:::L::: .:: L G W..G..C ::
H:	4	LVLVILRKKLRTPTNRFI.INLAVALFLFLTPPWALYYLVGSedWFGSarICKLV
		TDAVFAACTSTILSFPAIVLHTYLAVTHPLRLYSFMS-HGAAMKAVALIMLVACCFPTFL
		T::IL .TAI . . . YLA .:HPLRYAL.W.:A.
		taldvnnmyasilltaISIDYLYAVtPlryrrrtsprrAkvvlllvWiallls1Pp
		IWLSKWQDAQLEEQ---GASYTLPSSMGTOPGCG---LIVIVTYTSILCYLFELCTIAN
		: .S::::LS.L. . .LI.
		llfswvktveeqngtlvnvntvClidpeestasvstwrsyvllstlvglFilpllivlv
		CFWRIYAEAKtsqiwqggsrargtllihsVLTLYVSTGVVF
C: RI.:		280
CYTFLIR.....:		... TL.V . V.
	kaaklllvvvvvEv 206

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 9/16 -

Fig. 7

GENSCAN 1.0 Date run: 24-Jan-101 Time: 09:08:50
Sequence AC060810 : 159288 bp : 44.22% C+G : Isochore 2 (43 - 51 C+G%)
Parameter matrix: HumanIso.smat
predicted genes/exons:Gn.Ex Type S .Begin ...End .Len Fr Ph I/Ac Do/T CodRg
P... "scr..

4.00	Ptcom	+	71395	71434	40							-6.66
4.01	Sngl	+	78075	79118	1044	2	0	94	40	1004	0.994	91.35
4.02	P1ya	+	79642	79647	6							1.05

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 10/16 -

8

WO 02/059302

PCT/EP02/90549

- 11/16 -

Fig. 8 (continued)

ctgtccgctacccggcagctgtggcatggccatcccattccaggaggcac
caggccatcttaccatttcata

A BLAST[®] search against the nrdb SNP database identified single nucleotide polymorphisms for #414. SNP sequence, SNP:1275729_867778, cover the range from 924 to 954 bp, which is located on transmembrane helix 7. This is a nonconservative SNP in which Proline is changed to Threonine.

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 12/16 -

Fig. 9

BLASTN - alignment of 414_DNA against SNP:1275729_867778SNP:OVLP-000621-121708
 NR:2 >SNP:1942595_867780 SNP:OVLP-000804-412068 NR:2
 >SNP:384138 867782 SNP:OVLP-000925-720069 NR:2

This hit is scoring at : 7e-18 (expectation value)
Alignment length (overlap) : 51
Identities : 98 %

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

- 13/16 -

Fig. 10

MGDELAPCPV GTPAMPALIQ LISKEPCMPQ AASNTSLGLG DLRVPSSMLY WLFLPSSLLA AATLAYSPPLI
LYTILRNQBL RQEPHYLLPA NITISDIALYI LHMNLISSS IGGWEIGRMA

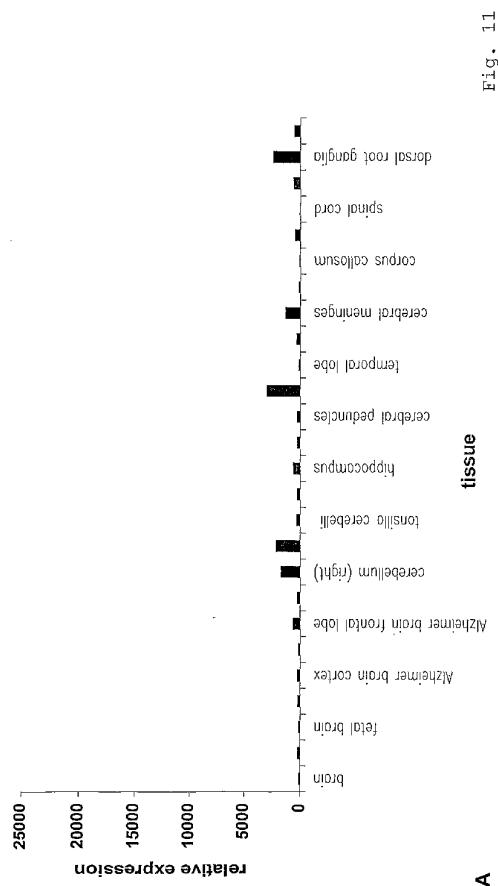
CGILTDAVFA ACTSTILSET AIVLHTYIAV IHPRLYISEM SHGAAWKAYA LIWIVACCP TEFLWLSKWQ
DAQLEEQGAS YILPPSMGTQ PGCGHLVIVT YTSLICVLFL CTALLANCFW

RIYAEEAKTSG TWGQQYSBAR GTLLIHSVLI TIVYSTGVVF SLDAVILTRYH RIDSGTHTWL LAANSFVLM

LPRAMILPLY LLRYRQLGM VRGHIPSRRH QAIIFTIS

WO 02/059302

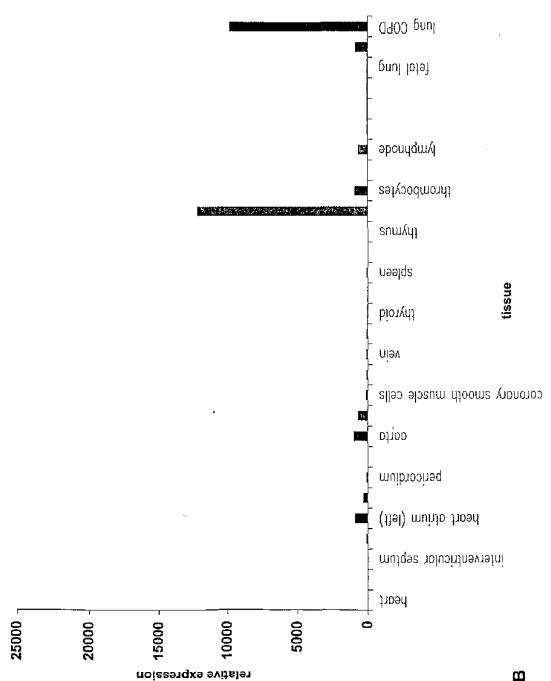
PCT/EP02/00540

-14/16-

A

-15/16-

Fig. 12

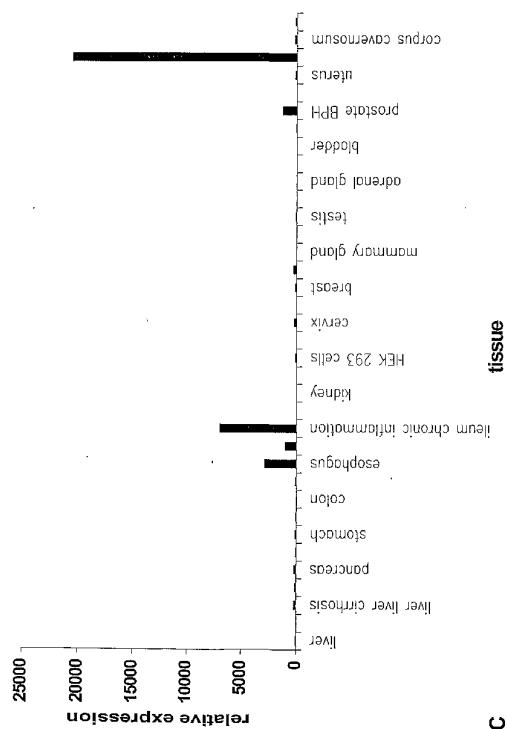


WO 02/059302

PCT/EP02/00540

-16/16-

Fig. 13



WO 02/059302

PCT/EP02/00540

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN SEROTONIN-LIKE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR

<130> LIO290 Foreign Countries

<150> US 60/264,071

<151> 2002-01-26

<150> US 60/324,054

<151> 2001-09-24

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1044

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
atggggatg agctggcacc ttgcctgtg ggcactacag cttggccggc cctgatccag 60
ctcatcagca agacacctg catgcoccaa gcagccagca acacttcatt gggactgggg 120

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

gacetcaggg tgcccaagtc catgctgtac tggctttcc ttccctcaag cctgtggct 180
 gcagccacac tggctgtcag ccccctgctg ctggtgacca tcctgcggaa ccaacggctg 240
 cgacaggagc cccactacat gctcccggt aacatctgc tctcagacct ggccctacatt 300
 ctccctccaca tgctcatctc ctccagcagc ctgggtggct gggagctggg ccgcattggcc 360
 tgtggcattc tcaatgtatgc tgccttcgccc gctgtcacca gcaaccatctt gtccttcacc 420
 gccattgtgc tgcacaccta cctggcagtc atccatccac tgcgtatccct ctccattcatg 480
 tccccatgggg ctgcctggaa ggcagtggcc ctcatctggc tggtggcctg ctgttcccc 540
 acattcccta ttggcttag caagtggcag gatgcccaagc tggaggagca aggagctca 600
 tacatccatc caccaagcat gggcaccagg ccgggatgtg ccctccctgt cattgttacc 660
 tacaccccca ttctgttgttctc tgcacagctc tcattgccaa ctgtttctgg 720
 aggatctatg cagaggccaa gacttcaggc atctggggc agggctatcc ccggccagg 780
 ggcacccctgc tgatccactc agtgctgatc acattgtacg tgagcacagg ggtgggttcc 840
 tccctggaca tggtgtgac cacattgact ctggactca cacatggctc 900
 ctggcagcta acagtggaggt actcatgtatc ctccccgtg ccattgtccc atacatgtac 960
 ctgctccgct accggcagct gttgggcatg gtccggggcc accctccatc caggaggcac 1020
 caggccatct ttaccatttc ctag 1044

<210> 2

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Gly	Asp	Glu	Lle	Ala	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Trp	Pro
1			5				10				15				

- 2 -

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

Ala Leu Ile Gln Leu Ile Ser Lys Thr Pro Cys Met Pro Gln Ala Ala
 20 25 30

Ser Asn Thr Ser Leu Gly Leu Gly Asp Leu Arg Val Pro Ser Ser Met
 35 40 45

Leu Tyr Trp Leu Phe Leu Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Ala Thr Leu
 50 55 60

Ala Val Ser Pro Leu Leu Leu Val Thr Ile Leu Arg Asn Gln Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Gln Glu Pro His Tyr Leu Leu Pro Ala Asn Ile Leu Leu Ser Asp
 85 90 95

Leu Ala Tyr Ile Leu Leu His Met Leu Ile Ser Ser Ser Leu Gly
 100 105 110

Gly Trp Glu Leu Gly Arg Met Ala Cys Gly Ile Leu Thr Asp Ala Val
 115 120 125

Phe Ala Ala Cys Thr Ser Thr Ile Leu Ser Phe Thr Ala Ile Val Leu
 130 135 140

His Thr Tyr Leu Ala Val Ile His Pro Leu Arg Tyr Leu Ser Phe Met
 145 150 155 160

Ser His Gly Ala Ala Trp Lys Ala Val Ala Leu Ile Trp Leu Val Ala
 165 170 175

Cys Cys Phe Pro Thr Phe Leu Ile Trp Leu Ser Lys Trp Gln Asp Ala
 180 185 190

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

Gln Leu Glu Glu Gln Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Pro Pro Ser Met Gly
195 200 205

Thr Gln Pro Gly Cys Gly Leu Leu Val Ile Val Thr Tyr Thr Ser Ile
210 215 220

Leu Cys Val Leu Phe Leu Cys Thr Ala Leu Ile Ala Asn Cys Phe Trp
225 230 235 240

Arg Ile Tyr Ala Glu Ala Lys Thr Ser Gly Ile Trp Gly Gln Gly Tyr
245 250 255

Ser Arg Ala Arg Gly Thr Leu Leu Ile His Ser Val Leu Ile Thr Leu
260 265 270

Tyr Val Ser Thr Gly Val Val Phe Ser Leu Asp Met Val Leu Thr Arg
275 280 285

Tyr His His Ile Asp Ser Gly Thr His Thr Trp Leu Leu Ala Ala Asn
290 295 300

Ser Glu Val Leu Met Met Leu Pro Arg Ala Met Leu Pro Tyr Leu Tyr
305 310 315 320

Leu Leu Arg Tyr Arg Gln Leu Leu Gly Met Val Arg Gly His Leu Pro
325 330 335

Ser Arg Arg His Gln Ala Ile Phe Thr Ile Ser
340 345

<210> 3

<211> 390

<212> PRT

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Glu Pro Gly Ala Gln Cys Ala Pro Pro Pro Pro Ala Gly Ser
1 5 10 15

Glu Thr Trp Val Pro Gln Ala Asn Leu Ser Ser Ala Pro Ser Gln Asn
20 25 30

Cys Ser Ala Lys Asp Tyr Ile Tyr Gln Asp Ser Ile Ser Leu Pro Trp
35 40 45

Lys Val Leu Leu Val Met Leu Leu Ala Leu Ile Thr Leu Ala Thr Thr
50 55 60

Leu Ser Asn Ala Phe Val Ile Ala Thr Val Tyr Arg Thr Arg Lys Leu
65 70 75 80

His Thr Pro Ala Asn Tyr Leu Ile Ala Ser Leu Ala Val Thr Asp Leu
85 90 95

Leu Val Ser Ile Leu Val Met Pro Ile Ser Thr Met Tyr Thr Val Thr
100 105 110

Gly Arg Trp Thr Leu Gly Gln Val Val Cys Asp Phe Trp Leu Ser Ser
115 120 125

Asp Ile Thr Cys Cys Thr Ala Ser Ile Leu His Leu Cys Val Ile Ala
130 135 140

Leu Asp Arg Tyr Trp Ala Ile Thr Asp Ala Val Glu Tyr Ser Ala Lys
145 150 155 160

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

Arg Thr Pro Lys Arg Ala Ala Val Met Ile Ala Leu Val Trp Val Phe
165 170 175

Ser Ile Ser Ile Ser Leu Pro Pro Phe Phe Trp Arg Gln Ala Lys Ala
180 185 190

Glu Glu Glu Val Ser Glu Cys Val Val Asn Thr Asp His Ile Leu Tyr
 195 200 205

Thr	Val	Tyr	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Tyr	Phe	Pro	Thr	Ieu	Ieu	Ieu
210					215						220				

Ile Ala Leu Tyr Gly Arg Ile Tyr Val Glu Ala Arg Ser Arg Ile Leu
 225 230 235 240

Lys Gln Thr Pro Asn Arg Thr Gly Lys Arg Leu Thr Arg Ala Gln Leu
245 250 255

Ile Thr Asp Ser Pro Gly Ser Thr Ser Ser Val Thr Ser Ile Asn Ser
260 265 270

Arg Val Pro Asp Val Pro Ser Glu Ser Gly Ser Pro Val Tyr Val Asn
275 280 285

Gln Val Lys Val Arg Val Ser Asp Ala Leu Leu Glu Lys Lys Lys Leu
290 295 300

Met Ala Ala Arg Glu Arg Lys Ala Thr Lys Thr Leu Gly Ile Ile Leu
 305 310 315 320

Gly Ala Phe Ile Val Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Ile Ser Leu Val
325 330 335

Met Pro Ile Cys Lys Asp Ala Cys Trp Phe His Leu Ala Ile Phe Asp
340 345 350

WO 02/059302

PCT/EP02/00540

Phe Phe Thr Trp Leu Gly Tyr Leu Asn Ser Leu Ile Asn Pro Ile Ile
 355 360 365

Tyr Thr Met Ser Asn Glu Asp Phe Lys Gln Ala Phe His Lys Leu Ile
 370 375 380

Arg Phe Lys Cys Thr Ser
 385 390

<210> 4

<211> 1104

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4	
tgacaaagcc agccatccct gccaggaagc atggggatg agctggcacc ttgcctgtg	60
ggcactacag cttggccggc cctgatccag ctcatcagea agacaccctg catgcccaa	120
gcagccagca acatccctt gggcctgggg gacctcaggg tgcccagctc catgtgtac	180
tggctttcc tccctcaag cctgtgtggc gcagccacac tggctgtcag cccctgtcg	240
ctggtgacca tcctgcggaa ccaacggctg cgacaggago cccactacct gctccggct	300
aacatcctgc tctcagacct ggoctacatt ctccctccaca tgctcatctc ctccagcagc	360
ctgggtggct gggagctggg ccgcattggcc tggcatcattt tcactgtatc tgtcttcggcc	420
gcctgcacca gcaccatctt gtccatttcacc gcatttgtc tgccacaccta cctggcagtc	480
atccatccac tgccgtacact ctccattatc tccatgggg ctgcctggaa ggcagtggcc	540
ctcatctggc tggtggccctg ctgtttcccc acatcttta tttggcttag caagtggcag	600
gatgcaccgc tggaggagca aggagcttca tacatctac caccaagcat gggcacccag	660

WO 02/059302	PCT/EP02/00540
cggggatgtg gcotccttgtt cattgttacc tacaccccca ttctgtgcgt tctgttcctc	720
tgcacagotc tcattgccaa ctgtttctgg aggatctatg cagaggccaa gacttcaggc	780
atctgggggc agggtatcc cggggccagg ggcaaccctgc tgatccactc agtgcgtgatc	840
acattgtacg tgagoacagg ggtgggttcc tccctggaca tggtgctgac caggtaaccac	900
cacattgact ctgggactca cacatggctc ctggcagctc acagtgggt actcatgtg	960
atccccctgt ccatgtccc atacctgtac ctgcgtcgat accggcagct gttgggcatt	1020
gtccggggcc acctccatc caggaggcac caggccatct ttaccatttc cttagttct	1080
tgagtccaca gtctggcaag ctga	1104

【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
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059302 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/12, 15/11, 15/62, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/68, G01N 33/50, 33/577, 33/68, A61K 31/711, 31/713, 38/12, 39/395

(21) International Application Number: PCT/EP02/00540

(22) International Filing Date: 21 January 2002 (21.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/264,071 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/324,054 24 September 2001 (24.09.2001) US

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

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): SMOLYAR, Alex [US/US]; 734 Boylston Street, Brookline, MA 02467 (US).

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

(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, ES, FI, GB, GD, GI, GH, GM, IIR, ITU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, L, 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.

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations: 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, ES, FI, GB, GD, GI, GH, GM, IIR, ITU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, L, 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), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, I.U, MC, NI, PT, SF, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:

6 March 2003

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 02/059302 A3

(54) Title: REGULATION OF HUMAN SEROTONIN-LIKE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR

(57) Abstract: Reagents which regulate human serotonin-like G protein-coupled receptor (5-HT-like GPCR) and reagents which bind to human 5-HT-like GPCR gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, COPD, cardiovascular disorders, cancer, urinary disorders, obesity, diabetes, CNS disorders, asthma, and hematological disorders.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		I nternational Application No. PCT/EP 02/00540									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/11 C12N15/62 C12N5/10 C07K14/705 C07K16/28 C1201/68 G01N33/50 G01N33/577 G01N33/68 A61K31/711 A61K31/713 A61K38/12 A61K39/395											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N A61K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBL, BIOSIS, MEDLINE											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; width: 15%;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>ZGOMBICK J M ET AL: "Molecular cloning and pharmacological characterization of guinea pig 5-HT-1B and 5-HT-1D receptors." NEUROPHARMACOLOGY, vol. 36, no. 4-5, 1997, pages 513-524, XP002222287 ISSN: 0028-3908 abstract; figure 1; table 1 --</td> <td>1-7, 10-12, 15-71</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5 691 155 A (NAHMIAS CLARA ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) Sequence according to Seq. ID No. 2 claims 12,14,17-19 --</td> <td>1-7, 10-12, 15-71 -/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	ZGOMBICK J M ET AL: "Molecular cloning and pharmacological characterization of guinea pig 5-HT-1B and 5-HT-1D receptors." NEUROPHARMACOLOGY, vol. 36, no. 4-5, 1997, pages 513-524, XP002222287 ISSN: 0028-3908 abstract; figure 1; table 1 --	1-7, 10-12, 15-71	X	US 5 691 155 A (NAHMIAS CLARA ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) Sequence according to Seq. ID No. 2 claims 12,14,17-19 --	1-7, 10-12, 15-71 -/-
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	ZGOMBICK J M ET AL: "Molecular cloning and pharmacological characterization of guinea pig 5-HT-1B and 5-HT-1D receptors." NEUROPHARMACOLOGY, vol. 36, no. 4-5, 1997, pages 513-524, XP002222287 ISSN: 0028-3908 abstract; figure 1; table 1 --	1-7, 10-12, 15-71									
X	US 5 691 155 A (NAHMIAS CLARA ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) Sequence according to Seq. ID No. 2 claims 12,14,17-19 --	1-7, 10-12, 15-71 -/-									
<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.									
<small>* Special categories of cited documents:</small> *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 *U* document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is needed to establish the priority of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report										
25 November 2002	20/12/2002										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5616 Patentlan 2 Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Griesinger, I										

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 02/00540
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Creation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online' BAC clone sequence, 29 September 1999 (1999-09-29) retrieved from EMBL Database accession no. AC010984 XP002222288 -----	1-7, 10-12, 15-71
X	DATABASE OMIM 'Online' HTRIDB, retrieved from OMIM Database accession no. OMIM: 182131 XP002222289 -----	1-7, 10-12, 15-71
P, X	WO 01 36471 A (ARENA PHARMACEUTICALS INC ;CHEN RUOPING (US); DANG HUONG T (US); L 25 May 2001 (2001-05-25) claims 73,75 -----	1-7, 10-12, 15-71

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

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/00540

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/EP 02 00540

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims 6-8, 10-12, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 40-46, and 49-51 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body and claims 13, 52-57, 59, 68-71 are directed to a method of treatment practised on the human/animal body. As a rule the search is carried out based on the alleged effects of the compound. However, for claims 8, 13, 33, 52, 53, 55, 59, and 68-71 no search or only an incomplete search was carried out, since the compound was not clearly defined and not sufficiently supported (Articles 5 and 6 PCT). For those claims, the search based on the alleged effects of the compounds was limited accordingly.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 8, 9, 13, 14 (no search) and 15-17, 33, 52, 53, 55, 58-60, 62, and 68-71 (partial search)

Present claims 8, 9, 13-17, 33, 52, 53, 55, 58-60, 62, and 68-71 relate to a compound and the use of such a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the ability to bind to a nucleic acid sequence encoding a protein with the activity of an serotonin-like G protein-coupled receptor or to bind to the corresponding protein and/or to modify the activity of the nucleic acid sequence or protein. The claims cover all compounds and methods 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 only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to expression vectors, antibodies, antisense oligonucleotides, and ribozymes. Since claims 8, 9, 13, and 14 do not refer to a single searchable compound, no search has been carried out for those claims.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/00540

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5691155	A	25-11-1997	FR 2671559 A1 DE 69232737 D1 EP 0567577 A1 WO 9212246 A1 JP 6504915 T	17-07-1992 26-09-2002 03-11-1993 23-07-1992 09-06-1994
WO 0136471	A	25-05-2001	AU 1769601 A EP 1242448 A2 WO 0136471 A2	30-05-2001 25-09-2002 25-05-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

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 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/00	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 4
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 0 1 A
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(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,P L,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・スマリアー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州ブルックライン、ボイルストン・ストリート 7 3 4
番

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB01 BB10 BB20 BB50 BB51 CB01 DA36 FB08
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA03 DA12
 EA04 GA11 HA11 HA13 HA14 HA17
 4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61 QQ79 QQ89 QQ91
 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR55 QR56 QR62 QR77 QR80
 QS16 QS25 QS32 QS34 QS36 QX01 QX02
 4B064 AG20 CA06 CA10 CA19 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA58X AA77X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA43
 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17
 MA01 NA14 ZA022 ZA512 ZA592 ZA702 ZA812 ZB262 ZC352 ZC412

4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 DD88 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA51
ZA59 ZA70 ZA81 ZB26 ZC35 ZC41
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74
GA26